

# Neuronale Zellerkennungsmoleküle: Interaktionen und Polysialylierung in der motoneuronalen Entwicklung des Zebrafischs

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Michaela Claudia Schober

aus

Karlsruhe

KIT-Dekan:

Prof. Dr. Willem Klopper

Referent:

Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent:

Dr. habil. Dietmar Gradl

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2016





---

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass

1. die Dissertation zum Thema  
**Neuronale Zellerkennungsmoleküle: Interaktionen und Polysialylierung in der moto-  
neuronalen Entwicklung des Zebrafischs**  
selbständig angefertigt wurde
2. keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden
3. die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht wurden
4. die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT in der jeweils gültigen Fas-  
sung beachtet wurden
5. die elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt

---

Ort und Datum

---

Unterschrift (Michaela Claudia Schober)

---

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>                                                                                                      | <b>vii</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>                                                                                                        | <b>ix</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                                                                      | <b>xi</b>  |
| <b>1 Zusammenfassung</b>                                                                                                          | <b>1</b>   |
| <b>2 Einleitung</b>                                                                                                               | <b>3</b>   |
| 2.1 Neuronale Zellerkennungsmoleküle der Ig-Superfamilie . . . . .                                                                | 3          |
| 2.2 Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM1 . . . . .                                                                              | 4          |
| 2.2.1 Molekularer Aufbau von NCAM1 . . . . .                                                                                      | 4          |
| 2.2.2 Die Glykanmodifikation Polysialinsäure . . . . .                                                                            | 5          |
| 2.2.3 Wechselwirkungen von NCAM1 . . . . .                                                                                        | 7          |
| 2.2.4 Heterophile Interaktionspartner von NCAM1 . . . . .                                                                         | 8          |
| 2.2.5 Funktionen von NCAM1 . . . . .                                                                                              | 9          |
| 2.2.6 Ncam1a und Ncam1b: NCAM1-Paraloge im Zebrafisch . . . . .                                                                   | 10         |
| 2.3 Tag-1: das CNTN2-Ortholog im Zebrafisch . . . . .                                                                             | 12         |
| 2.4 Neurolin: das ALCAM-Ortholog des Zebrafischs . . . . .                                                                        | 12         |
| 2.5 Spinale Motoneurone des Zebrafischs . . . . .                                                                                 | 13         |
| 2.6 Zielsetzung . . . . .                                                                                                         | 16         |
| <b>3 Material &amp; Methoden</b>                                                                                                  | <b>17</b>  |
| 3.1 Chemikalien,Puffer,Antibiotika und Kulturmedien . . . . .                                                                     | 17         |
| 3.2 Nukleinsäuren . . . . .                                                                                                       | 22         |
| 3.3 Proteine . . . . .                                                                                                            | 26         |
| 3.4 Antikörper und Farbstoffe . . . . .                                                                                           | 28         |
| 3.5 Kit-Systeme verschiedener Hersteller . . . . .                                                                                | 30         |
| 3.6 Längenstandards,Arbeitsmittel,Geräte,Programme . . . . .                                                                      | 31         |
| 3.7 Organismen . . . . .                                                                                                          | 33         |
| 3.8 Embryonen: Hälterung, Manipulation, Immunhistochemie . . . . .                                                                | 34         |
| 3.9 Zellkultur: Primärzellkulturen & Zelllinien . . . . .                                                                         | 36         |
| 3.10 Mikrobiologie: Transformation und Minipräparation . . . . .                                                                  | 38         |
| 3.11 Synthese von Nukleinsäuren: RNA, Erststrang, PCR und Plasmide . . . . .                                                      | 39         |
| 3.12 Proteinbiochemie: Proteinsynthese, SDS-PAGE/Western Blot, Oberflächen . . . . .                                              | 42         |
| 3.13 Assays: Bead-Aggregation, Affinitäts-Sonden und Pulldown . . . . .                                                           | 44         |
| <b>4 Ergebnisse</b>                                                                                                               | <b>47</b>  |
| 4.1 Ncam1-Paraloge und Polysialinsäure werden in vivo für geordnetes Auswachsen spi-<br>naler Motoneurone benötigt . . . . .      | 47         |
| 4.1.1 Charakterisierung der auftretenden Motoneuronen Phänotypen im <i>Whole</i><br><i>Mount</i> Embryo . . . . .                 | 47         |
| 4.1.2 Auftreten der Kategorien in Kontrollen . . . . .                                                                            | 49         |
| 4.1.3 <i>ncam1a</i> -Knockdown führt in <i>Whole Mounts</i> zur Defaszikulation von Moton-<br>euronen . . . . .                   | 50         |
| 4.1.4 Knockdown von <i>ncam1b</i> führt im <i>Whole Mount</i> zu aberranten Projektions-<br>mustern von Motoraxonen . . . . .     | 52         |
| 4.1.5 Knockdown der Polysialyltransferase St8SialII bewirkt im <i>Whole Mount</i> die<br>Defaszikulation von Motoraxonen. . . . . | 54         |
| 4.1.6 Effekte von Tag-1 und Neurolin auf die Projektionen von Motoraxonen . . . . .                                               | 55         |
| 4.2 Interaktionen zwischen den Ncam1-Paralogen und der Einfluss von polySia . . . . .                                             | 59         |

|          |                                                                                                                           |            |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2.1    | Die Ncam1-Paraloge interagieren homophil und A/B-heterophil . . . . .                                                     | 59         |
| 4.2.2    | Die Ncam1a/Ncam1a Interaktion wird durch Polysialinsäure-Modifikation beeinflusst . . . . .                               | 62         |
| 4.2.3    | Die Modifikation mit Polysialinsäure hat keinen Einfluss auf die Ncam1b homophile Interaktion . . . . .                   | 65         |
| 4.2.4    | Die Polysialinsäuremodifikation schwächt die A/B-heterophile Interaktion .                                                | 68         |
| 4.3      | Heterophile Interaktionen der Ncam1-Paraloge mit Tag-1 und Neurolin . . . . .                                             | 70         |
| 4.3.1    | Tag-1 interagiert schwach homophil und heterophil mit Ncam1b . . . . .                                                    | 71         |
| 4.3.2    | Neurolin interagiert homophil mit sich selbst und heterophil mit den Ncam1-Paralogen . . . . .                            | 74         |
| 4.4      | Native Interaktionspartner der Ncam1-Paraloge . . . . .                                                                   | 76         |
| 4.4.1    | Hinweise auf Interaktionspartner von Ncam1a und Ncam1b . . . . .                                                          | 76         |
| 4.4.2    | Pulldown Assays bestätigen Interaktion von Ncam1b mit Tag-1 . . . . .                                                     | 80         |
| 4.5      | Spinale Motoneurone im Zellkultursystem . . . . .                                                                         | 81         |
| 4.5.1    | Phänotypische Kategorien in Motoneuronen Primärzellkulturen . . . . .                                                     | 81         |
| 4.5.2    | Motoneurone auf unterschiedlichen Substraten: Ncam1a und Ncam1b sind permissiv . . . . .                                  | 83         |
| 4.5.3    | Der Knockdown von <i>ncam1a</i> verhindert die Bildung axonaler Projektionen von Motoneuronen in der Zellkultur . . . . . | 86         |
| 4.5.4    | Der Knockdown von <i>ncam1b</i> führt zum Branching von Motoraxonen in der Zellkultur . . . . .                           | 88         |
| 4.5.5    | Der Einfluss von Polysialinsäure wird von Motoneuronen beim Ausbilden von Axonen benötigt . . . . .                       | 93         |
| <b>5</b> | <b>Diskussion</b>                                                                                                         | <b>97</b>  |
| 5.1      | Ncam1a und Ncam1b sind an unterschiedlichen Aspekten der axonalen Projektion von Motoneuronen beteiligt . . . . .         | 97         |
| 5.2      | Unterschiedliche Interaktionen der Ncam1-Paraloge . . . . .                                                               | 99         |
| 5.2.1    | Homophile und heterophile Interaktionen zwischen den Ncam1-Paralogen .                                                    | 99         |
| 5.2.2    | Native Bindepartner von Ncam1a und Ncam1b . . . . .                                                                       | 101        |
| 5.2.3    | Tag-1: Funktion und Interaktionen . . . . .                                                                               | 103        |
| 5.2.4    | Neurolin: Funktion und Interaktionen . . . . .                                                                            | 104        |
| 5.3      | Funktionsanalysen von Ncam1a und Ncam1b in der Primärzellkultur . . . . .                                                 | 105        |
| 5.4      | Ausblick . . . . .                                                                                                        | 110        |
|          | <b>Literatur</b>                                                                                                          | <b>111</b> |
|          | <b>Anhang</b>                                                                                                             | <b>125</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|    |                                                                                                                                                                        |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1  | Spleißisoformen von NCAM . . . . .                                                                                                                                     | 5  |
| 2  | Schematische Darstellung von polySia-NCAM . . . . .                                                                                                                    | 6  |
| 3  | Aufbau der Ncam-Paraloge im Zebrafisch . . . . .                                                                                                                       | 10 |
| 4  | Struktur des Tag-1-Orthologs im Zebrafisch . . . . .                                                                                                                   | 12 |
| 5  | Struktur des Neurolin-Orthologs im Zebrafisch . . . . .                                                                                                                | 13 |
| 6  | Tg(hb9::GFP): Expression von GFP unter dem motoneuronen-spezifischen Promotor hb9 . . . . .                                                                            | 14 |
| 7  | Projektionsmuster primärer und sekundärer Motoraxone im Zebrafisch . . . . .                                                                                           | 16 |
| 8  | Expressionsnachweis rekombinanter Proteine aus dem Zellkulturüberstand . . . . .                                                                                       | 27 |
| 9  | Motoneuronen-Phänotypen im <i>Whole Mount</i> Embryo . . . . .                                                                                                         | 48 |
| 10 | Quantifizierung des Projektionsmusters von Motoraxonen in unterschiedlichen Kontrollen . . . . .                                                                       | 49 |
| 11 | Der <i>ncam1a</i> -Knockdown verhindert spezifisch die Expression von Ncam1a und führt im <i>Whole Mount</i> zu einem veränderten Motoraxon-Phänotypen . . . . .       | 50 |
| 12 | Quantifizierung des Projektionsmusters Ncam1a-defizienter Motoraxone im Vergleich mit Kontrolle und Rescue im <i>Whole Mount</i> . . . . .                             | 51 |
| 13 | Der <i>ncam1b</i> -Knockdown verhindert spezifisch die Expression von Ncam1b und führt im <i>Whole Mount</i> zu einem stark veränderten Motoraxon-Phänotypen . . . . . | 52 |
| 14 | Quantifizierung des Projektionsmusters Ncam1b-defizienter Motoraxone im <i>Whole Mount</i> . . . . .                                                                   | 53 |
| 15 | Verlust der Glykanmodifikation Polysialinsäure im <i>Whole Mount</i> Embryo führt zu veränderten motoraxonalen Projektionen . . . . .                                  | 54 |
| 16 | Quantifizierung des Projektionsmusters polySia defizienter Motoraxone im <i>Whole Mount</i> . . . . .                                                                  | 55 |
| 17 | Ein <i>tag-1</i> -Knockdown im <i>Whole Mount</i> Embryo führt zu keinen augenscheinlichen Veränderungen motoraxonaler Projektionen . . . . .                          | 56 |
| 18 | Quantifizierung des Projektionsmusters Tag-1 defizienter Motoraxone im <i>Whole Mount</i> . . . . .                                                                    | 57 |
| 19 | Der <i>tag-1</i> -Knockdown führt dosisabhängig zu einer faszikulierten posterioren Kommissur . . . . .                                                                | 57 |
| 20 | Der <i>neurolin</i> -Knockdown führt zur Defaszikulation und zur Ausbildung aberranter Seitenäste von Motoneuronen im <i>Whole Mount</i> Embryo . . . . .              | 58 |
| 21 | Quantifizierung des Projektionsmusters Neurolin defizienter Motoraxone im <i>Whole Mount</i> . . . . .                                                                 | 59 |
| 22 | Die Ncam1-Paraloge des Zebrafischs können homophil interagieren . . . . .                                                                                              | 60 |
| 23 | Die Ncam1-Paraloge des Zebrafischs können A/B-heterophil interagieren . . . . .                                                                                        | 61 |
| 24 | NCAM1 Sequenzvergleich Ig1-Ig2 unterschiedlicher Spezies . . . . .                                                                                                     | 62 |
| 25 | Expressionsnachweis von Ncam1a und polySia-Ncam1a in Zellkulturen . . . . .                                                                                            | 63 |
| 26 | Die Homophile Wechselwirkung von Ncam1a wird in Anwesenheit von polySia verhindert . . . . .                                                                           | 64 |
| 27 | <i>In vitro</i> Polysialylierung verhindert die homophile Ncam1a/Ncam1a Interaktion . . . . .                                                                          | 65 |
| 28 | Expressionsnachweis von Ncam1b und polySia-Ncam1b in Zellkulturen . . . . .                                                                                            | 66 |
| 29 | Polysialylierung hat keinen Einfluss auf die homophile Interaktion von Ncam1b . . . . .                                                                                | 67 |
| 30 | <i>In vitro</i> Polysialylierung hat keinen Einfluss auf die Ncam1b/Ncam1b Interaktion . . . . .                                                                       | 68 |
| 31 | Die Heterophile Ncam1a Interaktion mit Ncam1b wird durch polySia stark reduziert . . . . .                                                                             | 69 |
| 32 | Die Interaktion von polySia-Ncam1b mit Ncam1a in Anwesenheit von polySia geschwächt . . . . .                                                                          | 70 |
| 33 | Tag-1 des Zebrafischs bildet nur schwache homophile Aggregate aus . . . . .                                                                                            | 72 |
| 34 | Tag-1 interagiert in Zellen Overlay-Assays sehr schwach homophil . . . . .                                                                                             | 73 |

|    |                                                                                                                                                                           |     |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 35 | Tag-1 interagiert nicht mit Ncam1a aber heterophil mit Ncam1b . . . . .                                                                                                   | 74  |
| 36 | Neurolin interagiert homophil . . . . .                                                                                                                                   | 75  |
| 37 | Neurolin interagiert schwach heterophil mit Ncam1a und Ncam1b . . . . .                                                                                                   | 76  |
| 38 | Native Bindepartner von Ncam1a sind auf dem Rumpf lokalisiert . . . . .                                                                                                   | 77  |
| 39 | Ncam1a-Affinitätssonden detektieren native Bindepartner von Ncam1a auf Zellen<br>des Rückenmarks, der Floorplate und auf muskulären Strukturen <i>st8Siall</i> -Knockdown | 78  |
| 40 | Native Bindungspartner von Ncam1a und Ncam1b auf den Motoraxonen und dem<br>Seitenliniennerv . . . . .                                                                    | 79  |
| 41 | Pulldown-Assay bestätigt Tag-1 als nativen Interaktionspartner Ncam1b . . . . .                                                                                           | 80  |
| 42 | Motoneuronen-Phänotypen isoliert auf Laminin . . . . .                                                                                                                    | 81  |
| 43 | Quantifizierung der Projektionsmuster von Motoneuronen unterschiedlicher Kon-<br>trollen auf Laminin . . . . .                                                            | 82  |
| 44 | Zeitrafferaufnahme eines Kontroll-Motoneurons auf Laminin . . . . .                                                                                                       | 83  |
| 45 | Quantifizierung des Projektionsmusters von Motoneuronen auf unterschiedlichen<br>Substraten . . . . .                                                                     | 84  |
| 46 | Zeitrafferaufnahme eines Kontroll-Motoneurons auf alternierenden Laminin und<br>Ncam1b-Fc Streifen . . . . .                                                              | 85  |
| 47 | Ncam1a wird auf Motoneuronen in der Zellkultur exprimiert . . . . .                                                                                                       | 86  |
| 48 | Quantifizierung des Projektionsmusters <i>ncam1a</i> -defizienter Motoneurone auf un-<br>terschiedlichen Substraten . . . . .                                             | 87  |
| 49 | Ncam1b wird auf Motoneuronen in der Zellkultur exprimiert . . . . .                                                                                                       | 88  |
| 50 | Quantifizierung des Projektionsmusters <i>ncam1b</i> -defizienter Motoneurone auf un-<br>terschiedlichen Substraten . . . . .                                             | 89  |
| 51 | Zeitrafferaufnahme eines <i>ncam1b</i> -defizienten Motoneurons auf Laminin . . . . .                                                                                     | 90  |
| 52 | Migration eines <i>ncam1b</i> -defizienten Motoneurons von Laminin auf einen Ncam1b-<br>Streifen in einer Zeitrafferaufnahme . . . . .                                    | 91  |
| 53 | Migration eines <i>ncam1b</i> -defizienten Motoneurons das Ncam1b-Streifen bevorzugt<br>in Zeitrafferaufnahmen . . . . .                                                  | 92  |
| 54 | polySia wird auf Motoneuronen in der Zellkultur exprimiert . . . . .                                                                                                      | 94  |
| 55 | Quantifizierung des Projektionsmusters polySia-defizienter Motorneurone auf La-<br>minin . . . . .                                                                        | 95  |
| 56 | Modell zur Funktion von Ncam1a und Ncam1b im <i>Whole Mount</i> . . . . .                                                                                                 | 99  |
| 57 | Modell zur homophilen und heterophilen Interaktion der Ncam1-Paraloge . . . . .                                                                                           | 101 |
| 58 | Modell zur homophilen und heterophilen Interaktion von Tag-1 . . . . .                                                                                                    | 104 |
| 59 | Modell zur homophilen und heterophilen Interaktion von Neurolin . . . . .                                                                                                 | 104 |
| 60 | Modell zum Wachstum von Motoneuronenkulturen auf unterschiedlichen Oberflä-<br>chensubstraten . . . . .                                                                   | 106 |
| 61 | Modell zum Wachstum Ncam1a-defizienter Motoneuronenkulturen auf unterschied-<br>lichen Oberflächensubstraten . . . . .                                                    | 107 |
| 62 | Modell zum Wachstum Ncam1b-defizienter Motoneuronenkulturen auf unter-<br>schiedlichen Oberflächensubstraten . . . . .                                                    | 108 |

## Tabellenverzeichnis

|    |                                                                         |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 1  | Chemikalien anderer Hersteller . . . . .                                | 17 |
| 2  | Puffer . . . . .                                                        | 17 |
| 3  | Lösungen . . . . .                                                      | 19 |
| 4  | Antibiotika . . . . .                                                   | 20 |
| 5  | Kulturmedien für Zelllinien . . . . .                                   | 21 |
| 6  | Kulturmedium für Primärzellen . . . . .                                 | 21 |
| 7  | Kulturmedium für Embryonen . . . . .                                    | 21 |
| 8  | Kulturmedien für Bakterien . . . . .                                    | 22 |
| 9  | Nukleotide für DNA Synthese . . . . .                                   | 22 |
| 10 | Oligonukleotide - „Primer“ . . . . .                                    | 22 |
| 11 | Morpholino-Nukleotide . . . . .                                         | 24 |
| 12 | Ausgangsvektoren . . . . .                                              | 24 |
| 13 | Expressionsvektoren . . . . .                                           | 25 |
| 14 | Proteine zur Oberflächenfunktionalisierung . . . . .                    | 26 |
| 15 | Rekombinante Proteine . . . . .                                         | 26 |
| 16 | Polymerasen . . . . .                                                   | 27 |
| 17 | Restriktionsendonukleasen . . . . .                                     | 28 |
| 18 | Sonstige Enzyme . . . . .                                               | 28 |
| 19 | Primärantikörper . . . . .                                              | 29 |
| 20 | Sekundärantikörper . . . . .                                            | 29 |
| 21 | Farbstoffe . . . . .                                                    | 30 |
| 22 | Kit-Systeme . . . . .                                                   | 30 |
| 23 | Längenstandards . . . . .                                               | 31 |
| 24 | Arbeitsmittel . . . . .                                                 | 31 |
| 25 | Geräte . . . . .                                                        | 32 |
| 26 | Mikroskope und Objektive . . . . .                                      | 32 |
| 27 | Fixieren und Färben von <i>Whole Mount</i> Embryonen . . . . .          | 35 |
| 28 | Färbeprotokoll Zellkultur . . . . .                                     | 38 |
| 29 | Standard PCR-Programm Phusion Hot Start II . . . . .                    | 40 |
| 30 | 2-Step Programm für die Synthese von Schnittstellenüberhängen . . . . . | 40 |
| 31 | Western Blot Antikörperinkubation . . . . .                             | 43 |





**Abkürzungsverzeichnis**

|                        |                                                    |
|------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>ALCAM</b>           | <i>activated leukocyte-cell adhesion molecule</i>  |
| <b>BDNF</b>            | <i>brain-derived neurotrophic factor</i>           |
| <b>CaP</b>             | <i>caudal primary neuron</i>                       |
| <b>dpf</b>             | <i>days post fertilization</i>                     |
| <b>DSCAM</b>           | <i>down syndrome cell adhesion molecule</i>        |
| <b>FGF</b>             | <i>fibroblast growth factor</i>                    |
| <b>FACS</b>            | <i>fluorescence-activated cell sorting</i>         |
| <b>FN-III-Domäne</b>   | Fibronektin-III-ähnliche Domäne                    |
| <b>GDNF</b>            | <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> |
| <b>GPI-Anker</b>       | Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker                |
| <b>hpf</b>             | hours post fertilization                           |
| <b>Ig-Domäne</b>       | Immunglobulin-ähnliche Domäne                      |
| <b>Ig-Superfamilie</b> | Immunglobulin-Superfamilie                         |
| <b>kDa</b>             | Kilodalton                                         |
| <b>L1CAM</b>           | <i>L1-cell adhesion molecule</i>                   |
| <b>MiP</b>             | <i>middle primary neuron</i>                       |
| <b>NCAM1</b>           | <i>neural cell adhesion molecule1</i>              |
| <b>Neu5Ac</b>          | N-Acetylneuraminsäure                              |
| <b>Neu5Gc</b>          | N-Glykolyneuraminsäure                             |
| <b>NgCAM</b>           | <i>neuronal cell adhesion molecule</i>             |
| <b>PDGF</b>            | <i>platelet-derived growth factor</i>              |
| <b>polySia</b>         | Polysialinsäure                                    |
| <b>RoP</b>             | <i>rostral primary neuron</i>                      |
| <b>TAG-1</b>           | <i>transient axonal glycoprotein-1</i>             |
| <b>VaP</b>             | <i>variable primary neuron</i>                     |
| <b>VASE</b>            | <i>variable alternatively spliced exons</i>        |

---

## 1 Zusammenfassung

Die Entwicklung und funktionelle Verschaltung des Nervensystems erfordern eine präzise zeitliche und räumliche Feinjustierung zellulärer Interaktionen. Komplexe Wechselwirkungen zwischen einer Vielzahl von Rezeptoren und ihren Liganden bilden die Grundlage dafür. An diesen Vorgängen ist auch das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM1 beteiligt. Neben der reinen Zell/Zell-Adhäsion spielt es auch bei Signaltransduktionsprozessen während der axonalen Lenkung eine Rolle. Die Interaktionen von NCAM1 werden durch die Modifikation mit Polysialinsäure (polySia) beeinflusst, wobei NCAM1 von einem adhäsionsvermittelndem zu einem antiadhäsiven Molekül werden kann. Während Säugetiere nur ein *ncam1*-Gen besitzen, finden sich im Genom der Teleostier aufgrund einer Genomduplication zwei Kopien, *ncam1a* und *ncam1b*. Die Genomduplikation führte zur Subfunktionalisierung der Paraloge. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass beide Paraloge polySia tragen, aber nur ein teilweise überlappendes Expressionsmuster haben und unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des Zebrafischs ausüben.

Das Interaktom von Ncam1 stand im Zentrum dieser Arbeit. Primäre Fragestellung war dabei, ob die Ncam1-Paraloge homophile und heterophile Wechselwirkungen miteinander eingehen. Zusätzlich wurden auch andere Zelladhäsionsmoleküle in die Analysen mit einbezogen. Diese Fragestellungen wurden an Motoneuronen untersucht. Ihre Axone wachsen in einem stereotypen Muster in ihre Zielregionen ein. Auf diesem Weg müssen sie mit anderen Neuronen und mit nicht-neuronalen Zellen interagieren.

Morpholino-Knockdown-Studien bestätigten, dass die Ncam1-Paraloge unterschiedliche Funktionen beim Auswachsen von Motoraxonen ausüben. Während der Knockdown von *ncam1a* zur Defaszikulation der Axonbündel führt, induziert der Verlust von *ncam1b* ein ausgeprägtes Branching der Axone und die Bildung aberranter Projektionen. Wird die Synthese von polySia verhindert, führt dies, wie beim *ncam1a*-Knockdown, zur Defaszikulation der Axonbündel.

Welche Protein-Protein-Wechselwirkungen diesen Effekten zugrunde liegen, wurde durch verschiedene *in vitro*-Assays untersucht. Es konnte mittels Bead-Aggregation gezeigt werden, dass Ncam1a und Ncam1b sowohl homophil als auch heterophil miteinander in Wechselwirkung treten. In Overlay-Assays konnte polySia ein entscheidender Einfluss auf diese Interaktionen zugesprochen werden, indem homophile Interaktionen von Ncam1a aufgehoben sowie die Bindung von Ncam1a an Ncam1b reduziert werden. Die homophile Interaktion von Ncam1b dagegen wird nicht durch die Polysialylierung abgeschwächt. Es gibt zusätzlich auch Unterschiede in den Interaktionen von Ncam1a und Ncam1b mit anderen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie. Beide binden an Neurolin, aber nur Ncam1b kann mit Tag-1 interagieren.

Um die unterschiedlichen Funktionen in einem definierten *in vitro* System zu untersuchen, wurden Primärzellkulturen von Motoneuronen aus Zebrafischembryonen etabliert. Laminin, Ncam1a und Ncam1b dienten den Zellen als Wachstumssubstrat. Der Knockdown von *ncam1a* führt dazu, dass die Motoneuronen auf Laminin keine Axone mehr bilden. Auch Ncam1a und Ncam1b als Substrat können das Auswachsen dieser Axone nicht induzieren. Der Knockdown von *ncam1b* bewirkt auf Laminin die Ausbildung außergewöhnlich stark verzweigter Axone; wachsen diese Axone auf Ncam1a bilden sie keine Neuriten mehr aus. Auf Ncam1b bilden sie lange, unverzweigte Projektionen wie in unbehandelten Kontrollen. Hierbei sind offensichtlich heterophile Interaktionen der extrazellulären Domäne von Ncam1b involviert, der postulierte Interaktionspartner konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Funktionen der Paraloge Ncam1a und Ncam1b im Zebrafisch auf unterschiedlichen Wechselwirkungen basieren müssen. Ncam1a und polySia haben eine wichtige Rolle bei der Bildung von Neuriten und ihrer Faszikulation. Ncam1b ist für die Wegfindung und Selbsterkennung der Axone von Bedeutung. Letzteres stellt eine bisher noch nicht beschriebene Funktion von NCAM1 dar. Evolutionär betrachtet scheint die Erhaltung beider Paraloge von großer Wichtigkeit, da Ncam1a und Ncam1b so verschiedene Funktionen erlangt haben, dass beide unabdingbar geworden sind.



## 2 Einleitung

Der korrekte Aufbau und die daraus resultierende minutiöse Verschaltung des Nervensystems sind davon abhängig, dass Axone in Richtung ihrer vorgesehenen Zielregionen wachsen, diese finden und erkennen. Die Zellen navigieren dafür auf genau festgelegten Wegen und nutzen zur Erkennung der Umgebung eine hoch spezialisierte Struktur an der Spitze des Axons als Navigator, den Wachstumskegel (Übersichtsartikel: Lowery & Van Vactor, 2009).

Der Weg zu ihrem Bestimmungsort besteht aus vielen kürzeren Teilstrecken. An diesen Intermediärzielen oder *choice points* werden den Wachstumskegeln bestimmte richtungsweisende Informationen geliefert, um dann zum nächsten *choice point* bis hin zu ihrem Endziel zu gelangen (Übersichtsartikel: Tessier-Lavigne & Goodman, 1996).

Wachstumskegel interagieren mit ihrer Umgebung über vielfältige Mechanismen. Man kann prinzipiell zwischen zwei verschiedenen Mechanismen unterscheiden, durch die die axonale Wegfindung beeinflusst werden kann. Moleküle können hierbei als *long-range cues* über lange oder als *short-range cues* über kurze Distanzen wirken. *long-range cues* beeinflussen das Axonwachstum über Chemo-Repulsion oder -Attraktion. Netrine (abhängig vom Zelltyp) oder sezernierte Sema-phorine können solche *long-range cues* darstellen.

*short-range cues* sind kontaktabhängige Signale, sie werden durch verschiedenste Familien von Wegfindungsmolekülen vermittelt. Neben repulsiv wirkenden Signalen transmembranener Sema-phorinen und Eph-Liganden, werden attraktive Signale unter anderem durch Laminine und neuro-nale Zellerkennungsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) vermittelt (Übersichtsartikel: Tessier-Lavigne & Goodman, 1996; Dickson, 2002).

### 2.1 Neuronale Zellerkennungsmoleküle der Ig-Superfamilie

Der Einfluss und die Funktion neuronaler Zellerkennungsmoleküle sowie deren posttranslationale Modifikationen sind in der Entwicklung des Nervensystems, aber auch im adulten Nervensystem sehr vielfältig. Neben der Migration und Zielfindung beeinflussen sie auch Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung und die Regeneration (Rutishauser & Jessell, 1988; Crossin & Krushel, 2000; Y. Zhang et al., 2008).

Zell-Zell/Zell-Substrat Interaktionen können von homophiler (gleiche Moleküle miteinander) oder heterophiler (unterschiedliche Moleküle miteinander) Weise sein und regulieren dynamisch die Wechselwirkung mit anderen Zellen (Übersichtsartikel: Brummendorf & Rathjen, 1996, Seidenfaden et al., 2006). Schlussendlich aktivieren diese Wechselwirkungen intrazelluläre Signalkaskaden, die zur Reorientierung des Zytoskeletts und zu veränderter Genexpression führen (Crossin & Krushel, 2000; Juliano, 2002; Rougon & Hobert, 2003; Maness & Schachner, 2007). Eine weitere Modularität bieten posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Sialylierung oder Palmitoylierung (Übersichtsartikel: Nagaraj & Hortsch, 2006; Niethammer et al., 2002; Schnaar et al., 2014). Zellerkennungsmoleküle sind membranassoziierte Zelloberflächen-Glykoproteine. Sie lassen sich in vier Klassen unterteilen. Zu ihnen gehören die Integrine, Selektine, die Cadherine sowie die Mitglieder der Ig-Superfamilie (Reichardt & Tomaselli, 1991; Lasky, 1995; Takeichi, 1990; Homrich et al., 2016; Aplin et al., 1998).

Die Ig-Superfamilie stellt die größte Gruppe evolutionär verwandter Moleküle dar (Barclay, 2003). Diese Proteinklasse zeichnet sich durch ein oder mehrere extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig-Domänen) aus. Es handelt sich dabei um eine konservierte Struktur, die aus 55 - 75 Aminosäuren besteht die in zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern angeordnet sind (A. F. Williams & Barclay, 1988). In vielen Fällen enthält die Extrazellulärdomäne außerdem noch ein oder mehrere Fibronectin-III-ähnliche Domänen (FN-III-Domänen). Strukturell sind FN-III-Domänen vergleichbar mit den Ig-Domänen. Sie bilden ein  $\beta$ -Sandwich, das aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern besteht (Main et al., 1992). Viele Mitglieder der Ig-Superfamilie sind über eine Transmembrandomäne in der Membran verankert und haben eine intrazelluläre Domäne, die der Signaltransduktion dient.

Manche sind über einen Glykosylphosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) mit der Membran assoziiert (Vaughn & Bjorkman, 1996; Homrich et al., 2016). Das erste Molekül, das der Ig-Superfamilie zugeordnet wurde, ist das neurale Zellerkennungsmolekül-1 *neural cell adhesion molecule1* (NCAM1) (Thiery et al., 1977). NCAM1 ist eines der bestuntersuchten und prominentesten Moleküle dieser großen Proteinfamilie (Edelman, 1983; Maness & Schachner, 2007).

### 2.2 Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM1

NCAM1 wird ubiquitär im zentralen und peripheren Nervensystem auf Neuronen (Jorgensen & Bock, 1974) und Gliazellen (Noble et al., 1985) exprimiert, außerdem wurde es in Muskelzellen nachgewiesen (Grumet et al., 1982). NCAM1 wurde zunächst aus Hirnen von Ratten isoliert und als synaptisches Membranprotein D2 beschrieben (Jorgensen & Bock, 1974). Es wurde als erstes Protein den Zelladhäsionsmolekülen zugeordnet (Thiery et al., 1977). Es ist ein evolutionär hoch konserviertes Molekül, dessen Homologe sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten vorkommen (Garcia-Alonso et al., 1995 Drosophila; Thompson et al., 1996 Aplysia; Mizuno et al., 2001 Zebrafisch; Balak et al., 1987 Xenopus; Hemperly et al., 1986 Huhn; Chuong et al., 1982 Maus und Ratte; Nguyen et al., 1986 Mensch).

#### 2.2.1 Molekularer Aufbau von NCAM1

Durch alternatives Spleißen der NCAM1 prä-mRNA können bis zu 27 Isoformen generiert werden (Reyes et al., 1991). NCAM120, NCAM140 und NCAM180 sind die drei Hauptisoformen. Sie werden entwicklungsabhängig gebildet und nach ihrem Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) benannt (Hemperly et al., 1990). Die vierte Ig-Domäne von NCAM1 kann zusätzlich durch sehr kurze variable Exons, die so genannten *variable alternatively spliced exons* (VASE) durch alternatives Spleißen modifiziert werden (Small et al., 1988; Mizuno et al., 2001). Die drei Hauptisoformen haben eine identische Extrazellulärdomäne, bestehend aus fünf Ig-Domänen und zwei FN-III-Domänen, sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Membranverankerungen (Santoni et al., 1989) (Abb. 1). NCAM140 und NCAM180 sind transmembrane Moleküle mit unterschiedlich langer intrazellulärer Domäne (Small et al., 1987; Barthels et al., 1988). NCAM120 hat keine Transmembrandomäne, sondern ist an die Membran über einen GPI-Anker gebunden (Hemperly et al., 1986). Neben diesen drei Hauptisoformen können zudem lösliche Isoformen gebildet werden, die keine Membranverankerungen besitzen. Diese entstehen unter anderem durch ein alternatives Stopcodon in der Sequenz von NCAM120 (Barthels et al., 1987) oder durch ADAM-Metalloprotease-vermitteltes enzymatisches *shedding* der Ektodomäne von NCAM140 (Hinkle et al., 2006).

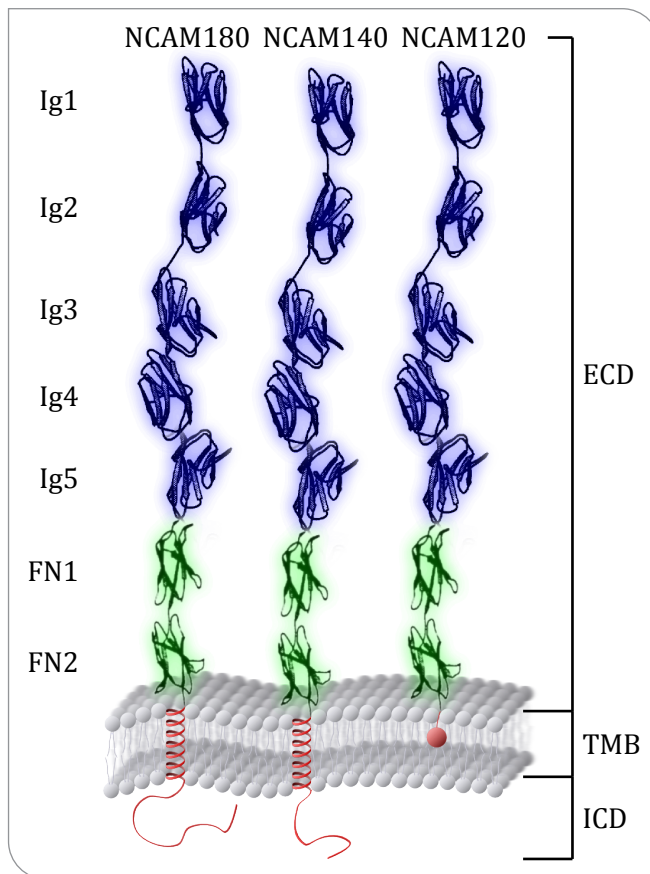


Abbildung 1: Spleißisoformen von NCAM. Entwicklungsabhängig und Zelltypspezifisch können unterschiedliche NCAM Isoformen durch alternatives Spleißen gebildet werden. Die drei Hauptisoformen sind NCAM180, NCAM140 und NCAM120. Sie sind benannt nach ihrem Molekulargewicht in kDa. Alle drei haben eine identische extrazelluläre Domäne (ECD) die aus fünf Ig-Domänen und zwei FN-III-Domänen besteht. Sie unterscheiden sich in der Art ihrer Membranverankerung. NCAM180 und NCAM140 haben beide eine Transmembrandomäne (TMB). NCAM180 hat eine längere intrazelluläre Domäne als NCAM140 (ICD) und NCAM120 ist über einen GPI-Anker in der Membran verankert. Abkürzungen: Ig: Ig-Domäne, FN: FN-III-Domäne, ECD: extrazelluläre Domäne, TMB: Transmembrandomäne, ICD: intrazelluläre Domäne. Struktur der ECD aus Nelson et al. (1995).

Die Isoformen werden Zelltyp-spezifisch und -entwicklungsabhängig exprimiert und führen dort unterschiedliche Funktionen aus. NCAM140 wird hauptsächlich auf auswachsenden Neuronen und deren migrierenden Wachstumskegeln und auf Gliazellen exprimiert, wohingegen NCAM180 vermehrt auf bereits entwickelten Neuronen Zell-Zell-Kontakte herstellt (Polo-Parada et al., 2004). Über die identische extrazelluläre Domäne der drei Isoformen vermittelt NCAM1 homophile und heterophile Interaktionen. Als Ligand spielt die extrazelluläre Domäne eine wichtige Rolle in der Aktivierung spezifischer Signalkaskaden, die für Axonlenkung und -wachstum wichtig sind (Doherty et al., 1989). Außerdem kann NCAM1 über die intrazelluläre Domäne der Isoformen 140 und 180 auch Signaltransduktionskaskaden aktivieren (Übersichtsartikel: Panicker et al., 2003). Lösliche Isoformen von NCAM1 werden mit Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen in Verbindung gebracht. Dosisabhängig reduzieren sie die Proliferation und fördern die Differenzierung (Shin et al., 2002).

## 2.2.2 Die Glykanmodifikation Polysialinsäure

Sialinsäuren sind eine Gruppe C9-Zucker die als Monomere, Oligomere und Polymere eine heterogene Gruppe von Zelloberflächen-Glykanen bilden (Sato & Kitajima, 2013). Die Diversität erlangt das Molekül durch unterschiedliche N- und O-Substitutionen der zwei Grundbausteine N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) und N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc). Die üblichste Verknüpfung der Sialinsäuren ist die O-Acetylierung, bevorzugt an der Hydroxygruppe des C9 Kohlenstoffs. Über verschiedene glykosidische Bindungen wird die Komplexität der Glykanketten noch zusätzlich erhöht (Colley et al., 2014). Abhängig vom Polymerisationsgrad (DP) spricht man von Di- (DP 2), Tri- (DP 3), Oligo- (DP 4-7) oder Polysialinsäure (polySia) (DP  $\geq 8$ ) (Sato & Kitajima, 2013). Entsprechend der Zusammensetzung und Verknüpfung regulieren sie unterschiedlichste biologische Interaktionen wie Zelladhäsion, Anheftung von Viren, Proliferation, Zellteilung oder Bindung von Neurotrophinen (Übersichtsartikel: Colley et al., 2014).

Im Gehirn von Vertebraten kommt polySia hauptsächlich als  $\alpha$ -2-8-Neu5Ac Polymer vor. Es ist eine der bedeutsamsten Modifikation von NCAM1 (Übersichtsartikel: Hildebrandt et al., 2007; Hildebrandt & Dityatev, 2015). Alle NCAM1 Isoformen können mit polySia posttranslational modifiziert werden (Kolkova, 2010). Dies findet hauptsächlich in frühesten Entwicklungsstadien statt. In späteren Entwicklungsstadien ist die Modifikation mit polySia auf Areale beschränkt, die mit synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht werden. Prozesse wie die Reorganisation und die synaptische Neuerschaltung bleiben in diesen Arealen Zeitlebens erhalten (Rothbard et al., 1982; Cox et al., 2009).

Die langen Homopolymere wurden zu Beginn hauptsächlich als zelladhäsions-verhindernder Faktor beschrieben. Dies ist durch die negative Ladung und das große Hydrationsvolumen bedingt (Johnson et al., 2005). polySia an NCAM1 kann dessen adhäsive Eigenschaften vermindern und fördert so Neuritenwachstum und damit einhergehende dynamische Veränderungen (Rutishauser & Landmesser, 1996).

In daran anschließenden Untersuchungen konnten dem Molekül neben der sterischen Blockade auch unterschiedliche regulatorische Funktionen zugewiesen werden (Übersichtsartikel: Hildebrandt et al., 2007; Schnaar et al., 2014). Beispielsweise ist polySia in der Lage Neurotrophine wie den *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) zu binden und dient hier als Reservoir (Kanato et al., 2008). Außerdem beeinflusst es die Axonlenkung kommissuraler Axone (Marx et al., 2001). Weiterhin reguliert es die räumliche Orientierung und die Langzeit-Potenzierung (Becker et al., 1996). Es fördert auch im adulten Nervensystem Zellmigration und Axonlenkung und spielt so eine Rolle in der synaptischen Plastizität (Rutishauser, 1996).

Die Synthese von polySia an NCAM1 erfolgt mit der *core*-Glykosylierung an N-Glykosylierungsstellen (Asn-499 und Asn-478) der fünften Ig-Domäne (Abb. 2). Es können bis zu 400 Neu5Ac-Monomere an die Ig5-Domäne gebunden werden (Nelson et al., 1995; Übersichtsartikel: Angata & Fukuda, 2003; Nakata & Troy, 2005).

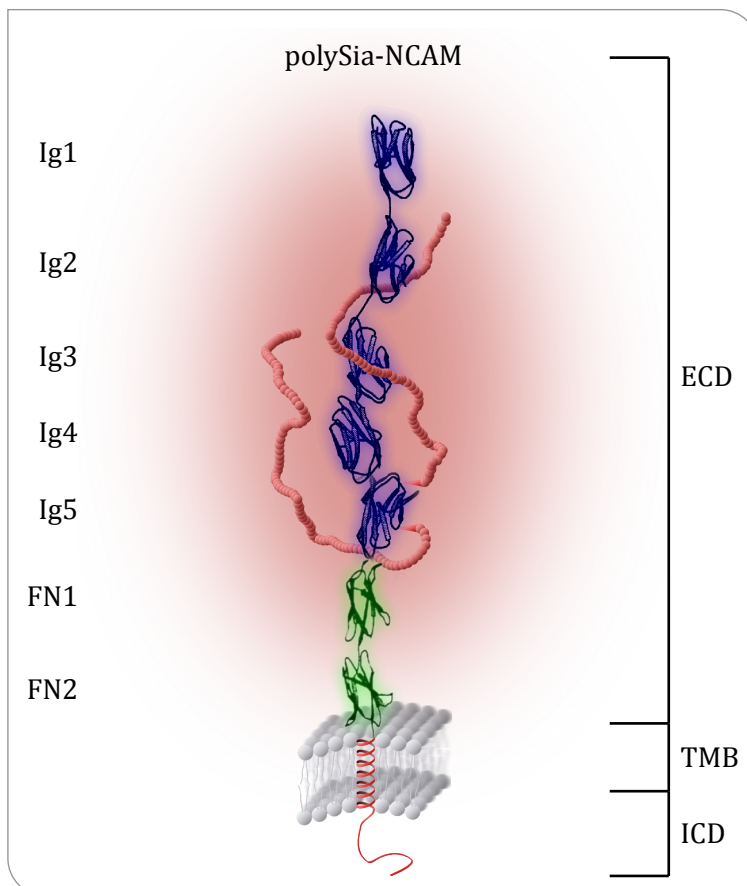


Abbildung 2: Schematische Darstellung von polySia-NCAM nach Schnaar et al., 2014. PolySia ist eine spezielle Zuckermodifikation von NCAM1. Es gibt zwei Glykosylierungsstellen an der fünften Ig-Domäne (Pfeilspitzen), die mit polySia modifiziert werden können. Aufgrund der negativen Ladung und seiner Wasserbindekapazität kann es die NCAM1-vermittelten Interaktionen sterisch unterbinden. Abkürzungen: Ig: Ig-Domäne, FN: FN-III-Domäne, ECD: extrazelluläre Domäne, TMB: Transmembrandomäne, ICD: intrazelluläre Domäne. Struktur der ECD aus Nelson et al. (1995).



Die Polymerisierung der Neu5Ac-Monomere und damit die Synthese von polySia an NCAM1 wird in Vertebraten durch zwei Golgi-assoziierte Enzyme katalysiert, die Polysialyltransferasen St8SialII und St8SialIV (Angata et al., 1997; Übersichtsartikel: Angata & Fukuda, 2003; Angata & Fukuda, 2003). Es handelt sich um hoch konservierte Proteine unter den Vertebraten (Harduin-Lepers et al., 2005). Sie unterscheiden sich hinsichtlich des zeitlichen Expressionsmusters (Angata et al., 1997; Eckhardt et al., 2000). St8SialII zeigt eine erhöhte Aktivität während der Embryonalentwicklung, wohingegen St8SialIV verstärkt im adulten Nervensystem auftritt. Knockouts der Polysialyltransferasen in der Maus haben gezeigt, dass beide Enzyme unabhängig voneinander polySia synthetisieren können (Eckhardt et al., 2000). Auch im Zebrafisch erfolgt die Synthese von polySia durch beide Enzyme und sie unterscheiden sich auch hier in ihrer temporalen Aktivität (Marx et al., 2007; Langhauser et al., 2012).

Verschiedene Polymere der Sialinsäure treten sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten mit unterschiedlichsten Funktionen auf. Gram-negative Bakterien, die höhere Vertebraten als Wirt benötigen, tragen polySia und verursachen häufig schwere Krankheiten (Übersichtsartikel: Varki, 2008). Beispielsweise sind neuroinvasive Bakterien wie *Neisseria meningitidis* (Serogruppe B) oder *E. coli* K1 bekannte Träger von polySia (E. R. Vimr et al., 2004). Die Kapseln der Bakterien, die strukturell der polySia des Wirts gleichen, verhindern dessen Immunantwort (E. Vimr & Lichtensteiger, 2002; Ziak et al., 1996).

Echinodermen gelten als die primitivsten Tiere, bei denen polySia beschrieben wurde. Die Eier der Seegurke sind umhüllt von sialinsäurereichen Glykoproteinen. Diese sind hier verantwortlich für die Akrosomreaktion (SeGall & Lennarz, 1979). Spermien der Seegurke tragen ebenfalls polySia. polySia-Flagelliasalin reguliert über die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration die Bewegung der Spermien (Kambara et al., 2011).

Auch Eier der Salmonidae tragen die Glykanmodifikation. Polysialoglycoproteine (PSGP) sind die Trägermoleküle. polySia-PSGP schützt unter anderem das Gelege vor Bakterien, da die O-acetylierten Sialinsäuren nicht durch bakterielle Sialidasen abgebaut werden können (Sato et al., 1993).

Auch humane Tumorzellen unterschiedlichster Herkunft exprimieren vermehrt polySia. Dies verbessert das Tumorstadium und bedingt dadurch eine schlechte Prognose für Krebspatienten. Allerdings wird die verstärkte polySia-Expression inzwischen auch als potentiell Ziel für therapeutische Ansätze verfolgt (Übersichtsartikel: Bull et al., 2014).

Im Vertebratengehirn sind neben NCAM1 auch andere Glykoproteine als Akzeptoren von polySia beschrieben. Eines der Aktuellsten ist das in der Maus beschriebene synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM1 (Galuska et al., 2010). Zudem trägt die  $\alpha$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals der Ratte polySia (Zuber et al., 1992). In humaner Muttermilch kommt polySia gebunden an CD36 vor (Yabe et al., 2003). Außerdem tragen humane Dendriten polySia assoziiert an Neuropilin-2 (Curreli et al., 2007). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die polyST St8SialII und St8SialIV über Autopolysialylierung selbst Akzeptoren von polySia sind (Mühlenhoff et al., 1996; Close & Colley, 1998).

### 2.2.3 Wechselwirkungen von NCAM1

NCAM1 moduliert die Adhäsion und die Navigation von Neuronen über homophile und heterophile Wechselwirkungen. Diese Interaktionen können sowohl zwischen zwei Molekülen innerhalb einer Membran (*cis*) als auch zwischen Molekülen zweier angrenzender Membranen (*trans*) stattfinden (Übersichtsartikel: Soroka et al., 2010; Nielsen et al., 2010).

**Modelle zu homophilen Wechselwirkungen der extrazellulären Domänen von NCAM1** Der Mechanismus der homophilen Interaktion wird seit Jahren kontrovers diskutiert (Übersichtsartikel: Soroka et al., 2010; Walmod et al., 2004). Gängige Vorstellungen sind eine antiparallele Dimerisierung aller fünf Ig-Domänen (Ranheim et al., 1996), eine antiparallele Bindung der dritten Ig-Domänen (Rao et al., 1994) sowie ein Bindemechanismus der ersten an die zweite Ig-Domäne paralleler und antiparalleler Moleküle (Kiselyov et al., 1997; Kasper et al., 2000; Soroka et al., 2003).

Für *trans*-Interaktionen sind außerdem eindimensionale, reißverschlussartige (*Zipper*-) Mechanismen die sogenannten *compact*- und *flat-Zipper* beschrieben worden (Soroka et al., 2003). Diese können zusätzlich miteinander zu einem zweidimensionalen *Zipper* kombiniert werden (Kiselyov et al., 2005). Um die *Zipper* auszubilden, ist zuvor eine kreuzförmige *cis*-Dimerisierung der Ig1 an die Ig2 zweier paralleler NCAM1 Moleküle in *cis* nötig (Kasper et al., 2000; Soroka et al., 2003). Der *compact-Zipper* wird zwischen der ersten Ig-Domäne von Molekül A und der dritten Ig-Domäne von Molekül B, beziehungsweise zusätzlich zwischen den beiden zweiten Ig-Domänen gebildet. Dieser *trans*-Mechanismus erlaubt größere Distanzen zwischen den Zellen. Im *flat-Zipper* bindet die zweite Ig-Domäne von Molekül A an die dritte Ig-Domäne des gegenüberliegenden Moleküls B. Die Kombination beider *Zipper* führt zur Formation des sehr komprimierten, zweidimensionalen *Zippers* (Kiselyov et al., 2005). Ein interessanter Aspekt dieses Bindemodells ist, dass vermutlich polysialyliertes NCAM1 an der zweidimensionalen Formation nicht teilnehmen kann, da hier die Moleküle zu dicht gepackt sind und polySia zu viel Platz einnehmen würde. So wird vermutet, dass in Abwesenheit von polySia, NCAM1-Moleküle starke zweidimensionale *Zipper* ausbilden, die zur Zelladhäsion führen, wohingegen in Anwesenheit von polySia die schwächeren eindimensionalen *compact*- oder *flat-Zipper* ausgebildet werden und so Interaktionen von NCAM1 weiterhin möglich sein könnten (Soroka et al., 2003; Kiselyov et al., 2005).

#### 2.2.4 Heterophile Interaktionspartner von NCAM1

Neben den klassischen homophilen Interaktionen wurden über die Jahre auch viele heterophile Interaktionspartner von NCAM1 identifiziert. Hierbei dient NCAM1 sowohl als Ligand als auch als Rezeptor (Nielsen et al., 2010).

Die Förderung der Neuritogenese kann nicht allein durch die adhäsions-vermittelnde Funktion von NCAM1 erklärt werden. Vielmehr ist diese Funktion den NCAM1 vermittelten Signaltransduktionskaskaden zuzuschreiben (Aonurm-Helm et al., 2010; Übersichtsartikel: Walsh et al., 1997). Ein wichtiger Interaktionspartner von NCAM1 und polySia-NCAM1 ist der *fibroblast growth factor* (FGF)-Rezeptor1 (E. J. Williams et al., 1994; Kiselyov et al., 2005). Die Ausbildung von Neuriten kann durch die Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen unabhängig vom FGF-Liganden reguliert werden (E. J. Williams et al., 1994). Die extrazelluläre Domäne von NCAM1 tritt hierbei direkt in Wechselwirkung mit dem FGF-Rezeptor und erhöht die Zell-Matrix-Adhäsion. Der Verlust von NCAM1 spielt dadurch vermutlich auch eine Rolle in der Bildung von Metastasen (Cavallaro et al., 2001). NCAM1 kann zelluläre Antworten, wie Signaltransduktion und Zellteilung, die durch FGF vermittelt werden, unterdrücken und ist somit ein wichtiger regulierender Faktor der FGF/FGF-Rezeptor Interaktion (Galve-Roperh et al., 2013). Innerhalb der extrazellulären Domäne des FGF-Rezeptors konnte eine kurze Aminosäuresequenz (*CAM homology domain*) identifiziert werden, die den direkten Kontakt zu NCAM1 herstellen kann. Alternatives Spleißen der VASE Exons von NCAM1 reguliert diese Bindung (E. J. Williams et al., 1994).

Außerdem können NCAM1 und polySia-NCAM1 mit verschiedenen Neurotrophen und deren Rezeptoren in Wechselwirkung treten. Beispielsweise wurde gezeigt, dass BDNF und sein Rezeptor (Vutskits et al., 2001), der *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) und dessen GDNF-Rezeptor $\alpha$  (Paratcha et al., 2003) sowie der *platelet-derived growth factor* (PDGF) (H. Zhang et al., 2004), mit NCAM1 interagieren.

NCAM1 geht auch heterophile Interaktionen mit anderen Mitgliedern der Ig-Superfamilie ein. Unter anderem hat NCAM1 eine große Affinität zu dem *transient axonal glycoprotein-1* (TAG-1) (Milev et al., 1996). Die biologische Relevanz dieses Zusammenspiels ist bisher noch nicht bekannt. Ein weiterer Interaktionspartner der Ig-Superfamilie ist der synergistische *cis*-Bindepertner L1-*cell adhesion molecule* (L1CAM) (Horstkorte et al., 1993; Kadmon et al., 1990). Die Interaktion von NCAM1 und L1CAM unterstützt die L1CAM vermittelte Signaltransduktion (Kadmon et al., 1990). Die Bindung wird über eine Lektin-ähnliche Sequenz der vierten Ig-Domäne von NCAM1 vollzogen. Sie induziert damit die Phosphorylierung von L1CAM und fördert damit das Neuritenwachstum (Horstkorte et al., 1993; Heiland et al., 1998).

NCAM1 interagiert außerdem mit dem Prion-Protein PrP (protease resistant protein) (Hu et al., 2007). Diese Interaktion hat eine wichtige Funktion in der Förderung von Neuritenwachstum. Das GPI-verankerte Protein ist hauptsächlich in *lipid rafts* lokalisiert. Es wird davon ausgegangen, dass die Interaktion zwischen NCAM1 und PrP nötig ist, um NCAM1 in *lipid rafts* zu organisieren und dadurch Fyn-abhängiges Neuritenwachstum zu initiieren (Santuccione et al., 2005).

Laminin ist eine der Hauptkomponenten der extrazellulären Matrix. Es wurde gezeigt, dass es Zellmigration und Auswachsen von Neuriten unterstützt (Luckenbill-Edds, 1997; Z. Chen et al., 2013). Strukturanalysen von NCAM1 gaben den Hinweis darauf, dass es eine direkte Interaktion zwischen den beiden Proteinen geben könnte (Cole & Schachner, 1987).

Indem NCAM1 über Heparin an das Strukturprotein Kollagen bindet, wird außerdem die Zell-Matrix-Adhäsion erhöht (Kiselyov et al., 1997).

### 2.2.5 Funktionen von NCAM1

NCAM1 wird mit mannigfaltigen, teils konträren zellulären Prozessen in Verbindung gebracht. Zellmigration, Zelladhäsion, Neuritenwachstum, Axonfaszikulation und -wegfindung sind nur einige Beispiele, in die NCAM1 durch Aktivierung unterschiedlichster Signaltransduktionsprozesse involviert ist. Diese Prozesse sind sowohl bedeutsam in der Entwicklung des Nervensystems als auch in der synaptischen Plastizität verbunden mit Lern- und Erinnerungsprozessen (Übersichtsartikel: Aplin et al., 1998; Maness & Schachner, 2007; Homrich et al., 2016).

Abhängig von der NCAM1-Isoform, vermitteln diese teils unterschiedliche Prozesse. NCAM140 kann beispielsweise Neuritenwachstum über die Aktivierung zweier verschiedener Signalkaskaden steuern. Zum einen kann es durch *clustering* die Rezeptortyrosinkinase Fyn aktivieren, was wiederum den MAP-Kinase Signalweg aktiviert (Kolkova et al., 2000). Unabhängig davon kann Neuritogenese auch über ein Co-Signaling zwischen NCAM140 und dem FGF-Rezeptor reguliert werden (Niethammer et al., 2002).

Entgegengesetzt dazu wird NCAM180 hauptsächlich als Vermittler von Zell-Zell-Kontakten beschrieben und vermittelt den Kontakt zum Zytoskelett indem der zusätzliche 40kDa große intrazelluläre Bereich mit dem Aktin-bindenden Protein Spektrin interagiert (Pollerberg et al., 1987). Die intrazellulären Domänen beider Isoformen können außerdem an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, sowie an  $\alpha$ -Actinin1 binden und induzieren so auf unterschiedliche Weise Neuritenwachstum über unterschiedliche Signalwege (Büttner et al., 2003).

NCAM140 konnte außerdem eine Funktion in der Reifung von synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden (Polo-Parada et al., 2004), wohingegen Neurotransmission durch die Interaktion des PDZ-ähnlichen Motivs (KENESKA) der NCAM180 Isoform für die Aktivierung der Myosin light chain kinase (MLCK) notwendig ist (Polo-Parada et al., 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass NCAM180 mit dem Linker-Protein Spektrin interagieren kann und maßgeblich an der Stabilisierung von Zellkontakten beteiligt ist (Pollerberg et al., 1987). NCAM120 wird vornehmlich auf Gliazellen exprimiert (Homrich et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass es hauptsächlich an *lipid rafts* assoziiert vorliegt und es hier zu einer indirekten Bindung an Spektrin über Fettsäuren kommt. Die daraus resultierende Funktion konnte noch nicht gezeigt werden (Leshchyn'ska et al., 2003).

Eine Reduktion von polySia-NCAM1 im Hippocampus führt zu einer verringerten synaptischen Plastizität und wird mit neuronalen Erkrankungen wie Schizophrenie in Zusammenhang gebracht (Barbeau et al., 1995).

Die Bedeutung von NCAM1 auf Entwicklung und Funktion des Nervensystems wurde an NCAM1-defizienten Mäusen betrachtet. Die NCAM1-Knockout-Mäuse sind vital und lebensfähig. Sie haben ein um etwa 10 % verringertes Hirnvolumen und einen um 40 % verkleinerten olfaktorischen Bulbus. Sie haben Defekte in der Neurotransmission und ein vermindertes Lern- und Erinnerungsvermögen (Polo-Parada et al., 2004; Cremer et al., 1994). Diese eher subtilen Phänotypen können dadurch erklärt werden, dass es homologe Moleküle gibt, die die Funktion von NCAM1 in Teilen übernehmen können und so schwere Defekte ausbleiben (Alenius & Böhm, 1997; Aonurm-Helm et al., 2010).

### 2.2.6 Ncam1a und Ncam1b: NCAM1-Paraloge im Zebrafisch

Eine Teleostei-spezifische Genomduplikation hat dazu geführt, dass die meisten Gene des Zebrafischs im Duplikat vorliegen. Nach einer Genomduplikation sind die Tochter-Gene (Paraloge) anfangs vollkommen identisch. Sie konnten dann als *dosage-sensitive*-Gene etabliert werden. Das bedeutet, dass die Expressionslevel an das Vorhandensein zweier Paraloge angepasst und damit reduziert wurden. Im Laufe der weiteren Entwicklung können die Paraloge jedoch auch unterschiedliche Schicksale annehmen. Ist die Mutation eines der Paraloge zu drastisch, kann dies zum Expressionsverlust und der so genannten non-Funktionalisierung führen, sodass es schlussendlich zum Verlust des einen Tochter-Paralogs kommt. Mit dem Begriff Neofunktionalisierung wird es bezeichnet, wenn eines der Paraloge eine komplett neue Funktion erlangte, die sich für den Organismus als Vorteil herausstellte. Das andere Paralog behält die ursprüngliche Funktion. Zu einer Subfunktionalisierung kommt es, wenn beide Paraloge sich gleichermaßen weiterentwickelten und Teilfunktionen des ursprünglichen Gens behielten (Übersichtsartikel: Glasauer & Neuhaus, 2014).

Das Maus NCAM1-Gen wird im Zebrafisch durch zwei Paraloge repräsentiert. Die Aminosäuresequenzen von Ncam1a und Ncam1b sind zu etwa 62 % homolog mit Maus NCAM1. Die Aminosäuresequenzen zwischen den Paralogen sind zu 66 % homolog und unterscheiden sich hauptsächlich in der intrazellulären Domäne (Mizuno et al., 2001) (Abb. 3). Sequenzanalysen, Expressionsstudien und Funktionsanalysen deuten darauf hin, dass es zu einer Subfunktionalisierung von Ncam1a und Ncam1b gekommen ist (Mizuno et al., 2001; Langhauser et al., 2012).

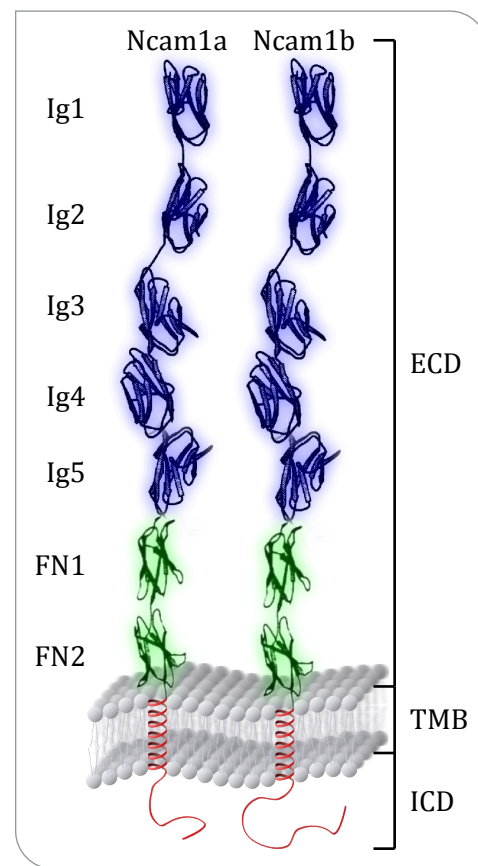


Abbildung 3: Aufbau der Ncam-Paraloge im Zebrafisch. Durch eine zusätzliche Genomduplikation der Teleostei liegen die meisten Gene des Zebrafischs im Duplikat vor. Das Maus-Ortholog wird im Zebrafisch durch die zwei Paraloge Ncam1a und Ncam1b repräsentiert. Sie haben eine etwa 62 %ige Homologie mit dem Maus-Ortholog und die Paraloge sind untereinander zu 66 % Homolog. Die unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer intrazellulären Domäne voneinander. Die intrazelluläre Domäne von Ncam1b ist länger als die von Ncam1a. Abkürzungen: Ig: Ig-Domäne, FN: FN-III-Domäne, ECD: extrazelluläre Domäne, TMB: Transmembrandomäne, ICD: intrazelluläre Domäne. Struktur der ECD aus Nelson et al. (1995).

Ncam1a und Ncam1b haben unterschiedliche Expressionsmuster, die sich nur in Teilen überschneiden. Beide Ncam1-Paraloge können post-translational mit polySia modifiziert werden. polySia ist nicht immer zu gleichen Teilen auf beide Paraloge verteilt. Funktionelle Studien haben ergeben, dass es entscheidende Unterschiede zwischen den Paralogen gibt. Diese beziehen sich insbesondere auf die posteriore Kommissur, das Seitenlinienorgan sowie die Motoraxone (Langhauser et al., 2012; Heiny, 2012; laufende Doktorarbeit R. Dries).

Die posteriore Kommissur bildet sich aus Neuronenpopulationen im Bereich von Vorder- und Mittelhirn und verbindet die beiden Gehirnhemisphären miteinander (Chitnis & Kuwada, 1990). Immunfärbungen mit für Ncam1a und Ncam1b spezifischen Antikörpern in 36 hpf alten Embryonen im Bereich um die posteriore Kommissur zeigten deutliche Expressionsunterschiede. Ncam1a wird hauptsächlich auf den Axonen der posterioren Kommissur exprimiert und nur sehr schwach auf den darunterliegenden Zellkörpern/Geweben. Ncam1b wird nicht auf der posterioren Kommissur, allerdings auf den darunterliegenden Zellkörpern exprimiert. Die Expression von polySia gleicht der von Ncam1a und ist an der posterioren Kommissur hauptsächlich auf den Axonen lokalisierbar (Langhauser et al., 2012). Diese unterschiedlichen Expressionsmuster legen nahe, dass hier paralogspezifische Funktionen vorliegen. Nach einem Morpholino-Knockdown konnten unterschiedliche Phänotypen im Bereich der posterioren Kommissur beobachtet werden. Durch einen *ncam1a*- oder *st8siall*-Morpholino-Knockdown kommt es hauptsächlich zur Defaszikulation der Kommissur, demgegenüber steht der *ncam1b*-Knockdown, der zu einem Wachstumsstopp der Axone führt (Marx et al., 2001; Langhauser et al., 2012).

Das Seitenlinienorgan dient Fischen der sensorischen Verarbeitung von Wasserbewegung (Chitnis et al., 2012). Auch hier haben Ncam1a und Ncam1b voneinander abweichende Funktionen, da es neben dem unterschiedlichen Expressionsmuster außerdem auch zu unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen nach einem Morpholino-Knockdown kommt (Heiny, 2012; laufende Doktorarbeit R. Dries).

Die Studie von Langhauser (2012) ergibt erste Hinweise darauf, dass sich eine Subfunktionalisierung von Ncam1a und Ncam1b auch anhand der Motoneurone im Rückenmark nachweisen lässt. Beide Paraloge werden in diesen Zellen exprimiert. Ihr Morpholino-Knockdown hat aber unterschiedliche Effekte.

### 2.3 Tag-1: das CNTN2-Ortholog im Zebrafisch

TAG-1 ist Mitglied der Ig-Superfamilie. Es gehört in die Familie der Contactine. TAG-1 ist mit etwa 135 kDa ein verhältnismäßig großes Protein der Ig-Superfamilie. Die extrazelluläre Domäne von TAG-1 besteht aus sechs Ig-Domänen und vier FN-III-Domänen. Mit einem GPI-Anker ist TAG-1 mit der Zellmembran verankert (Zuellig et al., 1992) (Abb. 4). Zusätzlich kann eine lösliche Isoform gebildet werden (Furley et al., 1990). TAG-1 wird auf Axonen von sensorischen und motorischen Nerven sowie auf Schwannschen Zellen exprimiert (Karagogeos et al., 1991; Traka et al., 2002). Das transient exprimierte Protein wird hauptsächlich auf Axonen des sich entwickelnden Nervensystems und vermehrt auf migrierenden Wachstumskegeln gebildet (Denaxa et al., 2001). Dies lässt darauf schließen, dass es an Prozessen wie der Bildung, der Wegfindung und der Faszikulation von Axonen beteiligt ist. Es geht dabei sowohl homophile als auch heterophile Mechanismen ein (Wolman et al., 2008; Baeriswyl & Stoeckli, 2008). Ein bereits bekannter Interaktionspartner aus dem Säugetiersystem ist NCAM1 (Milev et al., 1996). Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass TAG-1 mit L1CAM1 interagieren kann (Pavlou et al., 2002). Für TAG-1 wurde gezeigt, dass es Neuritenwachstum fördert. Dafür muss es in einem Ko-Rezeptorkomplex mit L1CAM und Integrin interagieren (Felsenfeld et al., 1994).

Neben Orthologen wie beispielsweise Axonin-1 aus dem Huhn, gibt es auch ein Zebrafisch-Ortholog genannt Contactin-2, Cntn2 oder Tag-1. Im Zebrafisch hat Tag-1, als eines der Ausnahmen, kein weiteres Paralog (Warren et al., 1999). Im adulten Zebrafisch ist Tag-1 an der Regeneration des Rückenmarks beteiligt (Lin et al., 2012).

### 2.4 Neurolin: das ALCAM-Ortholog des Zebrafischs

Ein weiteres neuronales Zellerkennungsmolekül aus der Ig-Superfamilie ist Neurolin. Es wurde im Goldfisch als Glykoprotein auswachsender retinaler Axone identifiziert und spielt dort eine Rolle während der axonalen Regeneration (Paschke et al., 1992). Neurolin aus Goldfisch oder Zebrafisch hat ein Molekulargewicht von 87 kDa und beide zeigen eine 51 % Homologie mit dem Hühner Ortholog DM-GRASP/SC-1/BEN (Laessing et al., 1994). Es ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie. Die extrazelluläre Domäne von Neurolin besteht aus fünf Ig-Domänen gefolgt von einer transmembran und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Abb. 5).

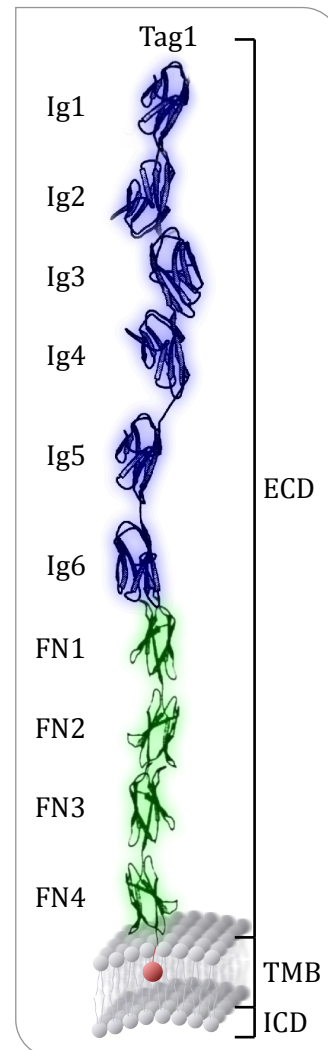


Abbildung 4: Struktur des Tag-1-Orthologs im Zebrafisch. Tag-1 ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie und wird dort zu den Contactinen gezählt. Das große Glykoprotein hat sechs Ig-Domänen und vier FN-III-Domäne. Es wird über einen GPI-Anker mit der Membran assoziiert. Abkürzungen: Ig: Ig-Domäne, FN: FN-III-Domäne, ECD: extrazelluläre Domäne, TMB: Transmembrandomäne, ICD: intrazelluläre Domäne. Struktur der ECD aus Nelson et al. (1995).

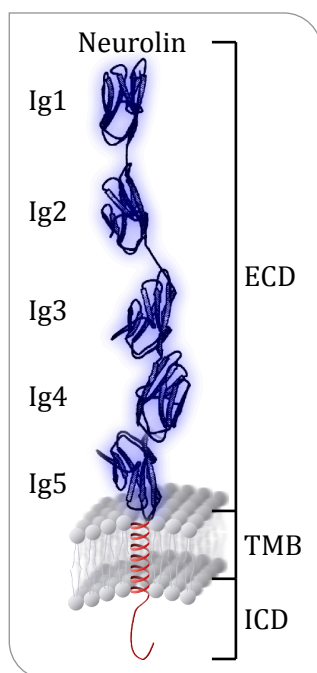


Abbildung 5: Struktur des Neurolin-Orthologs im Zebrafisch. Neurolin besteht aus fünf Ig-Domänen auf der extrazellulären Seite. Es hat eine transmembran Domäne und eine kurze intrazelluläre Domäne. Abkürzungen: Ig: Ig-Domäne, FN: FN-III-Domäne, ECD: extrazelluläre Domäne, TMB: Transmembrandomäne, ICD: intrazelluläre Domäne. Struktur der ECD aus Nelson et al. (1995).

Das humane Ortholog ist *activated leukocyte-cell adhesion molecule* (ALCAM), das nach seiner Expression auf aktivierten Leukozyten benannt wurde. Es hat viele Funktionen im sich entwickelnden Nervensystem (Bowen et al., 1995). Das Hühner Ortholog DM-GRASP fördert beispielsweise das Wachstum und die Faszikulation von Axonen (Burns et al., 1991; Pollerberg & Mack, 1994). Über homophile Wechselwirkungen kann Neurolin wachstumsfördernden Einfluss auf Axone retinaler Ganglienzellen nehmen (Tanaka et al., 1991; El-Deeb et al., 1992; DeBernardo & Chang, 1995). Neben homophilen sind auch heterophile Wechselwirkungen mit dem *neuronal cell adhesion molecule* (NgCAM) (DeBernardo & Chang, 1996) bekannt. Heterophile Interaktionen mit NCAM1 wurden noch nicht beschrieben.

Im Zebrafisch gibt es zwei Paraloge, Neurolin-a und Neurolin-b (Diekmann & Stuermer, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Funktion von Neurolin-a eingegangen. Im Folgenden wird nur noch von 'Neurolin' gesprochen. Im Zebrafisch wird es während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems auf retinalen Ganglienzellen und sekundären Motoneuronen exprimiert. Es hat entscheidenden Einfluss auf Projektion und Faszikulation beider Neuronentypen (Ott et al., 1998; Ott et al., 2001).

## 2.5 Spinale Motoneurone des Zebrafischs

Die Entwicklung und die Ausbildung komplexer Strukturen wie etwa des Nervensystems, unterliegen vielschichtigen Mechanismen. Die spinalen Motoneurone des Zebrafischs sind eine ideale Zellpopulation zur Untersuchung der Funktionen von Ncam1a und Ncam1b, da sie seit mehr als drei Jahrzehnten als exemplarisches Modell dienen, um motoneuronales Wachstum und axonale Zielfindung *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen (P. Z. Myers, 1985; Kuwada, 1986; Eisen et al., 1986; P. Z. Myers et al., 1986; Z. Chen et al., 2013; Andersen, 2001; Übersichtsartikel: Eisen, 1994). Die Muskulatur ist segmental aufgebaut und die Neurone projizieren entlang stereotyper Wege. Sie haben, verglichen mit höheren Vertebraten, weniger Neurone deren Projektionsmuster zudem sehr gut beschrieben sind (Übersichtsartikel: Beattie, 2000). Weiter zeichnen sie sich durch ein großes Wachstumspotential in der Zellkultur aus (Z. Chen et al., 2013).

Die Determination der Motoneurone beginnt zum Ende der Gastrulation (9-10 hpf), etwa acht Stunden bevor sie mit der Axogenese beginnen (Myers et al., 1986). Sie werden durch spezifische Gradienten im sich entwickelnden Neuralrohr aus Motoneuronen-Vorläuferzellen gebildet, wobei unterschiedliche Mengen an Transkriptionsfaktoren deren Identität wiedergeben (Jessell, 2000). Innerhalb der Motoneuronen-Vorläuferdomäne werden motoneuronen-spezifische Transkriptionsfaktoren wie Hb9 (Mnx1) exprimiert (Ferrier et al., 2001). In der transgenen Zebrafischlinie Tg(hb9::GFP) exprimieren die Motoneurone GFP unter dem spezifischen Promotor hb9. Tg(hb9::GFP) wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Motoneurone spezifisch



zu visualisieren. Auch 10 Tage nach der Befruchtung *days post fertilization* (dpf) exprimieren die Larven noch GFP.

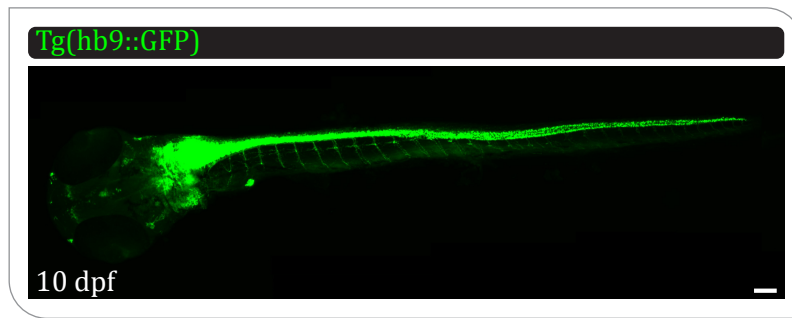


Abbildung 6: Tg(hb9::GFP): Expression von GFP unter dem motoneuronen-spezifischen Promotor hb9. Die Abbildung zeigt die Konfokalaufnahme einer 10 Tage alte Zebrafischlarve, cranial ist links positioniert. GFP exprimierende Motoneurone projizieren ihre Axone in einem stereotypen Muster in die Somiten. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Nachdem die Motoneurone differenziert sind, projizieren die Axone in die Somiten. Ihre Zellkörper befinden sich geschützt im Rückenmark und ihre langen Axone innervieren die Muskulatur. Motoneurone als efferente Nervenzellen steuern die Aktivität der Muskulatur. Im Entwicklungsprozess navigieren auswachsende Axone auf festgelegten Wegen in ihre entsprechende Zielregion, wobei sie mit unterschiedlichen Zelltypen interagieren (Übersichtsartikel: Eisen, 1998).

In Invertebraten und Vertebraten interagieren primäre Motoneurone mit neuronalen und nicht-neuronalen Zellen und finden so zu ihrer Zielregion (Bate, 1976; Singer et al., 1979). Primäre Motoneurone legen dabei als Pioniere den Weg fest und sekundäre Motoneurone können ihnen folgen, wobei die primären Motoneurone die sekundären Motoneurone bei der korrekten Wegfindung unterstützen (Raper et al., 1983). Experimente, in denen primäre Motoneurone entfernt wurden zeigten aber, dass diese in der Zielfindung der sekundären Motoneurone nur bedingt notwendig sind (Pike & Eisen, 1990).

Alle Axone, die in einem Segment aus dem Rückenmark auswachsen folgen zunächst für ein kurzes Stück einem gemeinsamen Weg, dem *common path*, dann trennen sich die drei Projektionen nach einem kurzen Wachstumsstopp am horizontalen Myoseptum und entsenden ihre Wachstumskegel nach anterior, ventral oder dorsal. Dies spricht dafür, dass es generelle Wachstumssignale (*guidance cues*) gibt denen alle Motoneuronen folgen und außerdem spezielle Wachstumssignale, die spezifisch von den Subtypen erkannt werden. Neben attraktiven und repulsiven Signalen die über eine Distanz wirken, können auch neuronale Zellerkennungsmoleküle vom NCAM1-Typ die in der Umgebung oder auf der Zelloberfläche exprimiert werden, eine Rolle im axonalen Wachstum und der Wegfindung spielen (Rutishauser, 1985; Pollerberg et al., 2013; Eisen, 1994).

Die Zellkörper unterschiedlicher Motoneuronen-Subtypen sind in verschiedenen Positionen innerhalb der einzelnen Somiten-Segmente angesiedelt und topographisch organisiert. Sie können neben der rostrocaudalen Position der Zellkörper innerhalb des Neuralrohrs (Westerfield et al., 1986; P. Z. Myers et al., 1986) auch wegen des spezifischen Projektionsmusters (Westerfield et al., 1986; Eisen et al., 1986) und bereits vor der Axogenese aufgrund unterschiedlicher Membranpotentiale (Moreno & Ribera, 2009) unterschieden werden.

Entsprechend ihrer Zugehörigkeit projizieren sie in unterschiedliche Bereiche der Muskulatur (Eisen et al., 1986). Wird deren Position durch eine Transplantation vor der Axogenese verändert, projizieren die Transplantate in Somitenbereiche, die durch die Position des Zellkörpers vorgegeben ist (Tsuchida et al., 1994).

Es gibt drei primäre Motoneurone, die nach der Lage ihrer Somata innerhalb des Neuralrohrs benannt sind (Abb. 7; Eisen et al., 1986). Primäre Motoneurone, deren Zellkörper am weitesten caudal liegen, werden *caudal primary neuron* (CaP) genannt. Die Zellkörper der rostralen primäre Motoneurone sind sehr weit rostral positioniert (*rostral primary neuron* (RoP)). In der Mitte dieser



beiden Subtypen liegen die Zellkörper der *middle primary neuron* (MiP) (Eisen et al., 1986; P. Z. Myers et al., 1986; Westerfield et al., 1986). Jedes Hemisegment wird von allen drei Subtypen innerviert. Die Zellkörper befinden sich relativ weit dorsal innerhalb des Neuralrohrs. Sie zeichnen sich außerdem durch große Durchmesser von Zellkörpern (etwa 11  $\mu\text{m}$ ) und Axonen (etwa 2  $\mu\text{m}$ ) aus (P. Z. Myers, 1985). Sie migrieren mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von etwa 7  $\mu\text{m}/\text{Stunde}$  (P. Z. Myers et al., 1986).

Die primären Motoneurone projizieren in determinierter Reihenfolge und einem genauen Muster in die Hemisegmente (Eisen et al., 1986). Alle drei Subtypen wachsen zunächst nach ventral entlang des *common path*, bis sie an eine wichtige Landmarke, dem horizontalen Myoseptum gelangen. Hier treffen sie eine Zelltyp-spezifische Entscheidung, von wo aus sie in die entsprechenden Bereiche der Myotome projizieren. CaP beginnen mit der Axogenese als erste der drei primären Motoneurone nach 18 hpf. Axone der CaP projizieren mittig und entlang der medialen Oberfläche der Myotome. Am horizontalen Myoseptum pausieren die Wachstumskegel für teilweise bis zu zwei Stunden und überwachsen anschließend das horizontale Myoseptum weiter ventraler Richtung. Nach 20 hpf folgen MiP und RoP Axone der Projektion der CaP. Beide pausieren am horizontalen Myoseptum, bevor sie zellspezifisch andere Wege selektionieren und somit andere Regionen des Myotoms innervieren. Axone der MiP entsenden nach 23 hpf einen zusätzlichen, nach dorsal gerichteten, Wachstumskegel. Die ventrale Kollaterale wird nach 25 hpf zurückgebildet, sodass zu diesem Zeitpunkt die dorsale Projektion des MiP abgeschlossen ist. Wachstumskegel der RoP projizieren hier lateral und wachsen in das horizontale Myoseptum zur lateralen Oberfläche des Muskelsegments. Weitere Studien haben gezeigt, dass die Wege der MiP und RoP nach Laserablation der CaP nicht beeinflusst werden. Der Wachstumskegel eines jeden primären Motoneurons verlässt das Neuralrohr autonom am richtigen Austrittspunkt und sie sind in der Lage den *common path* in Richtung des horizontalen Myoseptums zu projizieren. CaP projizieren darauf weiterhin entlang des stereotypen Weges nach ventral, MiP nach dorsal und RoP in lateraler Richtung (Eisen et al., 1989; Pike & Eisen, 1990).

Während alle Segmente von primären Motoneuronen innerviert werden, gibt es einen weiteren Subtyp, die nur in etwa der Hälfte aller Segmente vorkommen. Die Position der Zellkörper der *variable primary neuron* (VaP) innerhalb des Neuralrohrs kann sehr unterschiedlich sein, meistens befinden sie sich rostral oder caudal der CaP. Die Axogenese der VaP beginnt zeitgleich mit derer der CaP. Sie verzweigen sich in Bereiche, die nicht von den anderen drei primären Motoneuronen innerviert werden. VaP sterben noch innerhalb von 36 hpf ab (Eisen et al., 1990). Auch die Wegselektion der anderen primären Motoneuronen wird nicht durch An- oder Abwesenheit der VaP beeinflusst (Pike & Eisen, 1990).

Jedes Hemisegment wird außerdem durch eine Vielzahl sekundärer Motoneurone innerviert (Abb. fig:ModellMotoraxone; P. Z. Myers, 1985). Die Axogenese startet nach etwa 26 hpf, etwa sechs Stunden nach den primären Motoneuronen. Es entstehen etwa 20-30 sekundäre Motoneurone (Pike et al., 1992; Kimmel et al., 1994). Der Durchmesser der Zellkörper ( $6,7 \pm 1,0 \mu\text{m}$ ) und der Axone (0,5  $\mu\text{m}$ ) sind deutlich kleiner als derer der primären Motoneurone. Die Projektionswege von primären und sekundären Motoneuronen sind sehr ähnlich. Allerdings breiten sich die sekundären Motoneurone weniger stark innerhalb des Myotoms aus. Axonales Branching ist in sekundären Motoneuronen im Vergleich mit primären Motoneuronen deutlich reduziert und tritt kaum auf (P. Z. Myers et al., 1986; Eisen et al., 1986).

Es wurden Laserablationen der primären Motoneuronen durchgeführt, um eine Abhängigkeit der sekundären Motoneurone in der Wegfindung zu untersuchen. Ablation der CaP führt zu keiner morphologischen Veränderung der Neurone, die den Ventralnerv bilden und ausschließlich zu einer leicht verspäteten Ausbildung. Ablation der MiP verändert das Projektionsmuster der Neurone, die den Dorsalnerv bilden. Die Wachstumskegel projizieren auf stark veränderten Wegen und bilden aberrante synaptische Kontakte. Offensichtlich ist die Wegfindung zwischen den beiden Nerven sehr unterschiedlich organisiert (Pike et al., 1992).

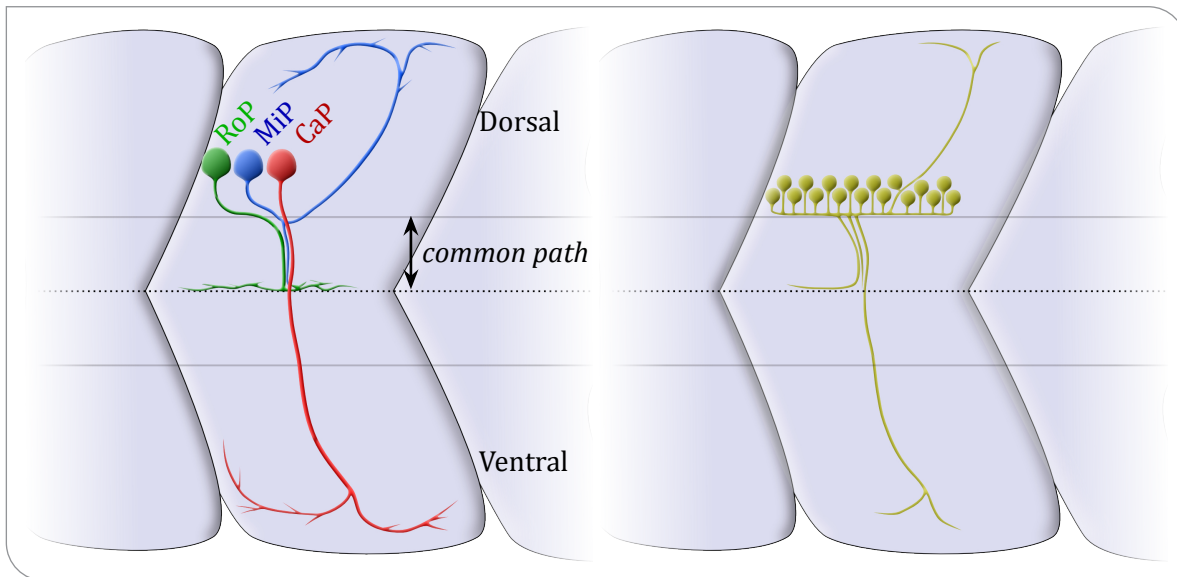


Abbildung 7: Projektionsmuster primärer und sekundärer Motoraxone im Zebrafisch. Links: die primären Motoneurone RoP, MiP und Cap projizieren ihre Axone aus dem Rückenmark. Diese wachsen zunächst entlang des *common path* und projizieren anschließend in die determinierten Regionen eines jeden Hemisegments. Rechts: Die Axone der sekundären Motoneurone folgen den Wegen der primären Motoraxone. Modell nach McWhorter et al. (2003).

## 2.6 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertation baut auf einer Publikation auf, die erste Hinweise auf eine funktionelle Divergenz der Ncam1-Paraloga im Nervensystem des Zebrafisch lieferte (Langhauser et al., 2012). Außerdem scheint die Polysialylierung ein modulatorischer Faktor beider Ncam1-Paraloga zu sein, auf den Bezug genommen werden sollte (Marx et al., 2001; Langhauser et al., 2012).

Unter Verwendung von *in situ* und *in vitro* Analysen sollten die molekularen Interaktionen der Zellerkennungsmoleküle Ncam1a und Ncam1b untersucht und ihre Funktionen in verschiedenen experimentellen Ansätzen miteinander verglichen werden. Weiterhin wurde beleuchtet, wie sich die Polysialylierung als modulatorischer Faktor auf diese Interaktionen und Funktionen auswirkt. Diese Fragestellungen wurden in spinalen Motoneuronen untersucht, deren Axone in einem charakteristischen repetitiven Muster aus dem Rückenmark in die Muskulatur projizieren.

Zuerst sollten die phänotypischen Veränderungen der Motoraxone dokumentiert und kategorisiert werden, die sich nach einem *ncam1a*-, *ncam1b*- oder *st8sialII*-Knockdown im Zebrafischembryo ergeben. *st8sialII* codiert für die Polysialyltransferase, die die Synthese der Polysialinsäure katalysiert.

Welche Protein/Protein-Wechselwirkungen den beobachteten Effekten zugrunde liegen, wurde anschließend mit Hilfe von rekombinant exprimiertem Ncam1a/b in *Bead Aggregations*- und *Zell-Overlay-Assays* untersucht. Dazu wurden zuerst die Gene isoliert und die Proteinexpression, -gewinnung und -aufreinigung erstmals etabliert. Tag-1 und Neurolin wurden als potenzielle heterophile Interaktionspartner aus der Ig-Superfamilie von neuronalen Erkennungsmolekülen in die Untersuchungen mit einbezogen. Die hierdurch identifizierten Wechselwirkungen wurden anschließend *in situ* getestet indem Fc-Fragment-gekoppelte Bindungsdomänen der Zellerkennungsmoleküle eingesetzt wurden, um die nativen Bindungsorte im Gewebe zu identifizieren.

Um die Wechselwirkungen von auf den Motoraxonen exprimiertem Ncam1a und Ncam1b unter definierten Bedingungen zu untersuchen, wurden abschließend Primärzellkulturen von Motoneuronen aus Rückenmarksexplantaten etabliert. In diesem Zellkultursystem wurde zuerst der Phänotyp nach Morpholino-Knockdown auf Laminin-Substraten charakterisiert. Für die funktionellen Analysen wurde anschließend das Auswuchsverhalten auf Ncam1a oder Ncam1b beschichteten Substraten untersucht.

### 3 Material & Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Puffer, Antibiotika und Kulturmedien

Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) mit höchstem analytischem Reinheitsgrad (p.a.) bezogen. Chemikalien anderer Hersteller sind Tab. 1 zu entnehmen. Als Lösemittel wurde hochreines Wasser einer Reinstwasser-Anlage von TKA entnommen und autoklaviert ( $\text{H}_2\text{O}^D$ ). Für Arbeiten mit RNA wurde dieses mit DEPC behandelt ( $\text{DEPC-H}_2\text{O}^D$ ).

Alle Puffer (Tab. 2) und Lösungen (Tab. 3) wurden autoklaviert, sterilfiltriert oder aus sterilen Stammlösungen angesetzt. Falls nicht anders angegeben, wurde als Lösungsmittel  $\text{H}_2\text{O}^D$  verwendet. Antibiotika wurden in Gebrauchsmengen eingefroren (Tab. 4). Kulturmedien wurden steril gekauft und verwendet oder aus sterilen Stammlösungen angesetzt (Tab. 5, Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8).

Tabelle 1: Chemikalien anderer Hersteller

| Chemikalie                                                 | Hersteller / Artikelnummer                      | Endkonzentration (Lösemittel) |
|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Bovine Growth Serum Supplemented Calf HyClone</i> (FCS) | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: SH30541.03 | 10 % (DMEM)                   |
| EDAC-HCl                                                   | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: E2247      | 8 µg/µl                       |
| Mowiol 4-88 [31 g/mol]                                     | Merck Millipore<br>Art-Nr.: 475904              | 20 % (PBS:Glycerin, 2:1)      |

Tabelle 2: Puffer

| Bezeichnung                                                             | Zusammensetzung                                                                                                                                            | Verwendung                                                          |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Blotpuffer                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 146,5 mM Glycin-HCl</li> <li>• 19,8 mM Tris</li> <li>• <math>\text{H}_2\text{O}</math>:Methanol (3:1)</li> </ul>  | Blotten von SDS-Gelen im Western Blot                               |
| <i>Deyolking</i> -Puffer                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 17,7 µl/ml 4 M NaCl</li> <li>• 0,55 µl/ml 1 M KCl</li> <li>• 1,2 µl/ml 1 M <math>\text{NaHCO}_3</math></li> </ul> | Mechanochemisches entdottern                                        |
| <i>Dulbecco's Phosphat Buffered Saline</i> (DPBS) w/o Calcium/Magnesium | PAN Biotech<br>Art-Nr.: P04-36500                                                                                                                          | Waschen von Zellen                                                  |
| Hi Trap Bindepuffer                                                     | • 20 mM PBS<br>pH 7                                                                                                                                        | Puffer zur Gewinnung rekombinanter Proteine aus Zellkulturüberstand |
| Hi Trap Elutionspuffer                                                  | • 0.1 M Glycin-HCl<br>pH 2,7                                                                                                                               |                                                                     |
| Hi Trap Neutralisationspuffer                                           | • 1 M Tris-HCl<br>pH 9,0                                                                                                                                   |                                                                     |
| Laemmli [10x]                                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 250 mM Tris</li> <li>• 192 mM Glycin</li> <li>• 1 % SDS (v/v)</li> </ul> pH 8,2                                   | Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE                                  |

Fortsetzung Tabelle 2

| Bezeichnung           | Zusammensetzung                                                                                                                                                                                                                                       | Verwendung                                         |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| MMR                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 100 mM NaCl</li> <li>• 2 mM KCl</li> <li>• 1 mM MgSO<sub>4</sub></li> <li>• 2 mM CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 5 mM HEPES</li> <li>• 0,1 mM EDTA</li> <li>• 1 % Penicillin-Steptomycin (v/v)</li> </ul> pH 7,8 | Dissektion von Rückenmarken                        |
| Phosphatpuffer [4x]   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x1 H<sub>2</sub>O</li> </ul> pH 7,4                                                                                                                                      | Immunfärbung von <i>Whole Mount</i> Embryonen      |
| Ringer [10x]          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 115 mM NaCl</li> <li>• 2,6 mM KCl</li> <li>• 2 mM CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 mM HEPES</li> </ul> pH 7,6                                                                                                  | Isotonische Lösung. Bestandteil Motoneuronenmedium |
| Sammelgelpuffer [4x]  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5 M Tris/HCl</li> <li>• 0,4 % SDS</li> </ul> pH 6,8                                                                                                                                                        | Bestandteil von Acrylamid-Sammelgelen              |
| SDS-Probenpuffer [3x] | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 187,5 mM Tris/HCl</li> <li>• 6 % SDS (v/v)</li> <li>• 30 % Saccharose (v/w)</li> <li>• 0,01 % Bromphenolblau (v/w)</li> <li>• 15 % β-Mercaptoethanol (v/v)</li> </ul> pH 6,8                                 | Probenpuffer für SDS-PAGE                          |
| TAE [10x]             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 40 mM Tris</li> <li>• 20 mM NaOAc</li> <li>• 1 mM EDTA</li> </ul> pH 8                                                                                                                                       | Elektrophorese-Puffer für Agarose-Gele             |
| Trenngelpuffer [4x]   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,5 M Tris/HCl</li> <li>• 0,4 % SDS</li> </ul> pH 8,8                                                                                                                                                        | Bestandteil von Acrylamid-Trenngelen               |

Tabelle 3: Lösungen

| Bezeichnung                      | Zusammensetzung                                                                                                                                                                                                                                                | Verwendung                                              |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Acrylamid-Sammelgel              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 % Acrylamid Rotiphorese Gel [30 %]</li> <li>• 15 % Sammelgelpuffer [4x]</li> <li>• 0,06 % APS [10 %]</li> <li>• 0,015 % TEMED</li> </ul>                                                                           | Protein Gelelektrophorese                               |
| Acrylamid-Trenngel [10 %]        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 33 % Acrylamid Rotiphorese Gel [30 %]</li> <li>• 25 % Trenngelpuffer [4x]</li> <li>• 0,1 % APS [10 %]</li> <li>• 0,006 % TEMED</li> </ul>                                                                             |                                                         |
| Agarose [1 %]                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 % Agarose Ultra-Qualität (w/v) in 1x TAE</li> </ul> <p>vor Gebrauch:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,005 % Roti GelStrain (Carl Roth Art-Nr.: 3865.1)</li> </ul>                                     | DNA/RNA Gelelektrophorese                               |
| ATV                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 136,8 mM NaCl</li> <li>• 5,4 mM KCl</li> <li>• 5,5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li> <li>• 0,6 mM EDTA</li> <li>• 0,05 % Trypsin (v/v)</li> <li>• 1 % Penicillin-Streptomycin (v/v)</li> </ul>                     | Dissoziation von Rückenmarken                           |
| BSA/DMSO/PBS                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 % BSA (w/v)</li> <li>• 1 % DMSO (v/v)</li> </ul> <p>in 1x PBS</p>                                                                                                                                                   | Antikörperinkubation<br><i>Whole Mount</i> Embryonen    |
| BSA [1 %]                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 % BSA (w/v)</li> </ul> <p>in 1x PBS</p>                                                                                                                                                                             | Antikörperinkubation Zellen                             |
| Blockierlösung                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 % Magermilchpulver (w/v)</li> </ul> <p>in 1x PBST</p>                                                                                                                                                               | Antikörperinkubation<br>Western Blot                    |
| Mowiol [20 %] mit n-Propylgallat | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 % Mowiol 4-88 (w/v)</li> <li>• 0,2 % Thimerosal (v/v)</li> </ul> <p>in 1x PBS:Glycerin (2:1)<br/>pH 8-8,5</p> <p>vor Gebrauch:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Spatelspitze n-Propylgallat</li> </ul> | Konservieren von <i>WholeMount</i> - und Zellpräparaten |
| Natriumborhydrid                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 µg/ml NaBH<sub>4</sub></li> </ul> <p>in 1x PBS</p>                                                                                                                                                                  | Reduktion von Doppelbindungen nach PFA Fixierung        |
| PBST (PBS-Tween20)               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,05 % Tween-20</li> </ul> <p>in 1x PBS<br/>pH 7,4</p>                                                                                                                                                                | Waschen von Western Blots                               |

Fortsetzung Tabelle 3

| Bezeichnung                   | Zusammensetzung                                                                                                                                    | Verwendung                                   |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| PBS-T (PBS-Triton X-100)      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS</li> <li>pH 7,4</li> </ul>                                                   | Permeabilisieren von Zellen                  |
| PFA [4 %]                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 % PFA in Phosphatpuffer oder PBS</li> <li>pH 7,4</li> </ul>                                             | Fixieren von <i>Whole Mounts</i> bzw. Zellen |
| PFA/GA/Saccharose             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 % PFA</li> <li>• 0,15 % Glutaraldehyd</li> <li>• 0,33 M Saccharose in PBS</li> <li>pH 7,4</li> </ul>    | Fixieren von Motoneuronen-Primärkulturen     |
| PTU [0,3 %]                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,2 mM PTU (Phenylthioharnstoff) Endkonzentration 0,003 % in E3</li> </ul>                                | verhindert Melanogenese ab 24 hpf            |
| Reinigungslösung Vivaf-low200 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,5 M NaOH</li> <li>• 0,5 mM NaOCl</li> </ul>                                                             | Reinigen der Tangentialflusskassette         |
| RotiBlue Färbelösung          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 % RotiBlue [5X] (Carl Roth, Art-Nr.: A1522)</li> <li>• 20 % Methanol</li> <li>• 60 % Wasser</li> </ul> | Coomassie-Färbung                            |

Tabelle 4: Antibiotika

| Handelsname                                  | Hersteller / Artikelnummer                    | Endkonzentration     |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------|
| Ampicillin Natriumsalz [100 mg/ml]           | Carl Roth<br>Art-Nr.: HP62.1                  | 100 µg/ml            |
| Kanamycin [50 mg/ml]                         | Carl Roth<br>Art-Nr.: T832.1                  | 50 mg/ml             |
| Penicillin-Streptomycin [10 U/ml - 10 mg/ml] | Sigma<br>Art-Nr.: P-0781 oder P4333           | 0,1 U/ml - 100 µg/ml |
| Geneticin [50 mg/ml]                         | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 11811023 | 750 µg/ml            |
| Zeocin [100 mg/ml]                           | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: R25001   | 750 µg/ml            |

Tabelle 5: Kulturmedien für Zelllinien

| Bezeichnung | Zusammensetzung                                                                                                                                                                                                                                                                         | Verwendung                                |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| DMEM-FCS    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM); PAN Biotech, Art-Nr.: P04-3590</li> <li>• 10 % FCS (v/v)</li> </ul> <p>optional:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zeocin [750 µg/ml]</li> <li>• Geneticin [750 µg/ml]</li> </ul> | Standard Kultur- und Selektionsmedium     |
| Opti-MEM    | Opti-MEM without phenol red (Thermo Fisher Scientific, Art-Nr.: 11058-021)                                                                                                                                                                                                              | Transfektionsmedium                       |
| Opti-CHO    | <ul style="list-style-type: none"> <li>• CD OptiCHO Medium (Thermo Fisher Scientific, Art-Nr.: 12681-011)</li> <li>• L-Glutamin [4 mM] (Thermo Fisher Scientific, Art-Nr.: 25030-024)</li> </ul>                                                                                        | Expressionsmedium Protein- und Serum-frei |

Tabelle 6: Kulturmedium für Primärzellen

| Bezeichnung                                | Zusammensetzung                                                                                                                                                                               | Verwendung                      |
|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Kulturmedium Motoneuronen Primärzellkultur | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 49 % L-15 (Thermo Fisher Scientific, Art-Nr.: 11415-049)</li> <li>• 49 % Ringer</li> <li>• 1 % FCS</li> <li>• 1 % Penicillin-Streptomycin</li> </ul> | modifiziert nach Andersen, 2001 |

Tabelle 7: Kulturmedium für Embryonen

| Bezeichnung   | Zusammensetzung                                                                                                                                                                                                                                                                             | Verwendung                                                                        |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Danieau [50x] | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 58 mM NaCl</li> <li>• 0,7 mM KCl</li> <li>• 0,4 mM MgSO<sub>4</sub></li> <li>• 0,6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></li> <li>• 5 mM HEPES</li> </ul> <p>zu 1x Danieau:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 % Methylenblau</li> </ul> | Bestandteil Morpholino Lösungen und Hälterung von Embryonen während der Injektion |
| E3 [60x]      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 294 mM NaCl</li> <li>• 10 mM KCl</li> <li>• 26,1 mM CaCl<sub>2</sub></li> <li>• 41 mM MgSO<sub>4</sub></li> </ul> <p>zu 1x E3:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,1 % Methylenblau</li> </ul>                                          | Aufzucht von Embryonen nach Haffter et al., 1996                                  |

Tabelle 8: Kulturmedien für Bakterien

| Bezeichnung                       | Zusammensetzung                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Verwendung                                             |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| LB-Miller<br>(Medium/Agarplatten) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 g/l Bacto-Trypton 1 %</li> <li>• 5 g/l Hefeextrakt 0,5 %</li> <li>• 10 g/l NaCl 1,5 %</li> </ul> <p>pH 7</p> <p>Plattenkulturen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• + 15 g/l Agar-Agar</li> </ul> <p>Optional:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampicillin (100 µg/ml)</li> <li>• Kanamycin (50 µg/ml)</li> </ul> | komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien    |
| SOC                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 % Trypton</li> <li>• 0,5 % Hefeextrakt</li> <li>• 10 mM NaCl</li> <li>• 2,5 mM KCl</li> <li>• 10 mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>• 10 mM MgSO<sub>4</sub></li> <li>• 20 mM Glukose</li> </ul> <p>pH 7</p>                                                                                                                                   | komplexes Nährmedium für Bakterien nach Transformation |

### 3.2 Nukleinsäuren

#### Nukleotide

Tabelle 9: Nukleotide für DNA Synthese

| Name                                           | Hersteller                     | Zusammensetzung / Endkonzentration |
|------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| peqGOLD dNTP-Mix<br>(10 mM zu gleichen Teilen) | Peqlab VWR<br>Art-Nr.: 20-3010 | je 0,2 mM dNTP                     |

#### Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firma eurofins genomics ohne Modifikationen bezogen (Tab. 10). Für die Erststrangsynthese aus mRNA wurden genspezifische Oligonukleotide verwendet. In der Tabelle sind diese nach dem folgenden Muster markiert: Schnittstellen (kursiv), Targetbinding (Unterstrichen; bei Schnittstellenprimern), Start/Stopcodon (fett).

Tabelle 10: Oligonukleotide - „Primer“

| Gen           | Bezeichnung            | Sequenz                                        |
|---------------|------------------------|------------------------------------------------|
| <i>ncam1a</i> | N1a_ECD_NheI_F         | 5' TAGGCTAGC <b>ATG</b> CTTCAAATACGGGATCTCA 3' |
|               | N1a-ECD-BamHI-R        | 5' TAAGGATCCACTTACCTGTTGGGATGGCGGTGGGTTCTG 3'  |
|               | N1a_CDS_BamHI_F        | 5' TAAGGATCC <b>ATG</b> CTTCAAATACGGGATCTCA 3' |
|               | N1a-CDS_w/oStop_XbaI_R | 5' TAATCTAGATGCTTTGCTCTCGTTGCCGT 3'            |
|               | 131f                   | TGGAGATGCTAAGGAAATAG                           |
|               | ncam1a 422f            | 5' CACCACCCCCAACTATCATC 3'                     |
|               | ncam1a 873r            | 5' CACTCCTCTCTCCAGCCTTG 3'                     |
|               | 1420f                  | 5' TTTGTGGTTCCGGGATGGCC 3'                     |



Fortsetzung Tabelle 10

| Gen                  | Bezeichnung            | Sequenz                                       |
|----------------------|------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>ncam1a</i>        | 1897f                  | 5' CCGCCAGGACTGGAAGCCTG 3'                    |
|                      | 2451f                  | 5' GGCGGAGGTGAAGACAGTCC 3'                    |
|                      | 2647r                  | 5' TTGTACTTTTTCATTTGTTAT 3'                   |
| <i>ncam1b</i>        | N1b_ECD_NheI_F         | 5' TGGGCTAGCATGTTTCCGACCAAGGCGAT 3'           |
|                      | N1b_ECD_BclI_R         | 5' ATGTGATCAACTTACCTGTTGTGGTGGCTGTGGGCTCTG 3' |
|                      | N1b_CDS_HindIII_F      | 5' TAAAAGCTTATGTTTCCGACCAAGGCGAT 3'           |
|                      | N1b-CDS_w/oStop_XhoI_R | 5' TAACTCGAGTGCTTTACTTTCAATGTTTG 3'           |
|                      | 211f                   | CGCAACGACGAGACGTCCTC                          |
|                      | 898f                   | 5' CTGGCCTGTGATCCTGATGGA 3'                   |
|                      | 1040r                  | 5' CCCTCGTCCAGCTTTGTCACATC 3'                 |
|                      | 1480f                  | 5' AACCCGGCCAACATCAGCTG 3'                    |
|                      | 2035f                  | 5' GTGGCAGAGAACCAACAGGGC 3'                   |
|                      | 2535f                  | 5' CAACCCAAAGGCAATTCTCTC 3'                   |
|                      | 3306r                  | 5' AGAGTTTCTACAAGAGCATt 3'                    |
|                      | ncam1b_Stop_R          | 5' TCATGCTTTACTTTCAATGT 3'                    |
| <i>tag-1</i>         | ZF_cntn2_#2_F          | 5' ATGAGGATGAGGATTCTGTTG 3'                   |
|                      | cntn2_groß_Rev         | 5' TCACAGTCCTGATGAGCCAATGAG 3'                |
|                      | c2_ECD_NheI_F          | 5' TAAGCTAGCATGAGGATGAGGATTCTGTT 3'           |
|                      | cntn2_ECD_BamHI_R      | 5' TAAGGATCCACTTACCTGTGTTCTGGACCATCATTCCAG 3' |
|                      | cntn2_CDS_HindIII_F    | 5' TAAAAGCTTATGAGGATGAGGATTCTGTT 3'           |
|                      | cntn2-CDSw/oStop_Xba_R | 5' TAATCTAGACAGTCCTGATGAGCCAATGAG 3'          |
|                      | ZF_cntn2_R_519b        | 5' GAAGTTAGGGAACCTCGTTGA 3'                   |
|                      | ZF_cntn2_R_1019b       | 5' TCCACCTCAGAGTCACTCAT 3'                    |
|                      | ZF_cntn2_R_1519b       | 5' TGACAGACAGGTGTCCAGTG 3'                    |
|                      | ZF_cntn2_R_2015b       | 5' CACACGTGCAGATTCAGCAT 3'                    |
|                      | cntn2_R_Seq_2519b      | 5' AGGTGTTGAATGGGCTCCCA 3'                    |
| <i>neurolin</i>      | ZF_alcamA_F            | 5' ATGCATTTCGGTTATCTGC 3'                     |
|                      | ZF_alcamA_R            | 5' GGCTCTCTCCACTCTTAGACATC 3'                 |
|                      | alcA_ECD_NheI_F        | 5' TAAGCTAGCATGCATTTCGGTTATCTGCCT 3'          |
|                      | alcA_ECD_BamHI_R       | 5' TTAGGATCCACTTACCTGTTTTGGCTTGGTCTGCGCCAT 3' |
|                      | alcA_CDS_HindIII_F     | 5' TAAAAGCTTATGCATTTCGGTTATCTGCCT 3'          |
|                      | alcA-CDSw/oStop_XbaI_R | 5' TAATCTAGAGACATCTGCTTTATGATTGT 3'           |
|                      | alcA-Fnest             | 5' CTCTATTGAGACTGTGCGCCG 3'                   |
|                      | alcA-Rnest             | 5' GATGTCTAAGAGTGGAGAGAGCC 3'                 |
|                      | alcamA_Seq455          | 5' AAATGGCAAACCTGACGCAGTTGGG 3'               |
|                      | alcamA_SeqR735         | 5' GGTGCTGGACAGACCGGTGA 3'                    |
|                      | alcamA_Seq1089         | 5' AAAGTGACGTGGACTAAGGATAAC 3'                |
|                      | alcamA_Seq1392         | 5' AAACGTACGGTGGTCCCGAGTAAG 3'                |
| <i>neurolin like</i> | ZF-alcamB_2_F          | 5' ATGCAGCGGACCGCCTTT 3'                      |
|                      | ZF_alcamB_2_R          | 5' CATTCAACAGCAACGGAGGT 3'                    |
|                      | alcB_ECD_NheI_F        | 5'TAAGCTAGCATGCATTTCGGTTATCTGCCT 3'           |
|                      | alcB_ECD_Bam_R         | 5' TAAGGATCCACTTACCTGTTGTGATCTTTCCATTACATG 3' |
|                      | alcB_CDS_KpnI_F        | 5' TAAGGTACCATGCAGCGGACCGCCTTTTTT 3'          |
|                      | alcB_CDS w/oStop_Xba_R | 5' TAATCTAGACACTCCAGCTTTTTTGGCTCT 3'          |

Fortsetzung Tabelle 10

| Gen                  | Bezeichnung    | Sequenz                             |
|----------------------|----------------|-------------------------------------|
| <i>neurolin like</i> | alcB_Fnest     | 5' GACGCTCGTTAGGCAAGGATA 3'         |
|                      | alcB_Rnest     | 5' TGACGCTCAAGGAGAAACGC 3'          |
|                      | alcamB_Seq419  | 5' ACCACTGCGATGGAAATCGG 3'          |
|                      | alcamB_SeqR494 | 5' TTGTTCTTGAACCACGTGAT 3'          |
|                      | alcamB_Seq1099 | 5' GTTGGCCCTCCTAAATTTGC 3'          |
|                      | alcamB_StopR   | 5' TAACACTTCAGCTTTTGGC 3'           |
| <i>Nadl1.1</i>       | nadl1.1-Fnest  | 5' ATGTTTGCTCCAGAATGC 3'            |
| <i>L1Cam1</i>        | nadl1.1-Rnest  | 5' <b>T</b> TAAATTAGGCCCCAGGATCC 3' |
| <i>Nadl1.2</i>       | nadl1.2-Fnest  | 5' ACAGTGCTCTTCTCTGAGTGGA 3'        |
| <i>L1Cam2</i>        | nadl1.2-Rnest  | 5' <b>C</b> TAGTCAAGGAGGGCGGCGGA 3' |
| <i>human</i>         | humIgG-Fc_F    | 5' GGAGGGAGGGTGTCTGCTGG 3'          |
| <i>IgGfc</i>         | humIgG-Fc_R    | 5' TGCAGAGAGAAGATTGGGAG 3'          |

### Morpholino-Nukleotide

Bei den verwendeten Morpholinos handelt es sich um translations-hemmende Morpholinos. Sie wurden über die Firma Gene Tools LLC, USA bezogen.

Tabelle 11: Morpholino-Nukleotide

| Bezeichnung                                    | Sequenz                          | Referenz                    | Endkonzentration |
|------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------|
| <i>standard control</i><br>Kontroll-Morpholino | 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'  | Gene Tools LLC              | 1ng/nl           |
| Ncam1a 5'UTR                                   | 5'-GTTTACTGTTTGTGTTTTGCCTTCCG-3' | (Langhauser et al., 2012)   | 1ng/nl           |
| Ncam1b Startcodon                              | 5'-AGATTATCGCCTTGGTCGGAACAT-3'   | (Langhauser et al., 2012)   | 1ng/nl           |
| Tag-1 (cntn2)                                  | 5'-CCACACCCAGACCAGACACTTATTT-3'  | (Liu & Halloran, 2005)      | 2 ng/nl          |
| Neurolin-a                                     | 5'-GTCCGGCGACAGTCTCAATAGAGAG-3'  | (Diekmann & Stuermer, 2009) | 1ng/nl           |
| St8SiaII Morpholino 1                          | 5'-AAAAGACATGACTTGACCGATGCG-3'   | (Marx et al., 2007)         | je 1 ng/nl       |
| St8SiaII Morpholino 2                          | 5'-AGAAATGTGTTCTCCTCTTTCACG-3'   |                             |                  |

### Ausgangsvektoren

Tabelle 12: Ausgangsvektoren

| Name             | Resistenzen / Eukaryotischer Promotor | Modifikation    | Bezugsquelle                                 | Verwendung                                      |
|------------------|---------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| pCR-BluntII-Topo | Kanamycin<br>-                        | Topoisomerase I | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: K280020 | Klonierung CDS Matritze für Expressionsvektoren |

Fortsetzung Tabelle 12

| Name                               | Resistenzen /<br>Eukaryotischer<br>Promotor | Modifikation                                     | Bezugsquelle                                 | Verwendung                                   |
|------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| pcDNA3.1/Zeo<br>„3150“             | Ampicillin<br>Zeocin<br><br>CMV             | humanes IgG<br>Fc-Fragment<br>(CH1CH2) 3'<br>MCS | Arbeitsgruppe<br>Gerady-Schahn<br>MHH        | Expression ECD<br>solubel                    |
| pcDNA3.1(A)<br>Myc/6xHis<br>„3151“ | Ampicillin<br>Geneticin<br><br>CMV          | Myc/6x His<br>3'MCS                              | Arbeitsgruppe:<br>Foulkes, KIT<br>D. Vallone | Expression CDS<br>w/o S membran-<br>gebunden |

### Expressionsvektoren

Der Erststrang wurde in einer PCR amplifiziert und die kodierenden Bereiche (CDS; teilweise mit untranslatierenden Bereichen UTR) in den pCR-Blunt II-Topo Vektor ligiert. Zur Expression rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden Bereiche der extrazelluläre Domäne (ECD) oder CDS ohne Stopcodon (w/o S) in korrekter 5'3' Orientierung in die Vektoren 3150 bzw. 3151 ligiert. Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Plasmide im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit hergestellt (MS).

Tabelle 13: Expressionsvektoren

| Name              | Enthaltene Sequenz                                                 | bp Insert | Bezugsquelle                                    |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------|
| NCAM-140          | CDS Ncam1a-140                                                     | -         | Institut, JB, lag zu be-<br>ginn der Arbeit vor |
| 3150A             | Ncam1a ECD                                                         | 2037      | MS                                              |
| 3151A             | Ncam1a CDS w/oStop                                                 | 2511      | MS                                              |
| PCAM              | CDS Ncam1b                                                         | -         | Institut, JB, lag zu be-<br>ginn der Arbeit vor |
| PCAM 5 Mutationen | CDS Ncam1b mit<br>fünf Mutationen<br>in Morpholino-<br>Bindestelle | -         | Institut, ML, lag zu be-<br>ginn der Arbeit vor |
| 3150B             | Ncam1b ECD                                                         | 2112      | MS                                              |
| 3151B             | Ncam1b CDS w/o<br>Stop                                             | 3093      | MS                                              |
| Topo-c2           | Tag-1 CDS                                                          | 3164      | MS                                              |
| 3150c2            | Tag-1 ECD vor omega-<br>Splice Site                                | 3042      | MS                                              |
| 3151c2            | Tag-1 CDS w/o Stop                                                 | 3120      | MS                                              |
| Topo-alcA         | Neurolin CDS                                                       | 1764      | MS                                              |
| 3150alcA          | Neurolin ECD                                                       | 1512      | MS                                              |
| 3151alcA          | Neurolin CDS w/o<br>Stop                                           | 1692      | MS                                              |
| Topo-alcB         | Neurolin Like CDS                                                  | 2860      | MS                                              |
| 3150alcB          | Neurolin Like ECD                                                  | 1509      | MS                                              |
| 3151alcB          | Neurolin Like CDS<br>w/o Stop                                      | 1686      | MS                                              |
| Topo-nadl1        | L1.1 CDS                                                           | 3835      | MS                                              |
| Topo-nadl2        | L1.2 CDS                                                           | 3889      | MS                                              |

### 3.3 Proteine

#### Proteine zur Oberflächenfunktionalisierung

Tabelle 14: Proteine zur Oberflächenfunktionalisierung

| Bezeichnung                | Hersteller                                     | Endkonzentration; ng/mm <sup>2</sup> |
|----------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Fibronektin (human plasma) | Sigma-Aldrich<br>Art-Nr.: F2006                | 100 µg/ml; 0.5 µg/mm                 |
| Laminin (mouse)            | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 23017-015 | 20 µg/ml, 8 ng/mm <sup>2</sup>       |

#### Rekombinante Proteine (Eigenproduktion)

Für Interaktionsstudien wurden rekombinante Proteine mit Hilfe eukaryotischer Zellen (CHO Zellen) synthetisiert (Tab. 15). Informationen zur Methode sind Abschnitt 3.9 zu entnehmen. Soluble Proteine enthalten am C-Terminus ein humanes Fc. Diese Fc-Chimären wurden in der genetisch komplementären Gruppe CHO-2A10 hergestellt, um eine posttranslationale Modifikation mit Polysialinsäure auszuschließen (Eckhardt et al., 1995). Membrangebundene Proteine enthalten bis auf das Stopcodon die gesamte Proteinsequenz (w/o Stop). Als Markierung dienten ein cMyc-Tag und ein 6xHis-Tag.

Tabelle 15: Rekombinante Proteine

| Proteinname | Abschnitt                                    | Tag                 |
|-------------|----------------------------------------------|---------------------|
| Ncam1a      | ECD (AS1-AS679) Solubel                      | Human IgG Fc CH1Ch2 |
|             | CDS (AS1-AS837 w/o Stop)<br>Membrangebunden  | Myc/6x His          |
| Ncam1b      | ECD (AS1-AS704) Solubel                      | Human IgG Fc CH1Ch2 |
|             | CDS (AS1-AS1031 w/o Stop)<br>Membrangebunden | Myc/6x His          |
| Tag-1       | ECD (AS1-AS1014) Solubel                     | Human IgG Fc CH1Ch2 |
|             | CDS (AS1-AS1040 w/o Stop)<br>Membrangebunden | Myc/6x His          |
| Neurolin    | ECD (AS1-AS504) Solubel                      | Human IgG Fc CH1Ch2 |
|             | CDS (AS1-AS564 w/o Stop)<br>Membrangebunden  | Myc/6x His          |

Mittels SDS-PAGE/Coomassiefärbung und Western Blot wurde die Reinheit beziehungsweise Spezifität der aus Zellkultur-Überständen gewonnenen Proteinen ermittelt (Abb. 8) Ncam1a-Fc und Ncam1b-Fc haben je eine Größe von etwa 140 kDa. Tag-1-Fc ist etwa 240 kDa groß und Neurolin-Fc hat eine Größe von etwa 115 kDa. Die Größenangaben beinhalten je die extrazelluläre Domäne und den Fc-Tag und wurden mit protParam aus der Aminosäuresequenz berechnet.

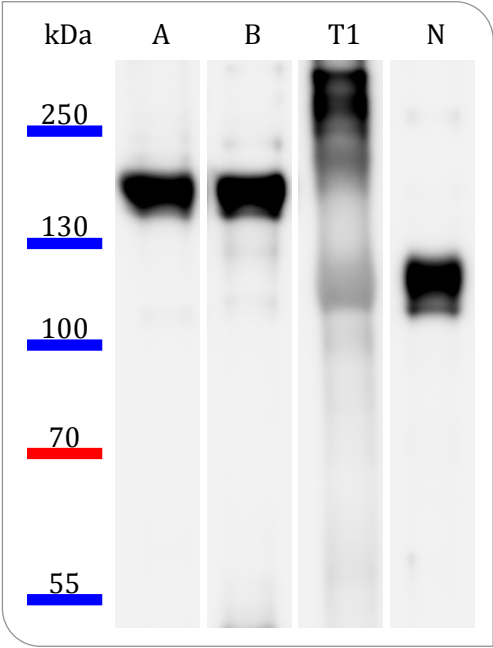


Abbildung 8: Expressionsnachweis rekombinanter Proteine aus dem Zellkulturüberstand. Abkürzungen: (A) Ncam1a-Fc, (B) Ncam1b-Fc, (T1) Tag1-Fc und (N) Neurolin.

Die verwendete Endkonzentration der rekombinanten Fc-Chimären richtete sich nach der Art der Anwendung. Als Kontroll-Protein wurde humanes IgG Fc Protein [1,7 mg/ml] von Merck Millipore Art-Nr.: AG100 verwendet.

- Beschichtung von Glasoberflächen 2 ng/mm<sup>2</sup>
- Pulldownassays/Bead-Aggregationen 10 µg/20 µl Beads

Affinitätssonden:

- Zell-Overlay-Assays 3 µg/100 Zellen
- Whole Mount Overlay Assay 10 µg/25 Embryonen

Enzyme

Alle Enzyme wurden gemäß dem Herstellerprotokoll eingesetzt und verwendet.

Polymerasen

Tabelle 16: Polymerasen

| Spezifität                        | Name                                               | Bezug/Artikelnummer                           |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| RNA-abhängige DNA Polyme-<br>rase | RevertAid HMinus FirstStrand<br>cDNA Synthesis Kit | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: K1631    |
|                                   | Superscript III Reverse Tran-<br>skriptase         | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 18080044 |
| DNA-abhängige DNA Polyme-<br>rase | DreamTaq Green DNA-<br>Polymerase                  | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: EP0712   |
|                                   | Phusion HotStart II DNA-<br>Polymerase             | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: F-549L   |

Fortsetzung Tabelle 16

| Spezifität                   | Name                  | Bezugsquelle/ Artikelnummer                        |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------|
| DNA-abhängige RNA Polymerase | mMESSAGE mMACHINE Kit | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: AM1340/AM1344 |

### Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific bezogen.

Tabelle 17: Restriktionsendonukleasen

| Enzym   | Artikelnummer | Puffer          |
|---------|---------------|-----------------|
| BamHI   | ER0051        | 1x Puffer BamHI |
| BclI    | ER0721        | 1x Puffer G     |
| EcoRI   | ER0271        | 1X Puffer EcoRI |
| HindIII | ER0501        | 1X Puffer R     |
| KpnI    | 15232010      | 1X Puffer L     |
| NotI    | ER0591        | 1x Puffer O     |
| NheI    | ER0971        | 1X Tango Puffer |
| StuI    | ER0421        | 1X Puffer B     |
| XhoI    | ER0691        | 1X Puffer R     |

### Sonstige Enzyme

Tabelle 18: Sonstige Enzyme

| Bezeichnung                                      | Hersteller                                                                   | Verwendung                                              |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| cOmplete Mini                                    | Roche<br>Art-Nr.: 04693124001                                                | Protease Inhibitor Cocktail                             |
| HALT Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 78440                                   | Protease und Phosphatase Inhibitor Mix                  |
| RiboLock RNase Inhibitor                         | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 00382                                   | RNase Inhibitor                                         |
| RNase H                                          | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.:<br>Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: | Verdau von RNA in RNA/DNA Hybriden                      |
| RNase A                                          | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: EN0531                                  | Verdau von RNA                                          |
| <i>recombinant human</i> ST8SII Protein          | R&D Systems<br>Art-Nr.: 6590-GT                                              | rekombinante Sialyltransferase Bead Aggregations Assays |
| T4 DNA Ligase                                    | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: EL0011                                  | Ligationen von Sticky-End                               |

## 3.4 Antikörper und Farbstoffe

### Primärantikörper

Alle verwendeten Antikörper entsprechen dem Isotypen Immunglobulin G (IgG).

Tabelle 19: Primärantikörper

| Antigen                      | Name                          | Klonalität / Herkunft | Endkonzentration | Referenz                  | Bezugsquelle                                 |
|------------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------|---------------------------|----------------------------------------------|
| ZF Ncam1a                    | Ncam1a<br>[0,4 µg/ml]         | pkl Hase              | 0,4 ng/ml        | LLanghauser et al. (2012) | Yoshihiro Yoshihara                          |
| ZF Ncam1b                    | Ncam1b<br>[0,4 µg/ml]         | pkl Hase              | 0,4 ng/ml        | Miyasaka et al. (2005)    | Yoshihiro Yoshihara                          |
| Ncam1a/1b                    | Ncam 704<br>[20 mg/ml]        | mkl Maus              | 10 µg/ml         | Marx et al. (2001)        | Zell- und Neurobiologie KIT                  |
| polySia                      | m735<br>[2 mg/ml]             | mkl Maus              | 2 µg/ml          | Frosch et al. (1985)      | AG Gerardy-Schahn, MHH                       |
| Tag-1                        | T741<br>[10 mg/ml]            | pkl Hase              | 3 µg/ml          | Lang et al. (2001)        | Uni Konstanz                                 |
| L1CAM                        | E17<br>[10 mg/ml]             | mkl Maus              | 50 µg/ml         | Weiland et al. (1997)     | Uni Konstanz                                 |
| Neurolin                     | N518<br>[1,5 mg/ml]           | mkl Maus              | 25 µg/ml         | Ott et al. (2001)         | Uni Konstanz                                 |
| IgG, Fcy-Fragment spezifisch | Goat-a-human IgG<br>[2 mg/ml] | pkl Ziege             | 10 µg/ml         | (Maurer et al., 2012)     | Jackson Immuno Research Art-Nr.: 109-005-008 |
| Laminin                      | Anti-Laminin<br>[0,5 mg/ml]   | pkl Hase              | 5 µg/ml          | -                         | Sigma Aldrich Art-Nr.: L9393                 |
| Anti-6xHis Tag               | HIS.H8<br>[1 mg/ml]           | mkl Maus              | 5 µg/ml          | Panter et al. (2012)      | abcam Art-Nr.: ab18184                       |

### Sekundärantikörper

ZK Immunhistochemie von Zellen ZF Immunhistochemie von *Whole Mounts*

Tabelle 20: Sekundärantikörper

| Antigen | Name                                                   | Fluoreszenzfarbstoff (Ex nm / Em nm) / Enzym | Endkonzentration           | Hersteller                                   |
|---------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------|
| Maus    | Goat a-Mouse IgG Cy3<br>[1,5 mg/ml]                    | Cy3 (Ex 554/Em 568)                          | 3 µg/ml<br>ZF & ZK         | Jackson Immuno Research Art-Nr.: 115-165-146 |
|         | Goat a-Mouse IgG Cy3 Preadsorbed Rabbit<br>[1,5 mg/ml] | Cy3 (Ex 554/Em 568)                          | 3 µg/ml<br>ZF & ZK         | Dianova Art-Nr.: 111-165-166                 |
|         | Goat a-Mouse IgG Cy5<br>[1,5 mg/ml]                    | Cy5 (Ex 649/Em 666)                          | 7,5 µg/ml ZK<br>3 µg/ml ZF | Dianova Art-Nr.: 115-175-146                 |

Fortsetzung Tabelle 20

| Antigen | Name                                     | Fluoreszenzfarbstoff<br>(Ex nm / Em nm) / Enzym                 | Endkonzentration              | Hersteller                                         |
|---------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------|
| Hase    | Goat a-Rabbit IgG<br>Cy3<br>[1,5 mg/ml]  | Cy3 (Ex 554/Em 568)                                             | 3,75 µg/ml ZK<br>3 µg/ml ZF   | Dianova<br>Art-Nr.: 111-165-144                    |
|         | Goat a-Rabbit IgG<br>A647<br>[750 µg/ml] | Alexa Fluor 647<br>(Ex 650/Em 665)                              | 3,75 µg/ml ZK<br>1,5 µg/ml ZF | Dianova<br>Art-Nr.: 111-606-045                    |
|         | Donkey-a-Rabbit<br>IgG<br>[400 µg/ml]    | Meerrettichperoxidase<br>( <i>Horseradish Peroxidase</i> , HRP) | 40 ng/ml                      | Jackson Immuno<br>Research<br>Art-Nr.: 711-036-152 |
|         | Anti 6xHis tag<br>[1 mg/ml]              | HRP                                                             | 200 ng/ml                     | Abcam<br>Art-Nr.: ab1187                           |
| Ziege   | Rabbit-a-Goat IgG<br>[800 µg/ml]         | HRP                                                             | 80 ng/ml                      | Jackson Immuno<br>Research<br>Art-Nr.: 305-035-008 |
| Mensch  | Goat-a-Human IgG<br>A594<br>[2 mg/ml]    | Alexa Fluor 594<br>(Ex 590/Em 617)                              | 10 µg/ml                      | Jackson Immuno<br>Research<br>Art-Nr.: A-11014     |
|         | Goat-a-Human IgG<br>A546<br>[2 mg/ml]    | Alexa Fluor 546<br>(Em 556/Ex573)                               | 10 µg/ml                      | Thermo Fisher<br>Scientific<br>Art-Nr.: A-21089    |

## Farbstoffe

Tabelle 21: Farbstoffe

| Name                                              | Fluoreszenz<br>(Ex nm/Em nm)        | Verdünnung    | Hersteller                                      |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|-------------------------------------------------|
| 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)<br>[1 mg/ml] | DAPI/DNA Komplex<br>(Ex 364/Em 454) | 0,5 µg/ml     | Sigma-Aldrich<br>Art-Nr.: D9542                 |
| Phalloidin Alexa 647<br>[200 Units/ml]            | AlexaFluor 647<br>(Ex 650 / Em 665) | 0,02 Units/µl | Thermo Fisher<br>Scientific<br>Art-Nr.: A-22287 |

## 3.5 Kit-Systeme verschiedener Hersteller

In Tabelle 22 sind die für verschiedene Anwendungsbereiche verwendeten Herstellerpakete aufgelistet. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers verfahren.

Tabelle 22: Kit-Systeme

| Bezeichnung                             | Hersteller                                   | Verwendung                                 |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit  | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 23200   | Konzentrationsbestimmung von Proteinen     |
| Lipofectamine 2000 Transfection Reagent | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 1668027 | Transfektionsreagenz eukaryotischer Zellen |



Fortsetzung Tabelle 22

| Bezeichnung                                                                               | Hersteller                                    | Verwendung                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| peqGOLD TriFast                                                                           | VWR (peqLab)<br>Art-Nr.: 30-2010              | Extraktion von RNA und Proteinen aus Gewebehomogenaten |
| QIAprep Spin Miniprep Kit                                                                 | QIAGEN<br>Art-Nr.: 27104                      | Plasmidpräparation aus Übernachtskulturen              |
| QIAquick Gel Extraction Kit                                                               | QIAGEN<br>Art-Nr.: 28704                      | Extraktion von PCR-Amplifikaten aus Agarosegelen       |
| RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit                                         | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: K1631    | Erststrangsynthese aus totaler RNA                     |
| SigmaSpin™ Sequencing Reaction Clean-Up                                                   | Sigma-Aldrich<br>Art-Nr.: S5059-70EA          | Aufreinigung enzymatischer Reaktionen                  |
| SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate                                          | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: 34080    | Chemilumineszent HRP Substrat                          |
| Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit with One Shot® TOP10 Chemically Competent <i>E.coli</i> | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: K2800-02 | <i>Blunt-End</i> Ligation und Transformation           |

### 3.6 Längenstandards,Arbeitsmittel,Geräte,Programme

Tabelle 23: Längenstandards

| Bezeichnung            | Hersteller                 | Verwendung                                                           |
|------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| peqGOLD 1kb DNA Leiter | Peqlab<br>Art-Nr.: 25-2030 | DNA Längenstandard<br>Größenbereich:<br>250-10000 bp<br>14 Fragmente |
| Protein Marker V       | Peqlab<br>Art-Nr.: 27-2210 | Gefärbter Proteinmarker<br>Größenbereich: 10-250 kDa<br>9 Fragmente  |

Tabelle 24: Arbeitsmittel

| Bezeichnung                                                              | Hersteller                                           | Verwendung                                                                                  |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amicon Ultra-0,5 ml (50K) Ultracel 50K Membrane                          | Merck Millipore<br>Art-Nr.: UFC505008                | Konzentration und Umpuffern rekombinanter Proteinen                                         |
| Coated Fluorescent Polystyrene Particles 0,55 µm Protein A coated Purple | Kisker Biotech GmbH & Co KG<br>Art-Nr.: PC-PAFPU-0.5 | Bead Aggregations Assays<br>Farbe (Ex/Em): Texas Rot (590-620)<br>beschichtet mit Protein A |
| Coated Fluorescent Polystyrene Particles 0,55 µm Protein A coated Yellow | Kisker Biotech GmbH & Co KG<br>Art-Nr.: PC-PAFY      | Bead Aggregations Assays<br>Farbe (Ex/Em): gelb-grün (470/480)<br>beschichtet mit Protein A |
| Corning CellBIND Surface HYPERFlask cell culture vessels M               | Corning<br>Art-Nr.: 10020                            | Proteinsynthese                                                                             |

Fortsetzung Tabelle 24

| Bezeichnung                                                                          | Hersteller                                         | Verwendung                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| FluoSpheres <i>carboxylate-modified microspheres</i> , 1,0 µm red (580/605)          | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: F-8821        | Bead Aggregations Assays<br>Farbe (Ex/Em): rot (580/605)                  |
| FluoSpheres <i>carboxylate-modified microspheres</i> , 1,0 µm yellow-green (505/515) | Thermo Fisher Scientific<br>Art-Nr.: F-8823        | Bead Aggregations Assays<br>Farbe (Ex/Em): gelb-grün (505/515)            |
| HiTrap™ Protein G HP Säulen                                                          | GE Healthcare Life Sciences<br>Art-Nr.: 17-0404-01 | Gewinnung rekombinanter Proteine aus ultrafiltriertem Zellkulturüberstand |
| Immun-Blot PVDF Membran                                                              | BIO-RAD<br>Art-Nr.: 162-0177                       | Blotten von Proteinen im Western Blot                                     |
| PDMS Streifen Matritzen 40 µm                                                        | Eigenproduktion<br>AG Bastmeyer                    | Matritzen für Streifenassays                                              |
| Protein G Sepharose 4 Fast Flow                                                      | GE Healthcare<br>Art-Nr.: 17-0618-01               | Pulldown Assays                                                           |
| Vivaflow 200 10,000 MWCO PES                                                         | Sartorius stedim biotech<br>Art-Nr.: VF20P0        | Ultrafiltration                                                           |
| µ-Slide 18 Well                                                                      | Ibidi<br>Art-Nr.: 81821                            | Beadaggregation                                                           |

Tabelle 25: Geräte

| Bezeichnung                                                          | Hersteller                                           | Verwendung                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amersham Imager 600                                                  | GE Health Care                                       | Geldokumentation                                                                         |
| Mini Protean 3                                                       | Biorad                                               | SDS-PAGE und Westernblot                                                                 |
| Nanodrop ND-1000                                                     | peqlab                                               | Spektralphotometrie Nukleinsäuren und Proteine                                           |
| Peristaltic Pump P-1                                                 | GE Health Care Art-Nr.: 18-1110-91                   | Peristaltikpumpe zur Absorption rekombinanter Proteine an ProteinG                       |
| Peristaltic Masterflex L7S economy drive mit easy-load Pumpenkopf 16 | sartorius stedim biotech<br>Art-Nr.: VFA012, 7518-00 | Peristaltikpumpe zur Konzentration rekombinanter Proteine segregiert in Zellkulturmedium |
| Picospritzer                                                         | General Valve Cooperation                            | Injektor (60psi High, 9psi low, 20ms)                                                    |
| Thermocycler PTC-200 DNA Engine Peltier Thermal Cycler               | MJ Research                                          | Standard PCR-Amplifikation, Gradienten-PCR                                               |
| Vertical Pipette Puller 700c                                         | David Kopf Instruments                               | Needle Puller                                                                            |
| ZebTEC                                                               | Tecniplast                                           | Aquarienanlage                                                                           |

Tabelle 26: Mikroskope und Objektive

| Bezeichnung                     | Objektive                                                                             | Funktionalität                                               |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Apotome Imager Z1<br>Carl Zeiss | EC Plan NEOFLUAR 20x/0.50<br>EC Plan NEOFLUAR 40x/0.75<br>Plan APOCHROMATE 63x/1.4 Öl | strukturierte Beleuchtung mittels optischem Gitter; aufrecht |

Fortsetzung Tabelle 26

| Bezeichnung                    | Objektive                                                                                     | Funktionalität                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Colibri<br>Carl Zeiss          | Plan-Apochromate 40x/ DIC                                                                     | Fluoreszenzmikroskop mit Colibri-LED Inkubationskammer |
| LSM 510 Meta<br>Carl Zeiss     | Plan Apochromat 10x/0.45<br>Plan-Apochromat 40x/0.95, corr<br>Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl, DIC | konfokales Laser Scanning Mikroskop; invers            |
| SteREO.Lumar.V12<br>Carl Zeiss | -                                                                                             | Stereomikroskop mit Fluoreszenzlicht                   |

**Textverarbeitung**

- LaTeX
- TeXnicCenter
- OpenOffice 4.0.1 (Calc)

**Bildverarbeitung**

- Zen Imaging Software Zeiss
- Fiji (Fiji Is Just ImageJ)
- Paint Shop Pro x7
- Inkscape

**Sequenzanalyse**

- CLC Sequence Viewer
- SnapGene Viewer
- FinchTV Geospiza
- ProtParam ExPASy

**Bildauswertung: Bead Aggregation**

- Matlab

**3.7 Organismen****Modellorganismus**

- Familie: Cyprinidae
- Unterfamilie: Danionidae
- Gattung: Danio
- Art: *Danio rerio* (Zebrafisch) Transgene Linie: Tg(hb9::GFP) (Flanagan-Steet et al., 2005)

### Zelllinien

- CHO-K1 AG Franz, KIT
- CHO-2A10 AG Gerardy-Schahn, MHH

### Bakterienstamm

kompetente E.coli „One Shot TOP10 Competent Cells“, Thermo Fisher Scientific Art-Nr.: C4040-03

### 3.8 Embryonen: Hälterung, Manipulation, Immunhistochemie

In der vorliegenden Arbeit wurden Zebrafische (*Danio rerio*) der transgenen Zebrafischlinie Hb9::GFP als Modell genutzt. Durch die Expression von GFP unter dem motoneuronen spezifischen Transkriptionsfaktor Hb9 ermöglicht diese Linie die Beobachtung motoneuronaler Projektionsmuster in *Whole Mount* Embryonen und in der Primärzellkultur (Flanagan-Steet et al., 2005).

Neben einer hohen Humanrelevanz eignet sich der Zebrafisch durch eine Vielzahl experimenteller Vorteile wie leichte Zugänglichkeit der Embryonen, Transparenz von Chorion und Zellen, einfach zu bewerkstellende molekularbiologische Modifikationen durch Morpholino-Injektion, sowie ein vollständig sequenziertes Genom.

#### Hälterung adulter Zebrafische

Die adulten Linien wurden in einer Aquarienanlage (ZebTech) bei konstanten Bedingungen (26 °C, pH 7,4 ; Licht-/Dunkelphase 12h/12h) gehalten.

#### Gewinnung und Hälterung von Embryonen

Zur Paarung der Zebrafische wurden adulte Paare am Vorabend voneinander getrennt in Ablassbecken gehalten. Als Dämmerungslaicher benötigen sie einen Lichtimpuls zur Stimulation. Die Eiablage erfolgt 20-30 Minuten nach der Paarung. Das Gelege wurde mit einem Sieb von groben Verunreinigungen befreit und in E3-Embryonenmedium in Petrischalen bei konstanten 28,5 °C bzw. 24,5 °C (Andersen, 2001) gehältert. Um die Melaninbildung (Pigmentierung) zu verhindern wurden die Embryonen ab 24 Stunden nach der Befruchtung hpf mit 0,003 % PTU behandelt.

Die Entwicklungsstadien wurden nach genau definierten Kriterien bestimmt (Kimmel et al., 1994). Es wurden 18, 24, 48 hpf sowie 10 Tage dpf alte Embryonen für die immunhistochemische Färbung fixiert (Tab. 27). Zur Auswertung motoneuronaler Projektionen wurden die Embryonen zu 48 hpf fixiert.

Embryonen die der Präparation von Motoneuronen dienten, wurden für 24 Stunden bei 24,5 °C gehältert und entsprechend dem Entwicklungsstadium 18 - 20 Somiten präpariert (Andersen, 2001).

#### Morpholino-Injektion von Embryonen

Die verwendeten Morpholinos blockieren die Translation der Ziel-mRNA (Tag. 11). Der transiente Knockdown der Polysialyltransferase St8SialII erfordert eine Kombination aus zwei verschiedenen Morpholino (Marx et al., 2007). Ansonsten wurde nur ein spezifischer Morpholino eingesetzt. Die Morpholino-Lösungen wurden in einer Morpholino-Endkonzentration von 1 ng/nl bzw. 2 ng/nl (Tag-1) angesetzt und innerhalb einer Woche verwendet.

- 1ng/nl Morpholino [8 ng/nl]
- 1x Danieau-Puffer [50x]

- 50 % Phenolrot Lösung

in DEPC-H<sub>2</sub>O; anschließend: 5 min, 65 °C

Die Injektionsnadeln wurden aus Glaskapillaren (Borosilikat; World Precision Instrument Art-Nr.: 1B100-4) gefertigt (Heater 80, Solenoid 85). Zur Injektion wurden die Embryonen in 1x Danieau-Puffer überführt und in einer Silikonform aufgereiht. Es wurden 3 - 4 nl der Morpholinolösung in den Dotter von Zebrafischembryonen im 1-Zell-Stadium injiziert.

### Immunhistochemische Färbung von Embryonen („Whole Mounts“)

Die Embryonen wurden zum gewünschten Entwicklungsstadium dechorioniert und anästhesiert. Anschließend wurden sie in Netze (in Tabelle mit \* gekennzeichnet) überführt und nach dem Protokoll Tabelle 27 prozessiert. Die Embryonen wurden mit Minutiennadeln entdottert und zur mikroskopischen Dokumentation in Mowiol lateral positioniert und eingebettet. Als Platzhalter zwischen den Deckgläsern dienten zwei Glasplättchen.

Tabelle 27: Fixieren und Färben von *Whole Mount* Embryonen

| Vorgang                   | Lösung / Puffer                                              | Dauer                                                                                                                                                              | Temperatur  | Gefäß        |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|
| Fixieren                  | 4 % PFA in Phosphatpuffer (PP) [Drehrad]                     | 4:30 h                                                                                                                                                             | 4 °C        | 2 ml*        |
| Waschen                   | PP [Drehrad]                                                 | 3x 5 min                                                                                                                                                           | 4 °C        | 2 ml*        |
| <i>Optional: Lagerung</i> | <i>PP mit 0,02 Thimerosal</i>                                | <i>ÜN o. ÜWo</i>                                                                                                                                                   | <i>4 °C</i> | <i>2 ml*</i> |
| Spülen                    | ddH <sub>2</sub> O                                           | 5 s                                                                                                                                                                | RT          | 2 ml*        |
| Permeabilisieren          | Aceton                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 hpf: 1 min</li> <li>• 24 hpf: 2 min</li> <li>• 48 hpf: 6 min</li> <li>• 10 dpf: 10 min</li> <li>• MO: –30 s</li> </ul> | -20 °C      | 2 ml*        |
| Spülen                    | H <sub>2</sub> O <sup>D</sup>                                | 5 s                                                                                                                                                                | RT          | Netz         |
| Waschen                   | PP                                                           | 3x 5 min                                                                                                                                                           | 4 °C        | 2 ml*        |
| Inkubation                | Natriumborhydrid-Lösung<br>[Embryonen mit Lösung überspülen] | 2x 5 min                                                                                                                                                           | RT          | 6Well*       |
| Waschen                   | PBS [Spritzflasche]                                          | 3-6 min                                                                                                                                                            | RT          | 2 ml*        |
| Inkubation                | PBS/BSA/DMSO                                                 | 15 min                                                                                                                                                             | RT          | 2 ml*        |
| Primärantikörper          | in PBS/BSA/DMSO<br>[langsam, horizontal drehend]             | Über Nacht (ÜN)                                                                                                                                                    | 4 °C        | 250 µl       |
| Waschen                   | in PBS/BSA/DMSO                                              | 3x 15 min                                                                                                                                                          | 4 °C        | 2 ml         |
| Sekundärantikörper        | in PBS/BSA/DMSO<br>[langsam, horizontal drehend]             | 2 h                                                                                                                                                                | RT          | 250 µl       |
| Waschen                   | PBS/BSA/DMSO + 1/100<br>2 % Thimerosal                       | ÜN                                                                                                                                                                 | 4°C         | 2 ml         |

#### **Proteinextraktion aus Zebrafisch Embryonen**

Die Embryonen wurden anästhesiert und mit Deyolking-Puffer entdottert. Anschließend wurden die Embryonen in RIPA-Puffer (250 µl/50 Embryonen; Thermo Fisher Scientific, Art-Nr.: 89900) nach Angaben des Herstellers homogenisiert.

### **3.9 Zellkultur: Primärzellkulturen & Zelllinien**

#### **Isolation und Kultivierung von Motoneuronen Primärzellkulturen**

Die Embryonen wurden entsprechend des Protokolls gewonnen und für 24 Stunden bei 24,5 °C gehalten. Diese Temperatur verlangsamt das Wachstum der Embryonen auf ein moderates Level und ermöglicht die Präparation nach 24 Stunden im 18 - 20 Somiten Stadium. Primärzellkulturen spinaler Motoneurone haben zwischen 20 und 24 Somiten das größte Wachstumspotential (Z. Chen et al., 2013).

Die Isolation der Motoneurone erfolgte weitgehend nach dem Protokoll von Andersen (2001). Folgende Optimierungen des Protokolls wurden in der vorliegenden Doktorarbeit oder in einer in diesem Rahmen betreuten Masterarbeit (Sauer, 2013) vorgenommen:

- **Hälterung und Vorbereitung der Embryonen:**  
Die Embryonen wurden in Penicillin-Streptomycin (1 %)-haltiges E3 Medium überführt und dort manuell dechorioniert.
- **Präparation:**  
Bei der Dissektion des Rückenmarks wurde darauf geachtet, das Epithel vollständig zu entfernen. Dies ermöglicht einen größeren Anteil an Motoneuronen:Gesamtzellzahl. (Richtwert: 60 % Motoneuronen).
- **Zellzahl:**  
700 Zellen/mm<sup>2</sup> erschienen mit Hinblick auf Viabilität der Zellen und Ausbleiben von Zell-Zell-Kontakten als geeignet (Größenordnung: 1 - 2 Rückenmarke/Deckglas). Es wurden 26500 Zellen/ ein 12-Well (18 mm Deckglas, 700 Zellen/mm<sup>2</sup>) ausgesät (Sauer, 2013). Dies entspricht bereits publizierter Daten für ein ermitteltes Wachstumsoptimum für die Primärzellkultur spinaler Motoneurone (Z. Chen et al., 2013).
- **Substrat:**  
Die Motoneuronenkulturen wurden auf Laminin, Ncam1a, Ncam1b und humanem Fc ausgesät.
- **Inkubationszeit:**  
Die Zellen wurden für zwei Tage in CO<sub>2</sub>-unabhängigen Medium bei Raumtemperatur inkubiert. Für Lebendbeobachtung (Zeitrafferaufnahmen) wurde die Inkubationskammer der Co-libri auf 25 °C eingestellt.

Das Protokoll im Überblick:

- 2x waschen mit 1 % P/S E3 Medium
- Sortieren nach hb9::GFP+
- Dechorionieren in 1 % P/S E3 Medium
- Überführen in MMR (4 °C) á 5 Embryonen
- entfernen des Dottersacks
- entfernen des Epithels

- Dissektion des Rückenmarks
- Dissoziation: Überführen in ATV / Trypsin
- 2x 10 min Inkubation bei 24,5 °C, dazwischen vortexen
- Zentrifugieren (soft): 5 min, 1000g, 4 °C
- abnehmen des Überstandes
- resuspendieren in MN-Medium
- 1 ml MN-Medium in 12-Well Platte vorlegen
- Zellzahl: 26500 Zellen / ein 12-Well
- Inkubation: RT 2 Tage. Mediumwechsel nach 24 h

### **Isolation von Motoneuronen mittels Fluoreszenz Durchflusszytometrie (FACS)**

Die GFP+ Motoneuronen wurden mit Hilfe des FACS Aria II flow Cytometer (BD Biosciences) detektiert und sortiert. Es wurde ein 488 nm Laser für die Belichtung verwendet und die GFP+ und GFP- Zellen über ein Bandpassfilter-Set für FTIC (530/30 nm) detektiert. Zelldoublets wurden über ein *Forwardscatter*-Profil ausgeschlossen. Beide Prozeduren wurden wiederholt um deren Zellmorphologie zu bestätigen und anschließend GFP+ und GFP- Zellen separat voneinander gesammelt. Die anschließenden Analysen konnten einen Reinheitsgrad der GFP+ Zellen bestätigen (FlowJo Version 7.6.5; FlowJo, LLC). Die Sortierung sowie die Analysen wurden von Yuya Yahashi (Aarhus Universität, Abteilung für *Molecular Biology and Genetics; Molecular Intervention*, Dänemark/Forschungsaufenthalt KIT Campus-Nord) durchgeführt.

### **Transfektion & Selektion von Zelllinien**

CHO-Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie aus den Ovarien des Chinesischen Hamsters (*Crictulus griseus*). CHO-K1 entsprechen der parentalen Gruppe der CHO Zellen. CHO-2A10 repräsentieren eine genetisch komplementäre Gruppe, die aufgrund einer Mutation der polySia-Transferase St8SiaIV nicht in der Lage sind Proteine zu polysialylieren (Eckhardt et al., 1995).

Beide Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 98 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert und passagiert.

Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels Lipofektion (Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific, Art-Nr.: 11668-027) nach dem Herstellerprotokoll.

#### **membrangebundene Proteine**

- 1 µg Plasmid DNA / 8x10<sup>4</sup> Zellen (18 mm Deckgläser)
- nach 24 h: Für 3 Tage in Selektionsmedium gehalten (DMEM Medium , 750 µg/ml Geneticin)

#### **soluble Fc-Chimären Proteine**

- 4 µg Plasmid DNA / 200x10<sup>4</sup> Zellen (75 ccm Zellkulturflaschen)
- nach 24 h: Für 10 Tage bzw. bis zur vollständigen Konfluenz in Selektionsmedium (DMEM Medium, 750µg/ml Zeocin)
- Langzeitkultivierung : CD OptiCHO (serumfrei; 4mM L-Glutamin) w/o Zeocin in HYPERFlasks

### Fixieren & Färben Primärzellen und Zelllinien

Motoneuronen und transfizierte CHO-Zellen wurden nach folgendem Protokoll fixiert und gefärbt.

Tabelle 28: Färbeprotokoll Zellkultur

| Vorgang                        | Lösung / Puffer                                                            | Dauer    |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------|
| Waschen                        | PBS                                                                        | 3x 5 min |
| Fixieren                       | Motoneurone:<br>4 % PFA/GA/Saccharose in PBS<br>Zellkultur: 4 % PFA in PBS | 10 min   |
| Waschen                        | PBS                                                                        | 3x 5 min |
| Reduzieren von Doppelbindungen | NaBH <sub>4</sub>                                                          | 3x 4 min |
| Permeabilisieren               | PBS-T                                                                      | 5 min    |
| Waschen                        | PBS                                                                        | 2x 5 min |
| Primärantikörper               | 1. Antikörper in 1 % BSA                                                   | 1 h      |
| Waschen                        | PBS                                                                        | 3x 5 min |
| Sekundärantikörper             | 2. Antikörper in 1 % BSA                                                   | 1 h      |
| Waschen                        | PBS                                                                        | 3x 5 min |
| Waschen                        | H <sub>2</sub> O                                                           | 1 s      |
| Einbetten                      | 20 % Mowiol                                                                | -        |

### 3.10 Mikrobiologie: Transformation und Minipräparation

#### Transformation chemisch kompetenter *E.coli*

Die chemisch kompetenten *E.coli* wurden mit Hitzeschock transformiert.

- Inkubation mit dem Vektor: 4 °C, 30 min
- Hitzeschock: 42 °C, 30 s
- 4 °C, 5 min
- + 250 µl SOC-Medium, 37 °C 1 h

Rekombinante Klone wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten selektioniert. Die Validierung rekombinanter Klone erfolgte mit einer Kolonie-PCR. Kultivierung positiver Klone erfolgte bei 37 °C über Nacht in Flüssig-LB mit Antibiotikum.

#### Glycerinstock

Langzeitlagerung der Klone erfolgte in 70 % Glycerin/LB ohne Zugabe von Antibiotikum bei -80 °C.

#### Minipräparation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde nach Anleitung des QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN Art-Nr.: 27104) verfahren. Zur Minipräparation wurden 5 ml Übernachtskultur angesetzt. Eluiert wurde mit einem Volumen von 50 µl H<sub>2</sub>O<sup>D</sup>.



### 3.11 Synthese von Nukleinsäuren: RNA, Erststrang, PCR und Plasmide

#### RNA: Isolation und Synthese

##### Besonderheiten im Umgang mit RNA

Alle Lösungen wurden mit 0,001 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und anschließend autoklaviert.

Hitzeinstabile Lösungen wurden mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt. Verbrauchsmaterialien wurden Nuklease-frei geliefert und original verpackt verwendet. Oberflächen wurden mit RNase AWAY (Carl Roth, Art-Nr.: A998) gereinigt.

**RNA Isolation aus Whole Mount Embryonen** Totale RNA wurde aus 2 dpf *Whole Mount* Embryonen gewonnen (50 Stück/ml TriFast). Alle Schritte wurden unter Berücksichtigung des Herstellerprotokolls von Peqlab durchgeführt (Art-Nr.: 30-2010).

Das RNA-Präzipitat wurde in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O<sup>D</sup> aufgenommen und mit 1 µl RNase Inhibitor versehen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

**Synthese von Rescue RNA** Es wurden Rescue Experimente durchgeführt, die es durch die zusätzliche Injektion von RNA mit dem Morpholino ermöglichen, den Effekt eines Knockdowns auszugleichen. Die Injektion von Rescue RNA dient dem Ausschluss von so genannten „off-target“ Effekten. Ermittelt wurde eine Menge von 1,8-3,2 ng *ncam1a*- bzw. *ncam1b*-mRNA bei einem Einsatz von 3-5 ng Morpholino.

Zur Synthese der mRNA wurde das mMESSAGE mMACHINE Kit (Thermo Fisher Scientific; Art-Nr.: AM1340, AM1344) verwendet und nach dessen Angaben verfahren. Als Matritze dienten Plasmide die die kodierende Sequenz des Zielgens enthielten. Für *Ncam1b* wurde ein Plasmid als Matritze verwendet, der im Bereich der Morpholino Bindestelle fünf stille Mutationen enthält (Langhauser et al., 2012). Der *ncam1a* Morpholino bindet im untranslatierten Bereich von dem Startcodon (5'UTR). Daher benötigte es keiner weiteren Modifikation.

Je 2 µg der Vektoren wurden in einem Restriktionsverdau linearisiert (*Ncam1a*: StuI; *Ncam1b*: NotI) und die RNA mit einer RNA-Polymerase synthetisiert (*Ncam1a*: T7; *Ncam1b*: Sp6).

Um die DNA zu entfernen wurden die Reaktionen wurden für 15 Minuten bei 37 °C mit DNase behandelt. Die mRNA wurden anschließend mit Lithiumchlorid/Ethanol Fällung isoliert und bei -80 °C gelagert.

**Lithiumchlorid/Ethanol fällung von RNA zur Injektion** RNA wurde durch Zugabe einer salzhaltigen Lösungen (4 M *LiCl*) und eines 3-fachen Volumens an eiskalten 100 % EtOH quantitativ gefällt.

- Fällung: 1v/v LiCl (4M), 3v/v Ethanol (100 %)
- Pelletion: 13000g, 20 m, 4 °C
- Waschen: 2x Ethanol (75 %)

Der Überstand wurde abgenommen, da Pellet in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O<sup>D</sup> aufgenommen und die RNA bei -80 °C gelagert.

#### Erststrangsynthese (cDNA)

cDNA wurde aus isolierter, totaler RNA synthetisiert. Die dafür verwendeten genspezifischen Primer binden selektiv an die Ziel-mRNA.

Es wurde nach der Anleitung des RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Art-Nr.: K1631) verfahren. Eingesetzt wurden 3 µg totale RNA.

Die synthetisierte cDNA wurde mit RNaseH (Thermo Fisher Scientific Art-Nr.:) nach Herstellerangaben verdaut und in einer daran anschließenden PCR verwendet.

## Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### Phusion Hot Start II

Um die kodierenden Sequenzen unterschiedlicher NCRM aus Erststrang zu amplifizieren, wurden in einem 50 µl Ansatz (Phusion Hot Start Polymerase II, Thermo Fisher Scientific Art-Nr.: F-549L) 10 ng der synthetisierten cDNA eingesetzt. Um die Sequenzen der zu exprimierenden CAMs in Expressionsvektoren zu klonieren, wurden 1 ng Plasmid DNA eingesetzt. Außerdem wurden Primer verwendet an deren 5' Ende Schnittstellen zugefügt wurden (2-Step PCR). Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion entspricht den Empfehlungen des Herstellers. Tabelle 29 und 30 beinhalten die verwendeten PCR-Programme. Sie unterscheiden sich hinsichtlich eines zusätzlichen Hybridisierungszyklus. Im Standard PCR-Programm wurde analog zum Herstellerprotokoll verfahren. Tabelle 29 gibt die verwendeten Zeiten der einzelnen Schritte wieder. Die 2-Step PCR dient der Synthese von 5' Schnittstellen an das zu klonierende Template. Hierbei wurde die Hybridisierungstemperatur so gewählt, dass die Primer zunächst nur an die Zielsequenz binden um die Spezifität zu erhöhen (I). Ein zweiter Hybridisierungszyklus diente anschließend dazu, das gesamte Produkt zu amplifizieren (II).

#### Standard PCR-Programm Phusion Hot Start II

Tabelle 29: Standard PCR-Programm Phusion Hot Start II

| PCR-Schritt                         | Temperatur [°C]                                                                                  | Dauer   |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1 Initiale Denaturierung            | 98                                                                                               | 30 s    |
| 2 Denaturierung                     | 98                                                                                               | 10 s    |
| 3 Hybridisierung                    | Primer > 20 nt: Tm +3 °C der niedrigsten Primer Tm<br>Primer ≤ 20 nt: Tm des niedrigsten Primers | 10 s    |
| 4 Elongation                        | 72                                                                                               | 15 s/kb |
| 30 Zyklen Wiederholung Schritte 2-4 |                                                                                                  |         |
| Finale Elongation                   | 72                                                                                               | 10 min  |
| Lagerung                            | 4                                                                                                | ∞       |

#### 2-Step Programm für die Synthese von Schnittstellenüberhängen

Tabelle 30: 2-Step Programm für die Synthese von Schnittstellenüberhängen

| PCR-Schritt                             | Temperatur [°C]                                                | Dauer    |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------|
| 1 Denaturierung                         | 98                                                             | 30 s     |
| 2 Denaturierung (I)                     | 98                                                             | 10 s     |
| 3 Hybridisierung an Template (I)        | Tm des niedrigsten Primers; Hybridisierung Template spezifisch | 60 s     |
| 4 Elongation (I)                        | 72                                                             | 15 s /kb |
| 5 3 Zyklen Wiederholung Schritte 2-4    |                                                                |          |
| 6 Denaturierung (II)                    | 98                                                             | 10 s     |
| 7 Hybridisierung mit Schnittstelle (II) | Tm des gesamten Primer +3 °C des niedrigstens Primers          | 60 s     |
| 8 Elongation (II)                       | 72                                                             | 30 s     |
| 9 30 Zyklen Wiederholung Schritte 6-8   |                                                                |          |
| 10 Finale Elongation                    | 72                                                             | 10 min   |
| 11 Lagerung                             | 4                                                              | ∞        |

### DreamTaq Polymerase

Für die qualitative Analyse einzelner Bakterienkolonien wurden Kolonie-PCRs mit der DreamTaq Polymerase durchgeführt (Thermo Fisher Scientific Art-Nr.: EP0712). Ein Teil der Kolonie wurde in 5 µl H<sub>2</sub>O<sup>D</sup> resuspendiert und zur Lyse der Zellen für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und anschließend eine Minute bei 130000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt in einer Standard-PCR als Template verwendet. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen PCR-Konditionen verwendet.

### Klonierung

#### Restriktionsverdau

Um die PCR-Produkte gerichtet in die Expressionsvektoren zu klonieren, wurden die Produkte mit Schnittstellenprimern synthetisiert, die die entsprechenden Erkennungssequenzen umfassten.

Die Polyklonierungsstelle des verwendeten Plasmid 3150 (Expression Fc-Tag markierter Proteine) ist restriktiert auf drei Erkennungssequenzen (NheI & HindIII 5' sowie BamHI 3').

Da in Ncam1b die Erkennungssequenz für BamHI vorliegt, wurde das PCR-Amplifikat mit BclI geschnitten, welches einen 5' GATC Überhang hinterlässt. Es konnte dann an Fragmente ligiert werden die durch BamHI geschnitten wurden.

Der Verdau von 1 µg DNA erfolge in einem 10x Überverdau bei 37 °C über Nacht. Es wurde das von Thermo Fisher Scientific vorgeschlagene Puffersystem verwendet. Um unspezifische Reaktionen der Enzyme zu vermeiden („Star-Activity“), wurden die Restriktionsverdaue separat voneinander durchgeführt. Zwischen den Schritten wurde der Einzelverdau über SigmaSpin Säulen (Sigma-Aldrich Art-Nr.: S5059-70EA ) gereinigt.

Die Reaktion wurde in einem 1 % igen Agarosegel auf Vollständigkeit überprüft.

#### Ligation

Für die Ligationsreaktion kamen drei unterschiedliche Vektoren zum Einsatz (Tab. 12). Für die direkte Klonierung aus PCR-Amplifikaten (blunt-end) ohne vorherigen Restriktionsverdau diente der pCR II-Blunt-Topo Vektor. Um Expressionsvektoren zu synthetisieren wurden die Plasmide 3150 (pcDNA3.1-Zeo-hFc) bzw. 3151 (pcDNA3.1-(A)-Myc/His) verwendet.

Die Blunt-End Ligation erfolgte nach Anleitung des Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit (22). Es wurden 3 µl des PCR Produkts eingesetzt.

Die Ligation über Sticky-Ends erfolgte in einem molaren Verhältnis Insert zu Vektor von 3:1 . Es wurden 50 ng linearisierter Vektor verwendet.

Das molare Verhältnis errechnet sich wie folgt:  $\frac{50 \text{ ng Vektor} * \text{bp Insert}}{\text{bp Vektor}} * 3/1$

Weitere Komponenten der Ligationsreaktion wurden nach dem Herstellerprotokoll der T4Ligase eingesetzt (vgl. 18)

Die Inkubation erfolgte bei 11 °C über Nacht.

### Spektralphotometrie: Quantitative & Qualitative Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden spektralphotometrisch über die Optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Für reine Nukleinsäuren liegt dieser Wert für DNA bei 1,8 und 2 für RNA bei 2,0.

### Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden elektrophoretisch über 1 % ige TAE-Agarosegele aufgetrennt. Um die Nukleinsäuren zu färben wurden den Gelen 0,05 % RotiSafe Gel Stain zugesetzt. Die Proben wurden mit 1/5 eines 5x Ladepuffers versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 Volt für 55 Minuten. RNAs wurden zuvor mit 50 % Formamid bei 99°C für 3 Minuten denaturiert.

### Sequenzierung

Sequenzierungen der Plasmidkonstrukte wurden von der Firma LGC Genomics durchgeführt (Flexi Run & Ready2Run).

### 3.12 Proteinbiochemie: Proteinsynthese, SDS-PAGE/Western Blot, Oberflächen

#### Gewinn rekombinanter Proteine aus Zellkulturüberständen

Zur Synthese solubler Fc-Chimären Proteine wurden CHO-2A10 Zellen mit Plasmiden aus Tabelle 13 nach dem oben beschriebenen Protokoll transfiziert. Die transfizierten Zellen sondern durch das in der Sequenz enthaltene Signalpeptid die rekombinanten Proteine in das Medium ab. Es wurden alle drei Tage 400 ml Medium Überstand (ÜS) abgenommen und durch frisches CD OptiCHO ersetzt. Der ÜS wurde bei 4000g und 4°C zentrifugiert um grobe Partikel zu entfernen und anschließend sterilfiltriert.

- Ultrafiltration: Tangentialfluss-Filtration (Vivaflow200) 2,5 Bar, 4 °C
- Affinitätschromatographie: Protein G Sepharose (HiTrap Protein G HP) 1 ml/min, 4°C
- Waschen: 10 ml PBS pH 7, 1 ml/min, 4 °C
- Elution: 25 ml Elutionspuffer pH 2.7, 1 ml/min, 4 °C
- Neutralisation: Neutralisationspuffer pH 9
- Konzentration/Umpuffern: Amicon Ultra-Filtrationssäule nach Herstellerangaben

Die Quantität wurde mittels Coomassiefärbung und Messung am Nanodrop gemessen. Die Reinheit der Proteine wurde in einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot überprüft.

#### Isolation rekombinanter Proteine aus Zellmembranen

- Waschen des Monolayers: 3x PBS
- Inkubation mit 1x SDS-Ladepuffer: 5 Minuten
- Abschaben und überführen in Reaktionsgefäß
- Sonifizieren: 5 Minuten
- Erhitzen: 5 Minuten, 95 °C

Nachdem die Zellfragmente zentrifugiert wurden, konnte der Proteinüberstand in einem SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert werden.

#### Bradford Assay: Quantitative und Qualitative Analyse von Proteinen

Konzentration und Reinheit von Proteinen wurden spektralphotometrisch mit Bradford Reagenz bestimmt (Coomassie Reagenz, Thermo Fisher Scientific). Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe (0-2mg/ml). Es wurde hierbei nach den Herstellerangaben verfahren.

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)/ Western Blot

Es wurde nach einem Standardprotokoll verfahren angelegt an Laemmli (1970)

- Probenvorbereitung: Denaturation: 5 min, 95 °C; Zentrifugation: 10 min, 4 °C, 13000g
- Inkubation mit 1x SDS-Ladepuffer: 5 min, 4 °C
- Konzentration im Sammelgel: etwa 20 min, 50 V
- Auftrennen im Trenngel: 1 h, 180 V
- Semiquantitative Analyse: ÜN RotiBlue Färbelösung, Entfärben mit 25 % Methanol

Zur Überprüfung der Zellkulturüberstände wurden Dot-Blots verwendet. Hierzu wurden 10 µl der des Überstandes auf eine aktivierte PVDF Membran aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde nach dem Protokoll für Western Blot verfahren. Hierbei wurde jeweils nur eine Stunde mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

Zur qualitativen Analyse wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern nachgewiesen.

- Aktivierung PVDF: 1 min, Methanol
- Äquilibration PVDF: 5 min, Blotpuffer
- Blot-Transfer: 2 h, 150 mA

Tabelle 31: Western Blot Antikörperinkubation

| Vorgang             | Lösung / Puffer                                       | Dauer     | Temperatur |
|---------------------|-------------------------------------------------------|-----------|------------|
| Blockierung         | 5 % Milchpulver in PBS-T                              | 1h        | 4 °C       |
| Primärantikörper    | Antikörper in 5 % Milchpulver in PBS-T                | ÜN        | 4 °C       |
| Waschen             | 5 % Milchpulver in PBS-T                              | 15 min    | RT         |
| Waschen             | PBS-T                                                 | 2x 15 min | RT         |
| Sekundärantikörper  | Antikörper in 5 % Milchpulver in PBS-T                | 2 h       | RT         |
| Waschen             | PBS-T                                                 | 3x 15 min | RT         |
| Waschen             | PBS                                                   | 3x 10 min | RT         |
| Lumineszenzreaktion | Chemilumineszenz Substrat<br>Thermo Fisher Scientific | 5 min     | RT         |

Dokumentation im Amersham Imager 600

### Funktionalisierung von Oberflächen

#### Reinigen von Deckgläsern

Für die Standard-Zellkultur wurden 18mm Deckgläser in Deckglashalterungen aufgereiht und autoklaviert.

Für die Kultivierung von Motoneuronen wurden die Deckgläser nach folgendem Schema gereinigt.

- Ultraschallbad Ethanol (50 %), 15 min
- Ethanol:Aceton (1:1), ÜN

- Ethanol (100 %), 5 min
- Sterilisation: 200 °C Inkubationsofen ÜN

Für fixierte Zellkulturen wurden 18mm Deckgläser verwendet. Zur Lebendzellbeobachtung wurden 24 mm Deckgläser verwendet, die in einer Magnethalterung eingefasst wurden.

#### **Beschichten von Deckgläsern für Zellkultur und Motoneuronen Primärzellkultur**

Homogene Beschichtung: Sandwich

- 80 bzw. 100 µl Proteinlösung zwischen zwei Deckgläser (18mm bzw. 24mm)
- 1 h, 37 °C
- Waschen mit PBS

Strukturierte Proteinbeschichtung mit Streifenmustern erfolgte nach dem an unserem Institut etablierten System (Weschenfelder et al., 2013).

### **3.13 Assays: Bead-Aggregation, Affinitäts-Sonden und Pulldown**

#### **Bead-Aggregation**

Es wurde nach dem Protokoll von Galuska et al. (2010) verfahren. Abweichend hiervon wurden bereits Protein A beschichtete Partikel verwendet.

Vorbereiten der Partikel:

- Waschen der Partikel: 20 µl Partikel (2 %) 3x 0,5 % BSA
- Zentrifugation: 13000g, 5 min
- Aufnehmen in 200 µl 0,5 % BSA Lösung
- Sonifizieren im Ultraschallbad: 30 s

Proteinbeschichtung:

- Zugabe von 10 µg rekombinanter Fc-Chimären
- Absorption an Protein A: über Nacht, RT (leicht schüttelnd).
- Zentrifugation: 13000g, 5 min
- Waschen: 3x 0,5 % BSA Lösung

Die Aggregation wurde in einer 1:12 Verdünnung in µ-Wells dokumentiert.

Die Abhängigkeit von polySia wurde mittels *in vitro* Polysialylierung untersucht. Es wurde nach dem Protokoll von Mühlenhoff et al. (1996) verfahren.

Nach der Protein-Beschichtung der Partikel wurde der Ansatz halbiert. Ansatz 1 diente der Proteininteraktion ohne polySia, Ansatz 2 wurden polysialyliert.

Die Aggregation wurde über einen Zeitraum von 1-3 Stunden beobachtet. Nach einer Stunde wurden fünf zufällig gewählte Ausschnitte aufgenommen (40x Ölimmersion) und für die qualitative Analyse verwendet. Ein repräsentativer Ausschnitt wurde mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv aufgenommen.

### Computergestützte Auswertung

Das für die Datenanalyse verwendete Programm wurde von Michael Schwan in Matlab programmiert.

1. Bild mit Mikroskopaufnahme laden (Matlab-Funktion: *imread*)
2. Bild in Graustufen mit Farbwerten von [0-255] umwandeln (Matlab-Funktion: *rgb2gray*)
3. Konturen der Bead-Aggregate bei Farbwert 20 berechnen (Matlab-Funktion: *contour*)
4. Fläche der einzelnen Aggregat-Konturen berechnen (Matlab-Funktion: *polyarea*). Ein Bildpunkt entspricht  $0,04818025 \mu\text{m}^2$ .
5. Anzahl der Beads pro Aggregat berechnen mit  $\frac{\text{Fläche Aggregat in } \mu\text{m}^2}{\text{Fläche in } \mu\text{m}^2 \text{ pro 1 Bead}}$ , wobei für die Fläche eines Beads  $2\pi r^2$  mit  $r = 0.25 \mu\text{m}$  angenommen wird. Das Ergebnis wird gerundet (Matlab-Funktion: *round*).
6. Die Flächen aller Aggregate mit gleicher Anzahl Beads aufsummieren
7. Die Flächen der Aggregate mit gleicher Anzahl Beads mit der Gesamtfläche aller Aggregate normieren

Schritte 1 - 7 werden für alle Bilder wiederholt und der Durchschnitt berechnet (Matlab-Funktion *mean*)

### Pulldown-Assay

Es 50 Embryonen nach 18 hpf betäubt und dechorioniert. Der Dotter wurde mechanisch und enzymatisch mit Hilfe von Deyolkingbuffer entfernt. Die Embryonen wurden mit Proteinase- und Phosphatase Inhibitoren gewaschen und anschließend mit 250  $\mu\text{l}$  RIPA Puffer homogenisiert. Die Zellreste wurden pelletiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

1. Vorbereitung der Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Art-Nr.: 17-0618-01 )
  - Waschen: 100  $\mu\text{l}$  der Sepharose-Suspension: 3x mit PBS
  - Resuspension: 200  $\mu\text{l}$  PBS
2. Präadsorption des RIPA-Lysats (unspezifische Bindungen an Protein G):
  - Präadsorption: RIPA-Lysat mit 50  $\mu\text{l}$  Sepharose-Suspension, 1 Stunde drehend,  $4^\circ\text{C}$
  - Überstand (Preclear-ÜS) in neues Reaktionsgefäß überführen
3. Präzipitation des Antikörpers oder rekombinanten Proteins und Pulldown:
  - Adsorption an Interaktionspartner: 5  $\mu\text{g}$  Fc-Chimärenprotein mit Preclear-ÜS, ÜN drehend,  $4^\circ\text{C}$
  - Pulldown: 100  $\mu\text{l}$  Partikel zugegeben, 3 h drehend,  $4^\circ\text{C}$
  - Waschen: 3x PBS
  - Elution des Proteinkomplex: 2x SDS Puffer ohne Bromphenolblau

Die Proteinkonzentration wurde spektralphotometrisch gemessen. Zur Analyse im SDS-PAGE/Western Blot wurde die Probe auf 1xSDS Puffer verdünnt und mit Bromphenolblau und 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt.

#### **Affinitäts-Sonden**

Affinitäts-Sonden dienen dem Nachweis von Proteininteraktionen im Gesamtsystem. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Die Zell-Overlay-Assays und die *Whole Mounts* Overlay Assays.

#### **Zellen Overlay Assay**

Die Zell-Overlay-Assays dienen dem Interaktionsnachweis neuronaler Zellerkennungsmoleküle sowie die Abhängigkeit dieser Interaktionen von polySia. Hierfür wurden CHO-2A10 und CHO-K1 Zellen nach oben beschriebenen Protokoll transfiziert und selektioniert.

- Aussähen: 24 hvor Assay, 25000 Zellen, homogenen Fibronektinsubstraten (18mm)
- Waschen: 3x 5 min PBS gewaschen
- Adsorption: 100 µl (20 µg/ml) Fc-Chimären Protein 1 Stunde RT
- Waschen: 3x PBS.

Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgte nach oben beschriebenen Protokoll (Tab. 28).

***Whole Mount Overlay-Assay*** Die Affinitätssonde wurde nach dem Protokoll von Ott et al. (2001) eingesetzt.

Die Embryonen wurden nach oben beschriebenen Protokoll behandelt (27). Die Inkubation der Embryonen mit rekombinantem Protein erfolgte äquivalent zum Primärantikörper bei 4 °C für 2 Tage. Ein Primärantikörper wurde wenn nötig nach einem Tag zu der Lösung zugegeben.



## 4 Ergebnisse

Wachstumskegel müssen auf dem Weg zu ihrer Zielregion mit unterschiedlichen Zellen interagieren, die die Wegfindung der Neurone beeinflussen. Viele unterschiedliche Moleküle und Mechanismen sind an diesem Prozess beteiligt (Übersichtsartikel: Tessier-Lavigne & Goodman, 1996. Neuronale Zell Erkennungsmoleküle vom NCAM-Typ spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Beispielsweise beeinflusst NCAM1 Axonwachstum, Wegfindung und Faszikulation von Axonbündeln (Rutishauser & Landmesser, 1996; Seidenfaden et al., 2006; Tessier-Lavigne & Goodman, 1996). NCAM1 ist der Hauptträger der Glykanmodifikation Polysialinsäure (Schnaar et al., 2014). Axonales Wachstum und Faszikulation wird durch an NCAM gebundenes polySia sterisch sowie regulatorisch beeinflusst (Übersichtsartikel: Hildebrandt et al., 2007; Schnaar et al., 2014).

### 4.1 Ncam1-Paraloge und Polysialinsäure werden in vivo für geordnetes Auswachsen spinaler Motoneurone benötigt

Wird im Zebrafisch die Expression der Ncam1-Paraloge durch Morpholino-Knockdown gestört, führt dies zu einer morphologischen Veränderung des Spinalnervs (Langhauser et al., 2012). Wird durch Knockdown der Sialyltransferase St8SiaII nur polySia-freies Ncam1 exprimiert, führt dies zu keiner augenscheinlichen Veränderung spinaler Nerven. Beispielsweise kommt es aber zur starken Defaszikulation der posterioren Kommissur im Gehirn (Marx et al., 2001).

Diese vorausgegangenen Arbeiten waren Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Es wurden die Ncam1-Paraloge, sowie in Teilen auch Tag-1 und Neurolin hinsichtlich ihrer Interaktionen untersucht. Welche Bedeutung diese neuronale Zellerkennungsmoleküle bei der Entwicklung des Nervensystems haben und welchen Einfluss polySia auf diese Protein-Protein Wechselwirkungen nimmt, war zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Sie wurde am Beispiel der Wegfindung spinaler Motoneuronen über funktionelle Studien mittels Morpholino-Knockdown an *Whole Mount* Embryonen untersucht. Dazu wurde eine detaillierte Beschreibung der Motoneuronen Phänotypen angefertigt und Veränderungen, die sich nach einem Knockdown ergaben, statistisch evaluiert. Außerdem wurden *Rescue* Experimente durchgeführt, um die Spezifität der verwendeten Ncam1-Morpholinos zu zeigen und *Off-Target* Effekte auszuschließen.

Um die Expression der neuronalen Zellerkennungsmoleküle zu inhibieren, wurden 3 - 4 ng des Morpholios in das Einzell-Stadium hb9::GFP transgener Zebrafische injiziert. Die Auswertung der Motoneuronenbündel erfolgte fluoreszenzmikroskopisch aller injizierten Embryonen ohne Bewertung der Knockdowneffizienz. Die auftretenden Kategorien sind durch eine Reihe von Zwischenformen verbunden, sodass die morphologischen Beobachtungen jeweils der hierarchisch höheren Kategorie zugeordnet werden.

#### 4.1.1 Charakterisierung der auftretenden Motoneuronen Phänotypen im *Whole Mount* Embryo

Im Zebrafisch projizieren ab dem 18 - 20 Somiten-Stadium primäre Motoraxone (RoP, MiP und CaP) in einem stereotypen Muster zu den unterschiedlichen Zielregionen im Myotom (P. Z. Myers et al., 1986). Zwischen 24 und 72 hpf folgen die sekundären Motoraxone zunächst entlang des *Common Path* bis zum horizontalen Septum. An diesem Entscheidungspunkt bilden Gruppen von Axonen eine ventrale, eine rostrale und eine dorsale Projektion (Eisen, 1991).

Um diese Projektionsmuster zu kategorisieren und Veränderungen nach einem Morpholino-Knockdown zu beschreiben, wurden vier Kategorien definiert. Die motoneuronalen Phänotypen lassen sich hierarchisch in (A) **Unverändert**, (B) **Defaszikuliert**, (C) **Aberrante Seitenäste** und (D) **Aberrante Ventralprojektion** kategorisieren (Abb. 9). Augenmerk lag auf dem Verlauf des *Common Path* sowie der Rostral- und Ventralprojektion. In etwas veränderter Form wurden die hier etablierten Kategorien in einer von mir eng betreuten Masterarbeit bereits beschrieben (Walter, 2014).

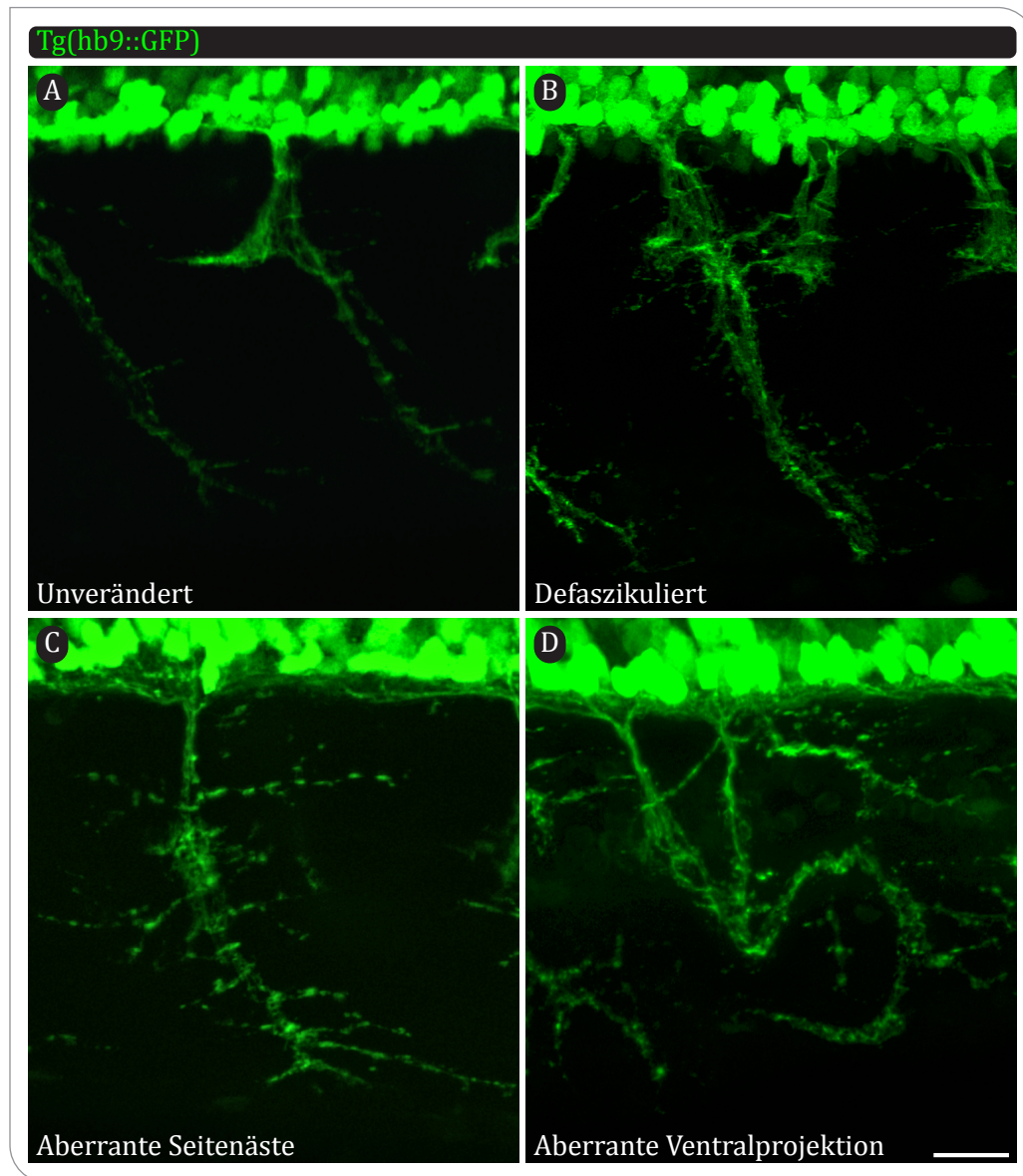


Abbildung 9: Motoneuronen-Phänotypen im *Whole Mount Embryo*. GFP exprimierende Motoneurone projizieren ihre Axone in die Somiten (grün, Tg(hb9::GFP)). Lateralausschnitte von Konfokalaufnahmen 48 hpf alter Embryonen, cranial ist links. Die Projektionsmuster wurden vier hierarchischen Kategorien zugeordnet. (A) Die Motoraxone projizieren unverändert in die Zielregion. (B) Sind die Axonbündel aufgespalten, werden sie der Kategorie Defaszikuliert zugeordnet. (C) Aberrante Seitenäste verlassen den Hauptpfad und (D) die Motoraxone projizieren mit ungewöhnlichem Verlauf in die Peripherie. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Bei Motoneuronen, die der Kategorie **Unverändert** zugeordnet wurden, verlaufen die Axone auf stereotypen Wegen aus dem Rückenmark und innervieren die Myotome. Das dicht gepackte Axonbündel beschreibt einen bogenförmigen Verlauf nach caudal (Abb. 9 A). Sind die Axonbündel wenig gepackt, zeigt die Projektion ansonsten aber die charakteristische Bogenform, zählen sie zu der Ka-

tegorie **Defaszikuliert** (Abb. 9 B). Verlassen einzelne Axone oder Bündel den typischen Verlauf, projizieren caudal oder rostral davon und erscheinen verzweigt entsprechen diese der Kategorie **Aberrante Seitenäste** (Abb. 9 C). Tritt eine Missprojektion der Ventralprojektion auf und das Axonbündel projiziert nicht mehr medial in das jeweilige Hemisegment, wird von einer **Aberranten Ventralprojektion** gesprochen (Abb. 9 D).

#### 4.1.2 Auftreten der Kategorien in Kontrollen

Alle vier Kategorien treten in uninjizierten Kontrollen (w/o I) zu unterschiedlichen prozentualen Anteilen auf (Abb. 10). Der Anteil an unveränderten Projektionen in uninjizierten Kontrollen tritt zu  $87 \% \pm 10$  auf und repräsentiert den Hauptphänotypen ( $N = 8$ ,  $n = 235$ ). Injiziert man ohne (w/o MO;  $79 \% \pm 3$ ,  $N = 3$ ,  $n = 99$ ) oder mit Kontroll-Morpholino (C-MO;  $76 \% \pm 7$ ,  $N = 13$ ,  $n = 311$ ) verändert sich die prozentuale Verteilung der Kategorien marginal (w/o I vs. w/o MO:  $\chi^2$ : n.s.,  $p \geq 0,01$  bzw. w/o I vs. C-MO:  $\chi^2$ : n.s.,  $p \geq 0,01$ ). In der C-MO Injektion treten die Kategorien Defaszikuliert zu  $8 \% \pm 6$ , Aberrante Seitenäste zu  $11 \% \pm 6$  und Aberrante Ventralprojektion zu  $5 \% \pm 5$  auf und machen damit insgesamt nur etwa 1/4 der Phänotypen aus. In den folgenden Kapiteln wird die C-MO Injektion als Vergleichsgruppe verwendet.

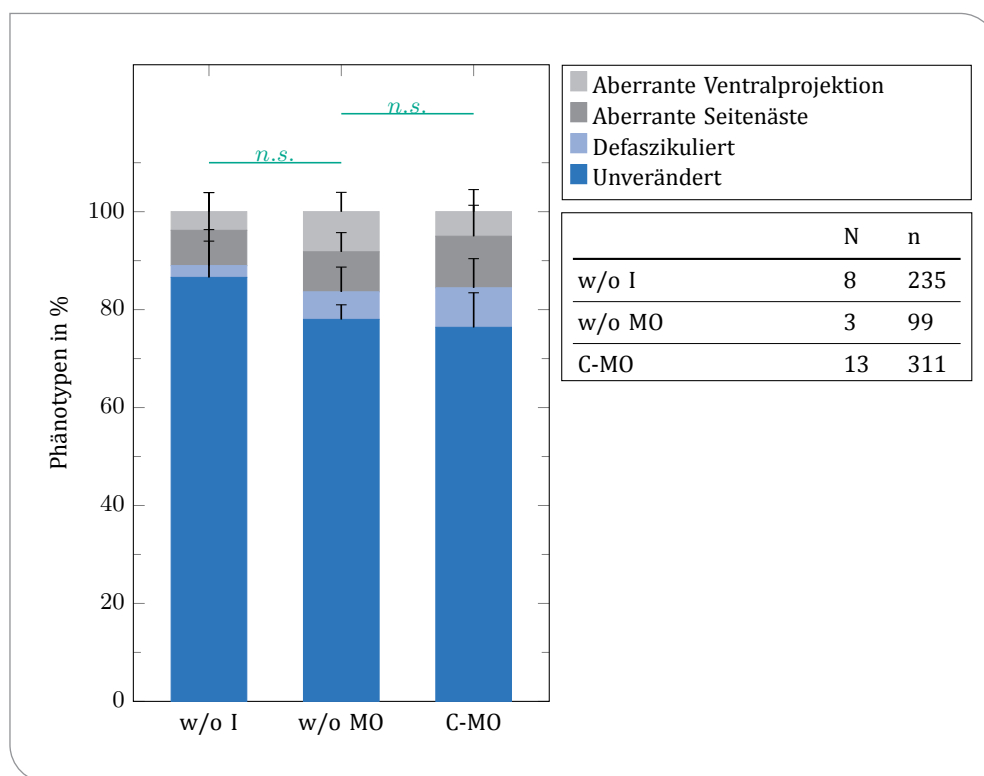


Abbildung 10: Quantifizierung des Projektionsmusters von Motoraxonen in unterschiedlichen Kontrollen. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Phänotypen-Verteilung. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.). Abkürzungen: w/o I: ohne Injektion, w/o MO: Injektion ohne Morpholino, C-MO: Kontroll-Morpholino-Injektion, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Embryonen, n.s.: nicht signifikant.

#### 4.1.3 *ncam1a*-Knockdown führt in *Whole Mounts* zur Defaszikulation von Motoneuronen

Ncam1a wird nach 48 hpf auf Zellkörpern des Rückenmarks (rm), auf der Floorplate (fp) und auf Motoraxonen (ma) exprimiert (Lateralansicht C-MO (Abb. 11 A', magenta; siehe auch Langhauser et al., 2012). In der Kontrolle projizieren die GFP exprimierenden Motoneurone ihre Axone faszikuliert und leicht bogenförmig in die Zielregionen des Myotoms (Abb. 11 A'', grün). Wird die Expression von Ncam1a durch einen spezifischen Knockdown blockiert, kann dies durch einen Immunnachweis bestätigt werden. Die Ncam1a Expression auf den Zellkörpern des Rückenmarks, der Floorplate und auf den Motoneuronen ist nahezu vollständig unterdrückt (Abb. 11 B'). *ncam1a*-defiziente Motoneurone verlieren die typische Bogenform und projizieren ungeordnet in die Myotome (Abb. 11 B'' grün). Ein *ncam1b*-Knockdown inhibiert nicht die Expression seines Paralogs. Ncam1a wird weiterhin auf Zellen des Rückenmarks, der Floorplate und auf Motoneuronen exprimiert (Abb. 11 C; für *ncam1b*-Knockdown vergleiche auch Abb. 13 Abschnitt 4.1.4).

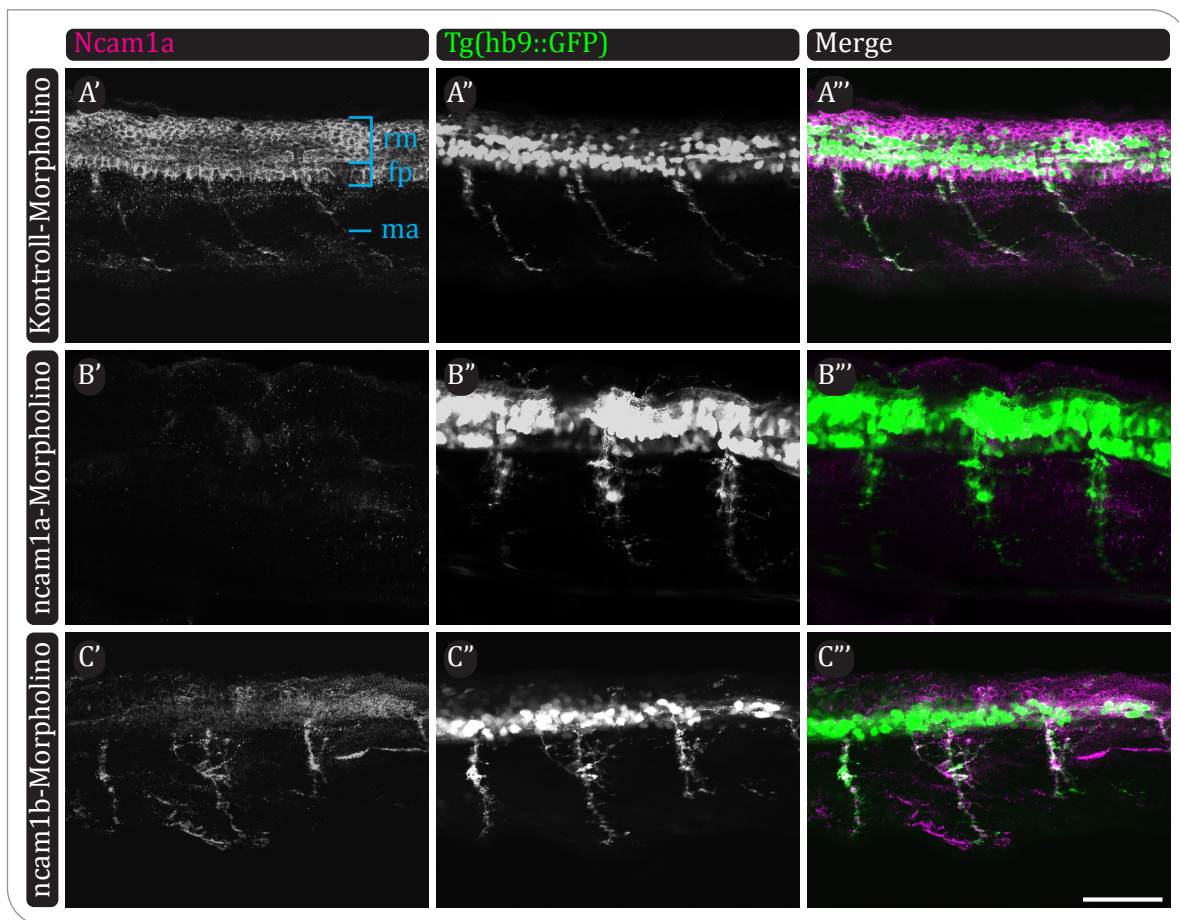


Abbildung 11: Der *ncam1a*-Knockdown verhindert spezifisch die Expression von Ncam1a und führt im *Whole Mount* zu einem veränderten Motoraxon-Phänotypen. Die Motoneurone exprimieren GFP unter dem motoneuronen spezifischen Promotor hb9. Die Immunfärbung wurde mit einem Ncam1a-spezifischen Antikörper durchgeführt (Langhauser et al., 2012). Lateralanschnitte von Konfokalaufnahmen 48 hpf alter Embryonen, cranial ist links. (A) Kontroll-Morpholino-Injektion mit Ncam1a Immunnachweis auf GFP exprimierenden Motoneuronen. (B) Die *ncam1a*-Morpholino-Injektion führt zu veränderten Projektionen der Motoraxone. (C) Ein spezifischer *ncam1b*-Knockdown verändert die Expression von Ncam1a nicht. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 50 µm. Abkürzungen: rm: Rückenmark, fp: Floorplate, ma: Motoraxon.

Der *ncam1a*-Knockdown führt augenfällig zur morphologischen Veränderung motoneuronaler Projektionen. Dies wurde bereits beschrieben, allerdings nicht unter dem Aspekt der Funktionalität von Ncam1a (Langhauser et al., 2012). Betrachtet man die Veränderungen hinsichtlich der aufgestellten Kriterien führt der Knockdown von *ncam1a* zu einem ausgeprägten Anstieg defaszikulierter Motoraxonbündel ( $30 \% \pm 7$ ; Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ) mit einer daran gebundenen Reduktion des unveränderten Phänotypen ( $45 \% \pm 7$ ). Aberrante Seitenäste ( $18 \% \pm 5$ ; Zweistichproben-t-Test, zweiseitig:  $p \geq 0,01$ ) und aberrante Ventralprojektionen ( $8 \% \pm 7$ ; Zweistichproben-t-Test, zweiseitig:  $p \geq 0,01$ ) treten kaum vermehrt auf. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Ncam1a-Morphanten (A-MO:  $N = 10$ ,  $n = 427$ ) ist hoch signifikant (Abb. 12;  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ). Die Verteilung der Phänotypen nach Koinjektion mit 0,6 ng/nl *ncam1a* Rescue mRNA (A-Rescue) bestätigt die Spezifität des *ncam1a*-Morpholinos. Die Verteilung der Phänotypen entspricht der in der Kontrolle ( $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ).

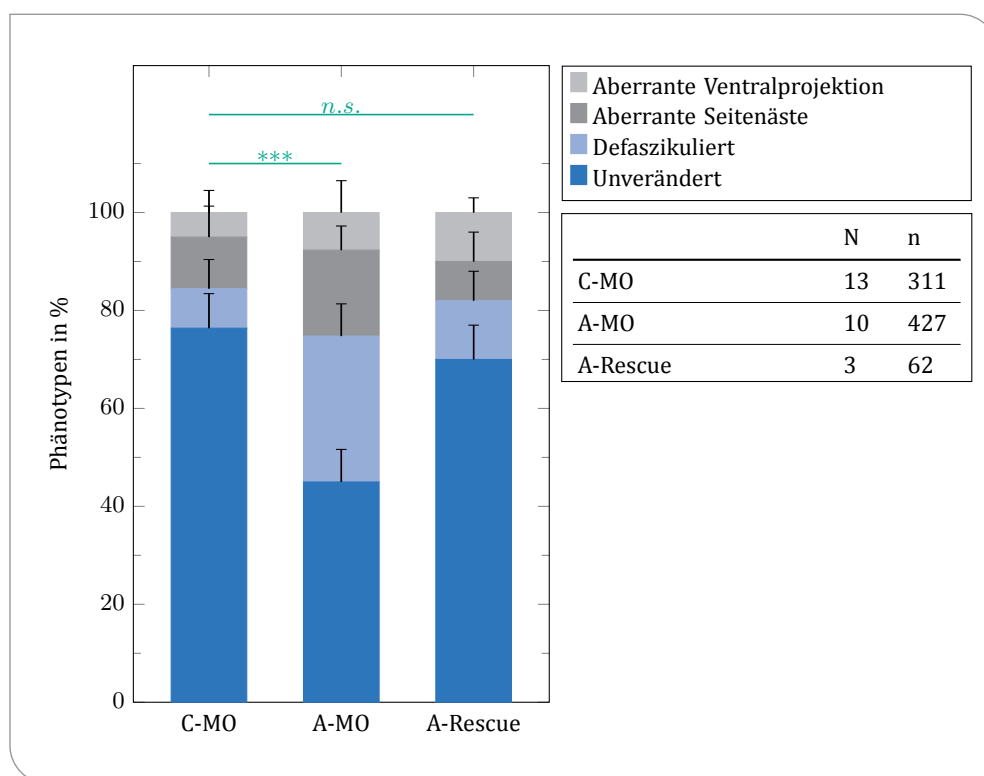


Abbildung 12: Quantifizierung des Projektionsmusters Ncam1a-defizienter Motoraxone im Vergleich mit Kontrolle und Rescue im *Whole Mount*. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*\*). Abkürzungen: C-MO: Kontroll-Morpholino-Injektion, A-MO: *ncam1a*-Morpholino-Injektion, A-Rescue: *ncam1a* Rescue, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Embryonen, n.s.: nicht signifikant.



#### 4.1.4 Knockdown von *ncam1b* führt im *Whole Mount* zu aberranten Projektionsmustern von Motoraxonen

Ähnlich wie Ncam1a wird auch das Paralog Ncam1b nach 48 hpf auf Zellen des Rückenmarks (rm) und auf Motoraxonen (ma) exprimiert (Lateralansicht Kontroll-Morpholino, Abb. 13 A', magenta; siehe auch Langhauser et al., 2012). Ein Unterschied besteht darin, dass Ncam1b auch auf den umliegenden Geweben wie auf den Myotomen (m) vorhanden ist, allerdings nicht auf der Floorplate exprimiert wird. Die Motoraxone wachsen gerichtet in die Myotome ein (Abb. 13 A'', grün). Der *ncam1b*-spezifische Knockdown blockiert die Expression von Ncam1b auf allen Strukturen (Abb. 13 B') und führt zu einer deutlichen morphologischen Veränderung der Projektion der Motoraxone (Abb. 13 B''). Die Expression von Ncam1b wird durch einen *ncam1a*-spezifischen Knockdown nicht beeinflusst (Abb. 13 C; für *ncam1a*-Knockdown vergleiche auch Abb. 11, Abschnitt 4.1.3).

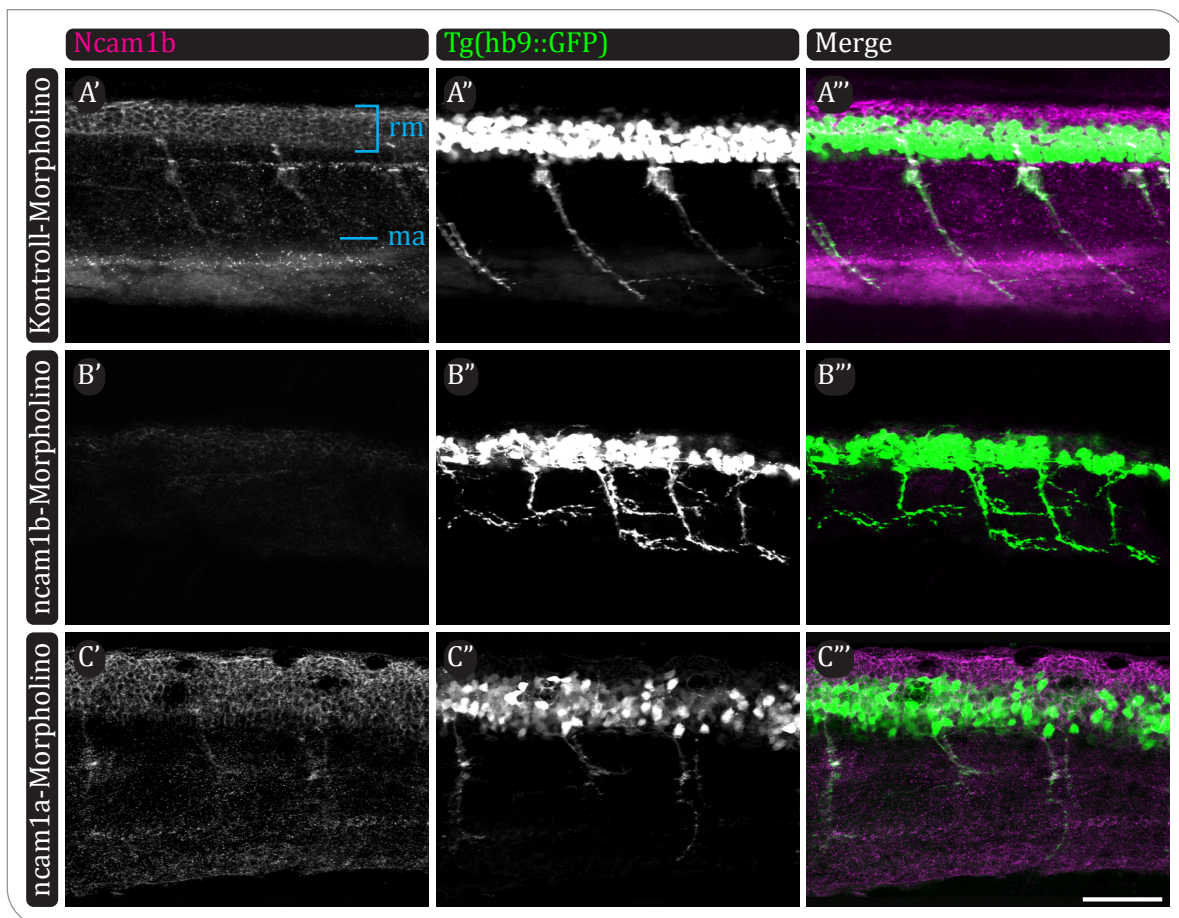


Abbildung 13: *ncam1b*-Knockdown verhindert spezifisch die Expression von Ncam1b und führt im *Whole Mount* zu einem stark veränderten Motoraxon-Phänotypen. Die Motoneurone exprimieren GFP unter dem motoneuronen spezifischen Promotor *hb9*. Die Immunfärbung wurde mit einem Ncam1b-spezifischen Antikörper durchgeführt (Langhauser et al., 2012). Gezeigt ist ein konfokaler Lateralanschnitt eines 48 hpf alten Embryos, cranial ist links. (A) Ncam1b Expression auf GFP exprimierenden Motoneuronen im *Whole Mount* Embryo nach Kontroll-Morpholino-Injektion. (B) Die *ncam1b*-Morpholino-Injektion führt zum Expressionsverlust von Ncam1b und die Motoraxone projizieren in ungeordnetem Muster in die Myotome. (C) Eine *ncam1a*-Morpholino-Injektion beeinflusst die Expression von Ncam1b nicht. Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 50  $\mu$ m. Abkürzungen: rm: Rückenmark, ma: Motoraxon.

Wird die Expression von Ncam1b inhibiert, kommt es zu einer hoch signifikanten Veränderung der Kategorienverteilung im Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 14, B-MO: N = 12, n = 382,  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ). Der Knockdown führt zu einem hoch signifikanten Anstieg aberranter Seitenäste (36 %  $\pm$  12; Zweistichproben-t-Test  $p < 0,001$ ) und aberranter Ventralprojektionen (25 %  $\pm$  9; Zweistichproben-t-Test  $p < 0,001$ ). Der Expressionsverlust von Ncam1b hat keinen Einfluss auf die Faszikulation von Motoraxonen (10 %  $\pm$  8; Zweistichproben-t-Test, zweiseitig:  $p \geq 0,01$ ). Die durch die Morpholino-Injektion hervorgerufenen Effekte sind spezifisch. Sie können mittels Koinjektion von Morpholino und *ncam1b* Rescue-RNA (B-Rescue) kompensiert werden ( $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ).

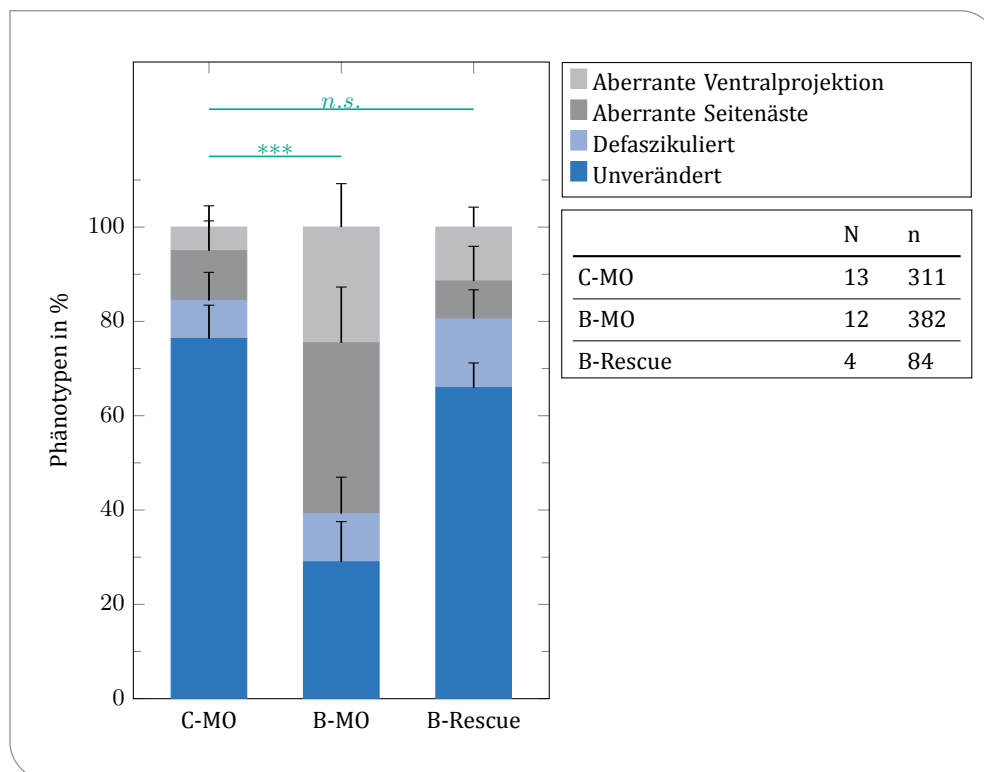


Abbildung 14: Quantifizierung des Projektionsmusters Ncam1b-defizienter Motoraxone im *Whole Mount*. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*\*) . Abkürzungen: C-MO: Kontroll-Morpholino-Injektion, B-MO: *ncam1b*-Morpholino-Injektion, B-Rescue: *ncam1b* Rescue, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Embryonen, n.s.: nicht signifikant.

#### 4.1.5 Knockdown der Polysialyltransferase St8SialII bewirkt im *Whole Mount* die Defaszikulation von Motoraxonen.

Das Projektionsmuster der Motoraxone wird durch den Knockdown von Ncam1a und Ncam1b beeinflusst, unklar war jedoch auf welchen Effekten diese Beobachtungen beruhen. Da Ncam1a und Ncam1b die Hauptträger der Polysialinsäure (polySia) sind (Langhauser et al., 2012), können die beobachteten Veränderungen im Phänotyp sowohl auf der Elimination der Ncam1-Proteine als auf der des Verlustes der polySia beruhen. Um dies zu untersuchen wurden Morpholino-Knockdowns durchgeführt, die spezifisch die Expression der Polysialyltransferase St8SialII blockieren.

polySia wird nach 48 hpf auf den Zellen des Rückenmarks (rm), der Flooplate (fp) und auf den Motoraxonen (ma) gebildet (Lateralansicht C-MO; Abb. 15 A', magenta; siehe auch Marx et al., 2001). Die Projektion der Motoraxone ist in der Kontrolle unverändert (Abb. 15 A'', grün). Da polySia im Zebrafisch hauptsächlich durch St8SialII gebildet wird (Marx et al., 2007), verhindert ein Knockdown von *st8sialII* die Bildung von polySia (Abb. 15 B'). Die Motoraxone defaszikulieren, projizieren dennoch in ihre Zielregion (Abb. 15 B'').

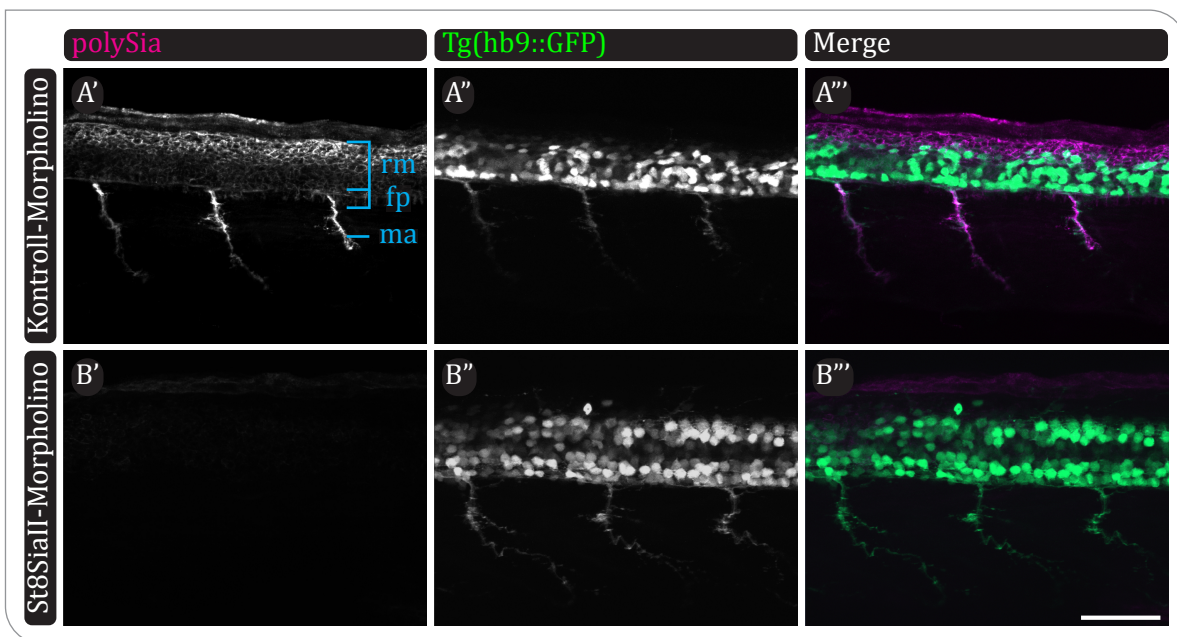


Abbildung 15: Verlust der Glykanmodifikation Polysialinsäure im *Whole Mount* Embryo führt zu veränderten motoraxonalen Projektionen. Die Motoneurone exprimieren GFP unter dem motoneuronen-spezifischen Promotor hb9. Gezeigt ist ein lateraler Konfokalausschnitt zu 48 hpf, cranial ist links. (A) Immunnachweis der Glykanmodifikation polySia auf Zellen des Rückenmarks (rm), der Floorplate (fp) und auf den Motoneuronen sowie deren Axone (ma) nach Injektion des Kontroll-Morpholinos. (B) Die Injektion des *st8sialII*-Morpholinos verhindert die Synthese von polySia wodurch sich die Projektionsmuster der Motoraxone verändern. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 50  $\mu$ m. Abkürzungen: rm: Rückenmark, fp: Floorplate, ma: Motoraxon.



Augenscheinlich beeinflusst auch der Wegfall der Sialyltransferase und damit die Synthese der polySia, das Projektionsmuster der Motoraxone. Der Unterschied zwischen Kontrolle und *st8siall*-Knockdown ist hoch signifikant (Abb. 16, *st8siall*-MO: N = 6, n = 193,  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ). Der Verlust der Glykanmodifikation führt in  $36 \% \pm 7$  zur hoch signifikanten Defaszikulation der Motoraxone im Vergleich mit der Kontrolle (Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ), wohingegen die Zielfindung unbeeinflusst bleibt (Zweistichproben-t-Test, zweiseitig: Aberrante Seitenäste:  $p \geq 0,01$ ; Aberrante Ventralprojektion:  $p \geq 0,01$ ).

Rescue-Experimente haben gezeigt, dass die zusätzliche Injektion von polySia die auftretenden Phänotypen retten kann (Marx et al., 2001).

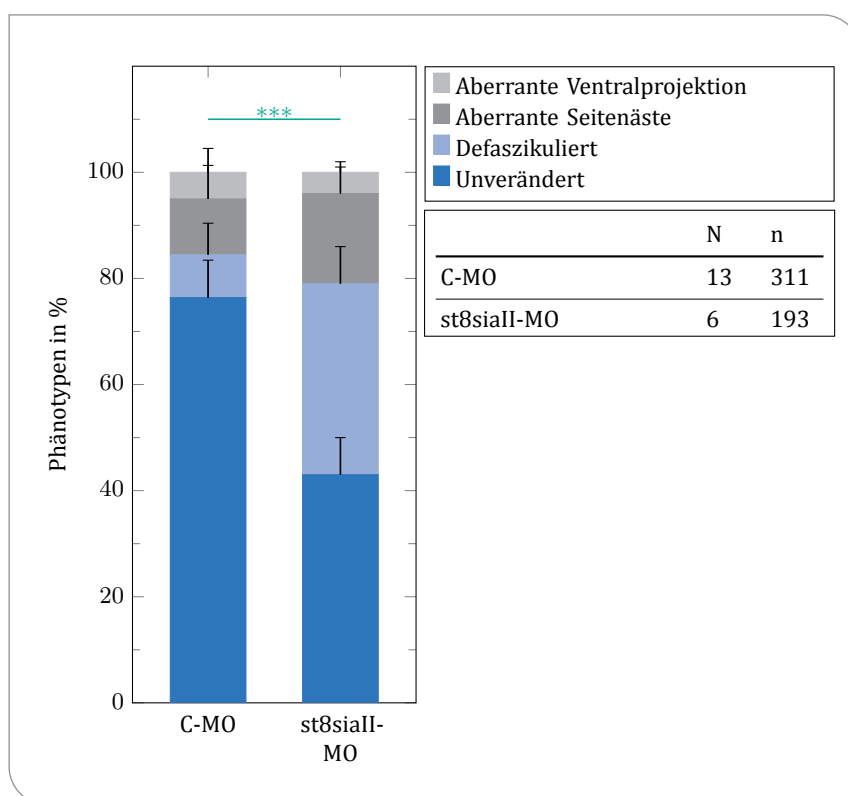


Abbildung 16: Quantifizierung des Projektionsmusters polySia defizienter Motoraxone *Whole Mount*. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,001$  (\*\*\*). Abkürzungen: C-MO: Kontroll-Morpholino-Injektion, *st8siall*-MO: *st8siall*-Morpholino-Injektion, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Embryonen.

#### 4.1.6 Effekte von Tag-1 und Neurolin auf die Projektionen von Motoraxonen

Nachdem die Effekte der Ncam1-Paralogen und polySia untersucht wurden, konnten offensichtliche funktionelle Unterschiede zwischen Ncam1a und Ncam1b festgestellt werden. Wohingegen Ncam1a die Faszikulation von Motoneuronen beeinflusst, steuert Ncam1b Wegfindungsprozesse. Die Funktion von polySia scheint tendenziell eher mit Ncam1a assoziiert zu sein und beeinflusst die Faszikulation. Dies widerspricht den Angaben von Marx et al., 2001.

Um mögliche Interaktionspartner der Ig-Superfamilie von Ncam1a und Ncam1b eingrenzen zu können, wurde exemplarisch der Einfluss von Tag-1 und Neurolin als Mitglieder der Ig-Superfamilie auf deren Funktionen in Auswachsen und Wegfindung von Motoneuronen zu ermitteln, um diese später mit Interaktions-Assays als potentielle Bindepartner der Ncam1-Paralogen zu identifizieren.

### Knockdown von Tag-1 im *Whole Mount* hat nur milde Effekte auf Motoraxonprojektionen

Das GPI-verankerte *Transient Axonal Glycoprotein-1* (Tag-1) wird über die Dauer der Axogenese auf den meisten motoneuronalen Axonen exprimiert (Dodd et al., 1988). Es ist ein aus dem Huhn bekannter Interaktionspartner von NCAM1 (Milev et al., 1996). Funktionelle Studien hinsichtlich motoneuronaler Wegfindung in der Entwicklung sind bisher nicht erfolgt, allerdings spielt es eine essenzielle Rolle im initialen Aussenden von Wachstumskegeln sowie dem Wachstum und der Faszikulation von Axonen des Mittelhirns (Wolman et al., 2008). Außerdem wird Tag-1 eine regenerative Funktion adulter Rückenmarke nach einer Läsion zugesprochen (Lin et al., 2012).

Tag-1 wird nach 48 hpf auf Motoraxonen (ma) exprimiert (Lateralansicht C-MO; Abb.17 A', magenta). Wie zuvor beschrieben, wachsen die GFP exprimierenden Motoraxone der Kontrolle faszikuliert und leicht bogenförmig in die Zielregionen ein (Abb. 17 A'', grün). Die Effizienz des *tag-1*-Knockdowns, kann durch einen Immunnachweis mit einem Tag-1 Antikörper bestätigt werden (Abb. 17 B'). Tag-1-defiziente Motoneurone projizieren weiterhin in die Myotome (Abb.17 B'', grün).

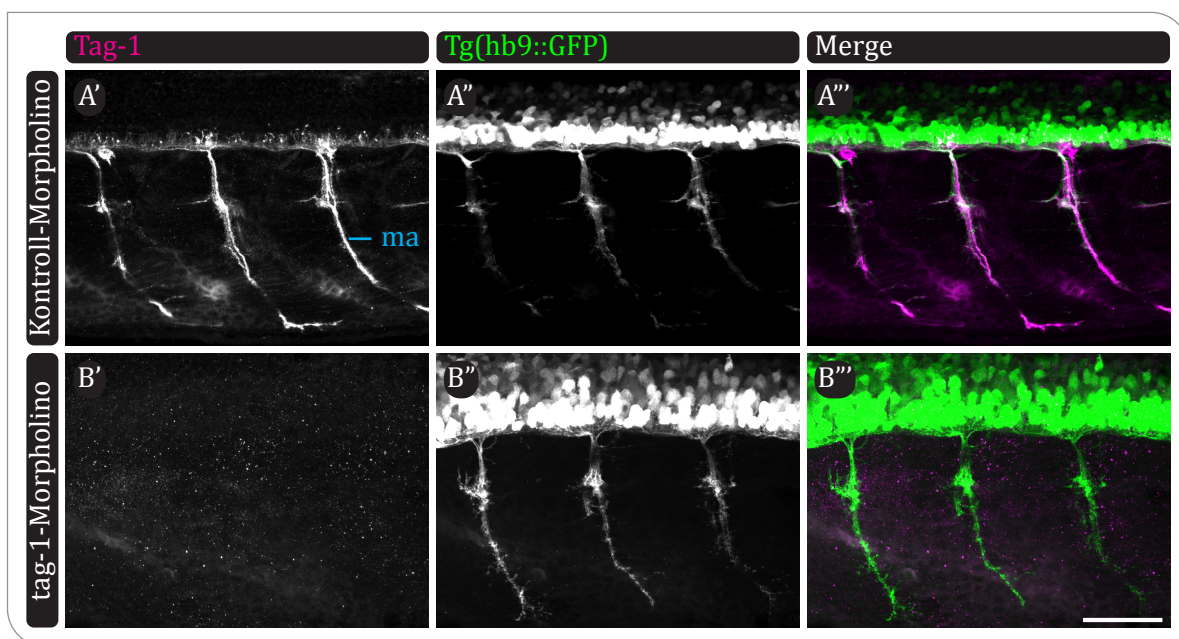


Abbildung 17: Ein *tag-1*-Knockdown im *Whole Mount* Embryo führt zu keinen augenscheinlichen Veränderungen motoraxonomer Projektionen. Die Motoneurone exprimieren GFP unter dem motoneuronen-spezifischen Promotor hb9. Gezeigt ist ein lateraler Konfokalausschnitt zu 48 hpf, cranial ist links. (A) Tag-1 wird auf Axonen der Motoneurone (ma) exprimiert. (B) Die Injektion von 6-8 ng des *tag-1*-Morpholinos verhindert die Synthese des Proteins was zu keiner offensichtlichen Veränderung der axonalen Projektion führt. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 50  $\mu$ m. Abkürzungen: ma: Motoraxon.

Im Gegensatz zu den Effekten der Ncam1-Paralogen, führt der Expressionsverlust von Tag-1 zu keiner signifikanten Veränderung der Kategorienverteilung. Ein  $\chi^2$ -Test zwischen Kontroll-Morpholino-Injektion und *tag-1*-Morpholino-Injektion ergibt keinen signifikanten Unterschied auf dem Niveau von  $p \geq 0,01$  (Abb. 18, Tag1-MO: N = 6, n = 197,  $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ). Wird das Signifikanzniveau auf  $p \geq 0,04$  verringert, tritt ein statistisch errechenbarer Wert auf, der durch den *tag-1*-Knockdown erzielt wird. Deutlich ist allerdings, dass der Knockdown zu einem hoch signifikanten Anstieg defaszikulierter Axonbündel ( $20 \% \pm 8$ ; Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ), wobei die anderen Kategorien nahezu unbeeinflusst bleiben (Zweistichproben-t-Test, zweiseitig:  $p \geq 0,01$  gilt für Unverändert, Aberrante Seitenäste, Aberrante Ventralprojektion).

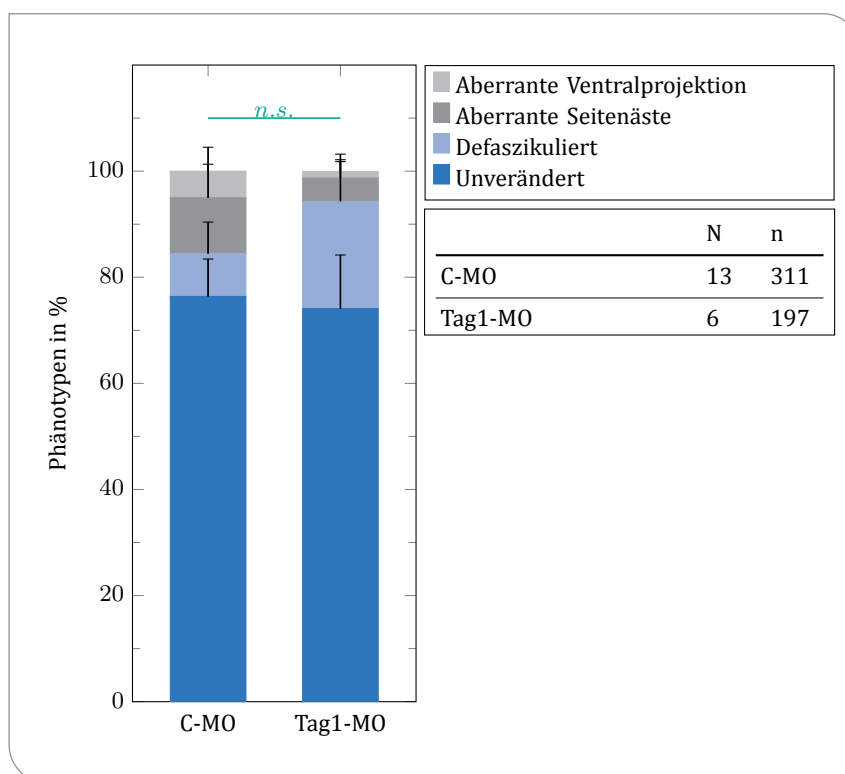


Abbildung 18: Quantifizierung des Projektionsmusters Tag-1 defizienter Motoraxone *Whole Mount*. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.). Abkürzungen: C-MO: Kontroll-Morpholino-Injektion, Tag1-MO: *tag1*-Morpholino-Injektion, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Embryonen, n.s.: nicht signifikant.

Die *tag-1*-Knockdown Embryonen wurden außerdem auch mit einem L1CAM spezifischen Antikörper gefärbt um neben den Motoneuronen auch Auffälligkeiten der Kommissuren betrachten zu können. Hierbei fiel auf, dass es zu einer dosisabhängigen Veränderung der posterioren Kommissur kommt. Diese Kommissur ist am Übergang zwischen Vorderhirn und Mittelhirn lokalisiert (Chitnis et al., 1992). Wird im Zebrafisch polySia (Marx et al., 2001), Ncam1a (Langhauser et al., 2012) oder das E587-Antigen (L1CAMlike) (Weiland et al., 1997) entfernt kommt es zur Defaszikulation der posterioren Kommissur. Der Verlust von Ncam1b hat einen Wachstumsstopp der kreuzenden Axone zur Folge (Langhauser et al., 2012). Wurden 6-8 ng Morpholino injiziert, führte das zu einer Aufspaltung der posterioren Kommissur in mehrere Bündel. Bei einer Injektion von 9-12 ng defaszikuliert die Kommissur.

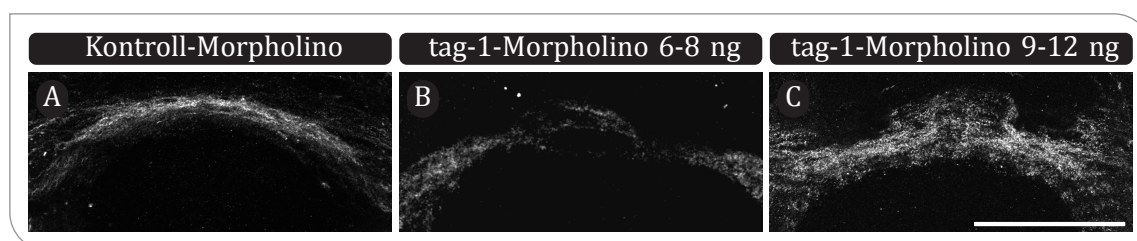


Abbildung 19: Der *tag-1*-Knockdown führt dosisabhängig zu einer faszikulierten posterioren Kommissur. Eine Immunfärbung mit L1CAM Antikörper färbt die posteriore Kommissur. Gezeigt ist ein dorsaler Konfokalausschnitt zu 48 hpf, cranial ist oben. (A) Die posteriore Kommissur der Kontrolle ist faszikuliert und kreuzt die Mittellinie. (B) Die Injektion von 6-8 ng spaltet die posteriore Kommissur auf. (C) Werden 9-12 ng des Morpholinos injiziert, lässt dies die Kommissur vollständig defaszikulieren. Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

**Knockdown von Neurolin im *Whole Mount* führt zu Defaszikulation und Bildung aberranter Seitenäste** Neurolin ist ein transmembranes Glykoprotein der Ig-Superfamilie im Zebrafisch (Denzinger et al., 1999). Es wird auf sekundären Motoneuronen, nicht aber auf primären Motoneuronen exprimiert (Fashena & Westerfield, 1999). Vorrausgegangene Studien mit Funktions-Blockierenden Antikörpern an Motoneuronen des Zebrafischs haben ergeben, dass Neurolin insbesondere im Bereich des *common path* bei der axonalen Wegfindung von großer Wichtigkeit ist (Ott et al., 2001).

Neurolin wird nach 48 hpf auf Zellsomata (s) und Axonen (ma) von Motoneuronen exprimiert (Lateralansicht Kontroll-Morpholino, Abb. 20 A' ; magenta ; siehe auch (Fashena & Westerfield, 1999). Das es sich hierbei ausschließlich um sekundäre Motoneurone handelt, wurde in umfassenden Studien bereits gezeigt (Fashena & Westerfield, 1999). Die Motoraxone wachsen geordnet entsprechend dem Unverändert-Phänotypen in die Myotome ein (Abb. 20 A'' ; grün). Der *neurolin*-spezifische Knockdown blockiert die Expression des Proteins (Abb. 20 B') und führt zu morphologischen Veränderung der Projektion der Motoraxone (Abb. 20 B'').

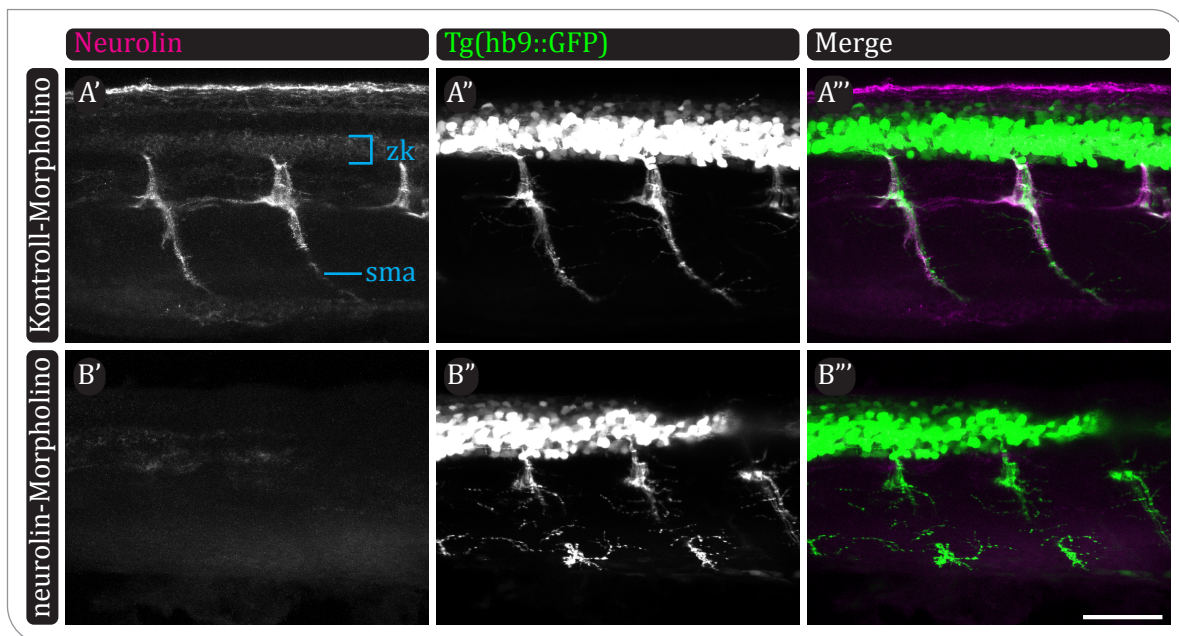


Abbildung 20: Der *neurolin*-Knockdown führt zur Defaszikulation und zur Ausbildung aberranter Seitenäste von Motoneuronen im *Whole Mount* Embryo. Die Motoneurone exprimieren GFP unter dem motoneuronen-spezifischen Promotor hb9. Gezeigt ist ein lateraler Konfokalausschnitt zu 48 hpf, cranial ist links. (A) Immunnachweis von Neurolin auf Motoneuronen. (B) Die Injektion des *neurolin*-Morpholinos verändert die Projektionsmuster der Motoraxone. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 50  $\mu\text{m}$ . Abkürzung: zk: Zellkörper der Motoraxone, sma: sekundäre Motoraxone.

Vergleichbar mit den Ncam1-Paralogen, führt der Expressionsverlust von Neurolin zu einer hoch signifikanten Veränderung der Motoneuronenprojektion (Abb. 21, Neu-MO:  $N = 4$ ,  $n = 67$ ,  $\chi^2 : p \geq 0,01$ ). Der Knockdown führt zu einem hoch signifikanten Anstieg defaszikulierter Axonbündel, dass hauptsächlich den *common path* betrifft ( $33 \% \pm 11$ ; Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ), sowie vermehrt zu Aberranten Seitenästen ( $37 \% \pm 3$ ; Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ).



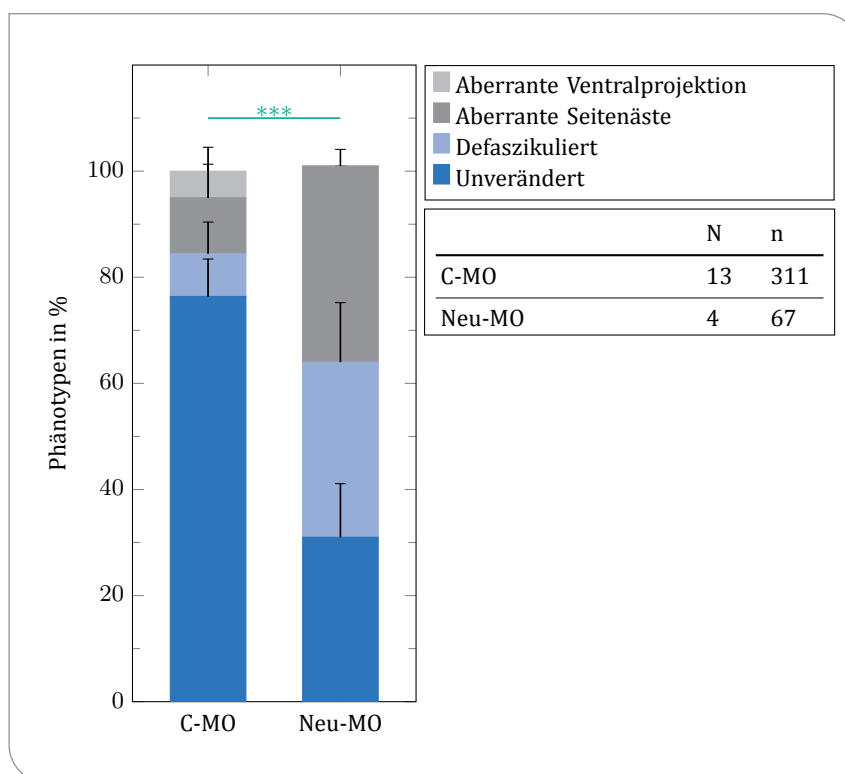


Abbildung 21: Quantifizierung des Projektionsmusters Neurolin defizienter Motoraxone *Whole Mount*. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $\chi^2$  \*\*\*:  $p < 0,001$ . Abkürzungen: C-MO: Kontroll-Morpholino-Injektion, Neu-MO: *neuroilin*-Morpholino-Injektion, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Embryonen.

## 4.2 Interaktionen zwischen den Ncam1-Paralogen und der Einfluss von polySia

Es sind bereits viele Interaktionspartner von NCAM1 bekannt (Maness & Schachner, 2007). Hierbei spielen sowohl Wachstumsfaktoren-Rezeptoren wie FGFR in der Signaltransduktion als auch Moleküle innerhalb der Immunglobulin Superfamilie als Adhäsion-vermittelnder Interaktionspartner eine Rolle. Aus unterschiedlichen Studien höherer Vertebraten ist bekannt, dass NCAM1 homophil interagieren kann und eine *cis*-Dimerisierung von NCAM1 maßgebend für die Induktion intrazellulärer Signalkaskaden ist (Übersichtsartikel: Kiselyov et al., 2005; Maness & Schachner, 2007). Homophile und a/b-heterophile Interaktionen der Ncam1-Paraloge sind im Fisch bisher nicht untersucht. Gerade im Bezug auf die Genomduplikation und damit einhergehende Präsenz zweier Ncam1-Paraloge sind solche Untersuchungen von großer Wichtigkeit. Teilfunktionen von Ncam1 und der Einfluss von polySia können im Fisch differenziert betrachtet und auf NCAM1 höherer Vertebraten übertragen werden.

### 4.2.1 Die Ncam1-Paraloge interagieren homophil und A/B-heterophil

Um mögliche homophile und A/B-heterophile Interaktionen zwischen den Ncam1-Paralogen nachzuweisen, wurden Bead-Aggregations-Assays verwendet. Mit dieser *in vitro* Methode wurden rekombinante Proteine über den Fc-Tag an Protein A beschichtete, fluoreszente Partikel gebunden und es wurde die Aggregation beobachtet. Als Kontrolle diente humanes Fc (humFc). Die homophilen Wechselwirkungen wurden quantifiziert, indem die Partikel pro Aggregat mit einer dafür entwickelten Software dokumentiert wurden (Kooperation Michael Schwan). Es wurden 10 Zufallsbilder (224.78  $\mu\text{m}$  x 224.78  $\mu\text{m}$ ) einer Reaktion aufgenommen, mit Hilfe der Software quantifiziert und in einem Spektrum aufgetragen. Die Spektren zeigen die Anzahl der Beads pro Aggregat bezogen auf die Gesamtfläche in Prozent.

Ncam1a beschichtete Partikel konglomerieren und bilden große Aggregate (Abb. 22 A', grün). Das Spektrum zeigt, dass Aggregate einer durchschnittlichen Größe von etwa 200 - 1000 Partikeln und bis maximal etwa 1700 Partikeln auftreten (Abb. 22 A'', n = 10). Partikel die mit Ncam1b beschichtet sind bilden ebenfalls große Aggregate (Abb. 22 B', magenta). Diese aggregieren durchschnittlich mit etwa 300 - 1500 Partikeln und mit einer maximalen Größe von etwa 3600 Partikeln in etwas größeren Konglomeraten miteinander, als die der Ncam1a beschichteten Partikel (Abb. 22 B'', n = 10). Daraus lässt sich schließen, dass sowohl Ncam1a als auch Ncam1b homophile Bindungen eingehen können.

Sind die Partikel wie in der Kontrolle mit humFc beschichtet treten hauptsächlich separierte Partikel auf (Abb. 22 C', weiß). Das Spektrum über die Aggregationsgrößen zeigt, dass sich die Aggregation hauptsächlich zwischen einem und etwa 30 Partikeln/Aggregation bewegt. Zwei Maximalwerte von etwa 50 und 80 Beads/Aggregat sind vermutlich auf einen Resuspension-Fehler zurückzuführen (Abb. 22 C'', n = 9).

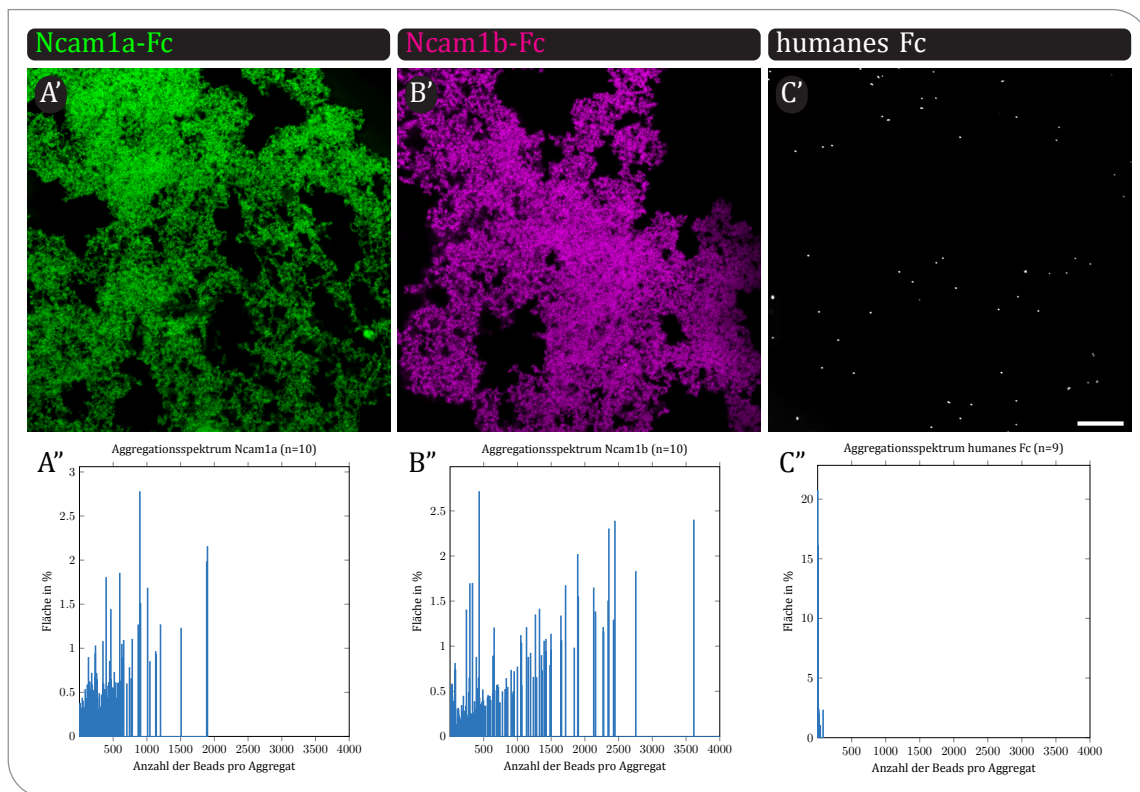


Abbildung 22: Die Ncam1-Paralogen des Zebrafisches können homophil interagieren. Mit homophilen Bead-Aggregations Assays können diese Wechselwirkungen nachgewiesen werden. (A) Ncam1a kann homophil interagieren. Das Spektrum Ncam1a beschichteter Beads zeigt, dass Aggregate mit einer durchschnittlichen Größe von 200 - 1000 Partikeln auftreten. (B) Auch Ncam1b interagiert homophil. Das Spektrum Ncam1b beschichteter Beads zeigt, dass diese mit einer durchschnittlichen Anzahl von 300 - 1500 Partikeln größere Aggregate als Ncam1a ausbilden. (C) Die Kontrollpartikel sind mit humanem Fc beschichtet und bilden keine Aggregate. Der Maßstabsbalken gilt für Abbildungen (A-C) und entspricht 10  $\mu$ m.

Um die Ncam1-Paralogen auf A/B-heterophile Interaktionen zu testen, wurden grün-fluoreszente Partikel mit Ncam1a beschichtet und mit einer zweiten Population Ncam1b beschichteter, rotfluoreszenter Partikel gemeinsam inkubiert. Dies führt zu der Bildung großer, heterophiler Aggregate (Abb. 23 A, Ncam1a grün, Ncam1b magenta). In der Kontrolle bildet Ncam1a (grün) große Aggregate, wohingegen die Population der humFc beschichteten Partikel (magenta) größtenteils einzeln vorliegen (Abb. 23 B, Ncam1a grün, humFc magenta). Auch Ncam1b beschichtete Partikel (grün) bilden homophile Cluster aus (Abb. 23 C, Ncam1b magenta, humFc grün). Teilweise werden in die-

ser Kontrollreaktion humFc beschichtete Partikel (magenta) in die Aggregation mit involviert (Abb. 23).

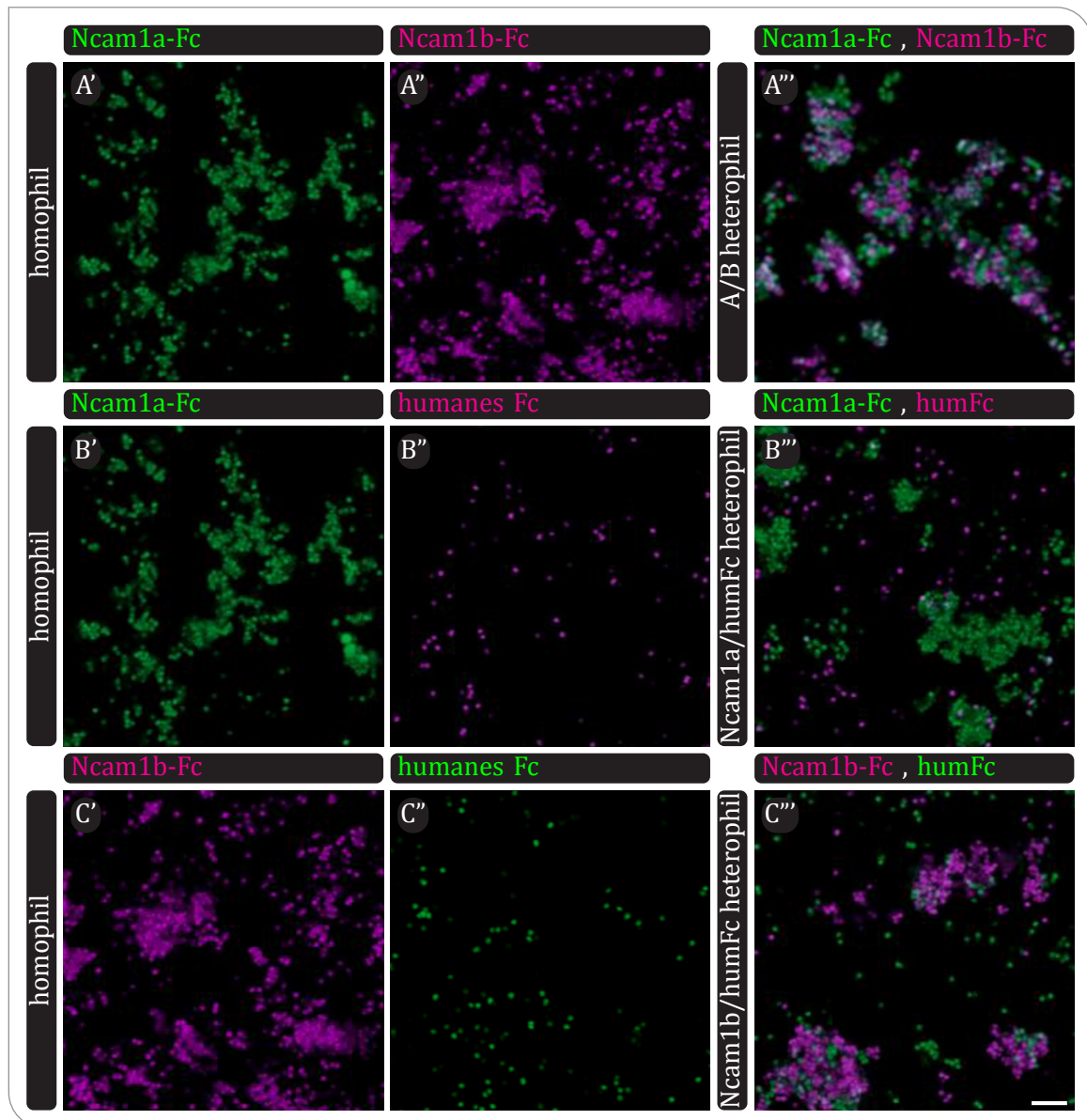


Abbildung 23: Die Ncam1-Paralogen des Zebrafischs können A/B-heterophil interagieren. (A) Ncam1a (grün) und Ncam1b (magenta) beschichtete Partikel bilden jeweils große Aggregate aus. In einer Reaktion mit beiden Populationen an Partikeln, bilden Ncam1a und Ncam1b große A/B-heterophile Konglomerate aus. (B) & (C) In den Kontrollen bilden nur die Ncam1a (B'; grün) und die Ncam1b (C'; magenta) beschichteten Partikel Aggregate. HumFc-Partikel liegen größtenteils einzeln vor. Sie werden allerdings in einer Reaktion mit Ncam1b-Partikeln mit in die Reaktion involviert und bilden kleinere Aggregate. Der Maßstabsbalken gilt für (A-C) und entspricht 10  $\mu$ m.

Der Mechanismus der homophilen *trans*-Interaktion von NCAM1 wird seit langer Zeit kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien zeigen unterschiedliche Beteiligung der Ig-Domänen an dieser Wechselwirkung (Rao et al., 1994; Ranheim et al., 1996; Kiselyov et al., 1997). Mehrere Publikationen weisen auf eine Interaktion zwischen der ersten Ig-Domäne und der zweiten Ig-Domäne hin. Eine neuere Studie vergleicht in einem Modell die homophile *trans*-Interaktion von NCAM1 unterschiedlicher Spezies. Die Publikation beschreibt den Mechanismus der *trans*-Interaktion zwischen der ersten Ig-Domäne des Moleküls A und der zweiten Ig-Domäne des Moleküls B. Wichtigster Bestandteil der homophilen NCAM1 Interaktion ist unter anderem die aromatische Aminosäure Tyrosin 65 (Y A65) von Molekül A der Ig1-Domäne. Der aromatische Benzolring von Y A65 interka-

liert in eine benachbarte Tasche (Isoleucin B180 und Phenylalanin B182), welche von Seitenketten der Ig2-Domäne von Molekül B gebildet wird. Außerdem bildet die Hydroxygruppe von Y A65 Wasserstoffbrücken mit der Seitenkette von Glutaminsäure B171 (E B171). Eine weitere Stabilisierung dieser Verbindung wird durch Salzbrücken der verbindenden Region der Ig1 und Ig2-Domänen (Glu A16 und Lys B98 und umgekehrt) erzielt (Kasper et al., 2000). Ncam1a/b aus dem Zebrafisch wurden in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Ein Sequenzvergleich zeigt, dass die Aminosäuren auch bei Zebrafisch Ncam1a und Ncam1b vorkommen. Dies lässt darauf schließen, dass die für diesen Bindemechanismus wichtigen Aminosäuren zwischen den Spezies und innerhalb der Ncam1-Paraloge konserviert sind (Abb. 24).

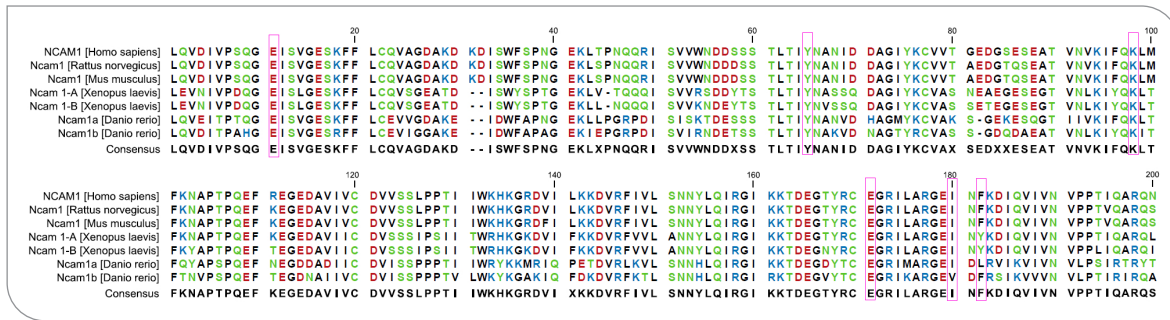


Abbildung 24: NCAM1 Sequenzvergleich Ig1-Ig2 unterschiedlicher Spezies. Ein publizierter homophiler Bindemechanismus von NCAM1 wurde um die Zebrafisch Ncam1-Orthologe erweitert. Magenta umrandet sind Aminosäuren, die an der Interaktion beteiligt sind.

Die Paraloge Ncam1a und Ncam1b können homophil in Wechselwirkung treten und verhalten sich dies bezüglich wie ihre Orthologe (Kiselyov et al., 2005). Die Bead-Aggregation gemischter Ncam1a- und Ncam1b-Populationen an Partikeln lässt vermuten, dass diese auch A/B-heterophil miteinander interagieren können. Die Sequenzanalyse der ersten beiden Ig-Domänen bekräftigt diese Vermutung.

#### 4.2.2 Die Ncam1a/Ncam1a Interaktion wird durch Polysialinsäure-Modifikation beeinflusst

Für NCAM1 höherer Vertebraten ist bekannt, dass homophile Bindungen durch Modifikation mit polySia verhindert werden (Angata & Fukuda, 2003; Eckhardt et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass beide Ncam1-Paraloge im Zebrafisch polysialyliert werden können (Langhauser et al., 2012). Welchen Einfluss die polySia auf Ncam1a und Ncam1b homophile Interaktionen hat, wurde bisher noch nicht untersucht.

Zellen-Overlay Assays ermöglichen die in der Bead-Aggregation nachgewiesenen homophilen und A/B-heterophilen Wechselwirkungen auf den Einfluss von polySia hin zu untersuchen. Transmembranen, His-Tag markiertes Ncam1a oder Ncam1b wurde von CHO-Zellen exprimiert. Diese wurden mit rekombinanten Fc-Chimären inkubiert, anschließend fixiert und gegen die Tags gefärbt. Wechselwirkungen zwischen den Molekülen wurde fluoreszenzmikroskopisch über eine Kolo-kalisation nachgewiesen. Neben homophilen Interaktionen wurden auch heterophile Interaktionen aufgezeigt. Beide Ansätze wurden außerdem genutzt, um den Einfluss von Polysialinsäure auf die Interaktionen zu untersuchen. CHO-2A10 Zellen können kein polySia synthetisieren (Eckhardt et al., 1995) und dienen dem polySia-unabhängigen Interaktionsnachweis. CHO-K1 Zellen entsprechen dem genetisch unveränderten Wildtypen und dienen dem Nachweis polySia-abhängiger Interaktionen.

Die Polysialyltransferase negativen CHO-2A10 Zellen exprimieren kein polySia auf der Zelloberfläche (Abb. 25 A; polySia orange, DAPI blau), wohingegen polySia auf CHO-K1 Zellen nachgewiesen werden kann (Abb. 25 B; polySia orange, DAPI blau). Zusätzlich wurde der Immunnachweis aus Zelllysaten über Western Blots mit einem  $\alpha$ -His-Antikörper bzw. einem  $\alpha$ -polySia Antikörper durchge-



führt. Inkubation mit dem  $\alpha$ -His-Antikörper zeigt, dass Ncam1a-His gleichermaßen von CHO-2A10 Zellen als auch von CHO-K1 Zellen exprimiert wird. Es ist jeweils eine Bande bei circa 140 kDa zu erkennen. Bereits dieser Blot deutet darauf hin, dass CHO-K1 Zellen das Protein polysialylieren, da die Bande hier etwas größer erscheint. Wird ein Antikörper gegen polySia verwendet, zeigt sich nur bei CHO-K1 Zellen eine polySia-typische, verbreiterte Bande aufgrund des unterschiedlichen Grades an Polysialylierung zwischen 140 und 250 kDa.

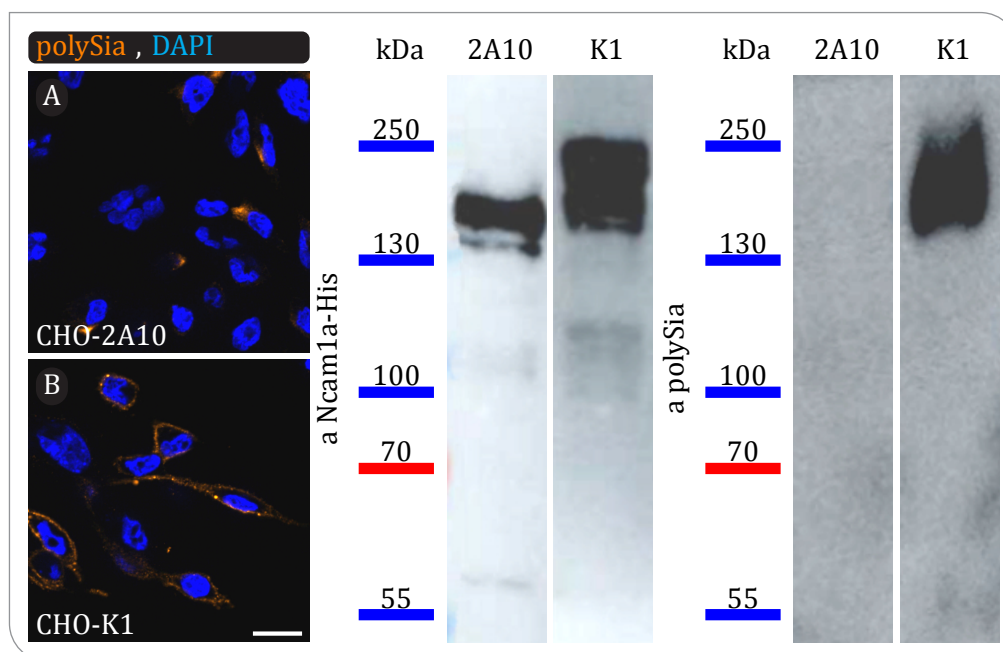


Abbildung 25: Expressionsnachweis von Ncam1a und polySia-Ncam1a in Zellkulturen. Die Abbildung zeigt vergleichende Immunfärbungen und Western Blots der polySia-Expression in CHO-2A10 und CHO-K1 Zellen. (A) CHO-2A10 Zellen können kein polySia auf der Zelloberfläche synthetisieren. Die Immunfärbung mit einem polySia-spezifischen Antikörper zeigt keine Immunreaktion (orange). Teilweise konglomeriert der Antikörper in der Nähe des Zellkerns (blau). (B) polySia-positive CHO-K1 Zellen zeigen eine deutliche Färbung auf der Zelloberfläche (orange). Die Zellkerne sind in blau dargestellt. Die Western Blots zeigen Zelllysate von CHO-2A10 und CHO-K1 Zellen. Der Immunnachweis erfolgte in zwei separaten Blots. Die Inkubation einem  $\alpha$ -His Antikörper zeigt, dass sowohl CHO-2A10 als auch CHO-K1 Zellen Ncam1a-His exprimieren. CHO-2A10 Zellen exprimieren ein Protein mit einer Größe von etwa 140 kDa, welches der erwarteten Größe von Ncam1a-His entspricht. Daneben erscheint zusätzlich eine etwas kleinere Bande, die auf ein Abbauprodukt schließen lässt. Die verbreiterte Bande der CHO-K1 Zellen gibt einen ersten Hinweis auf mögliche Polysialylierung. Der Immunnachweis mit einem  $\alpha$ -polySia Antikörper ist nur in CHO-K1 Zellen positiv. Diese polysialylieren das exprimierte Ncam1a-His, das durch eine verbreiterte Bande zwischen 130 und 250 kDa nachgewiesen werden kann. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu$ m.

Die Überlagerung von CHO-2A10 Zellen, welche Ncam1a transmembran exprimieren (grün) mit Ncam1a-Fc-Chimären Protein (magenta) zeigt deutlich, dass beide Proteine kolokalisieren (Abb. 26 A). Dies bestätigt die Beobachtung aus der Bead-Aggregation, dass Ncam1a homophil interagiert. Um Zellumrisse auch untransfizierter Zellen zu visualisieren, wurden zusätzlich die Aktinfilamente (Phalloidin, dunkelrot) und der Zellkern (DAPI, blau) gefärbt. Überlagertes Ncam1a bindet nicht an untransfizierte Zellen (Abb. 26 A). Wird Ncam1a transmembran in CHO-K1 Zellen (grün) exprimiert und inkubiert man diese mit Ncam1a-Fc-Chimären (magenta), kolokalisieren die beiden Proteine nicht. Eine homophile Interaktion von Ncam1a nach Polysialylierung ist nicht mehr möglich (Abb. 26 B). Auch untransfizierte Zellen binden nicht an das überlagerte Ncam1a (Abb. 26 B). In einer Kontrollreaktion mit humFc wird verdeutlicht, dass die Wechselwirkungen von Ncam1a, nicht aber vom Fc-Tag ausgehen. Ncam1a transfizierte Zellen binden kein humFc (Abb. 26 C, D)

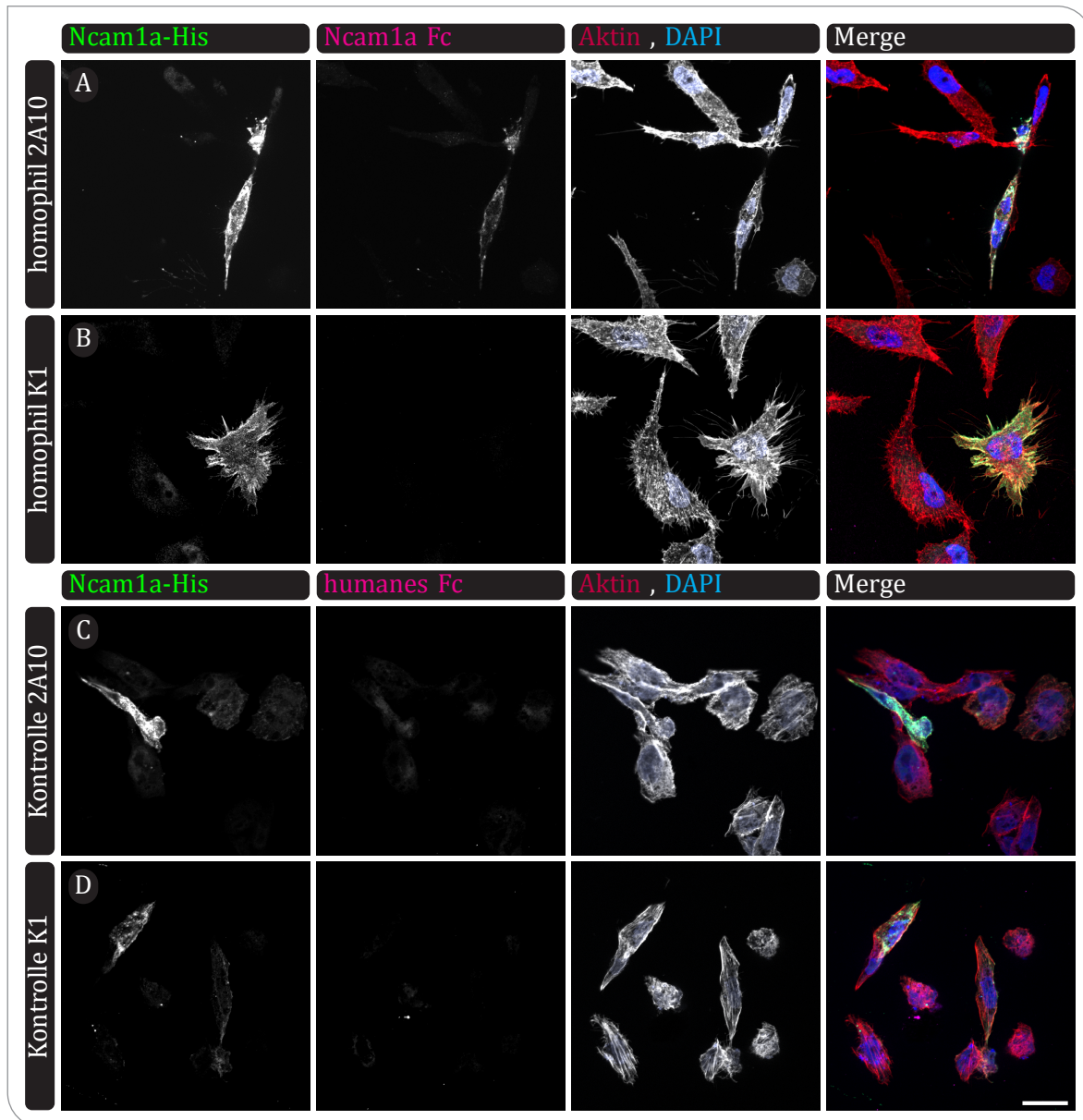


Abbildung 26: Die Homophile Wechselwirkung von Ncam1a wird in Anwesenheit von polySia verhindert. (A) polySia negative CHO-2A10 Zellen exprimieren Ncam1a-His auf ihrer Oberfläche (grün). Werden die Zellen mit Ncam1a-Fc überlagert, bindet dieses nur an Ncam1a-His exprimierende Zellen (magenta). Die Zellumrisse wurden mit einer Aktin- und DAPI-Färbung visualisiert (rot, blau). Ncam1a interagiert homophil (Merge). (B) Die polySia-positiven CHO-K1 Zellen exprimieren Ncam1a-His auf ihrer Oberfläche (grün). Dies hat zur Folge, dass Ncam1a-Fc nicht mehr an die Zellen binden kann (magenta). Die Ncam1a homophile Interaktion wird durch die Anwesenheit von polySia gehemmt (Merge). (C) & (D) Die Fc-Markierung des überlagerten Proteins hat keinen Einfluss auf die homophilen Wechselwirkungen. Sowohl CHO-2A10 Zellen als auch CHO-K1 Zellen die Ncam1a-His auf ihrer Oberfläche exprimieren (grün), binden nicht an humanes Fc (magenta). Es kommt zu keiner Kolokalisation der beiden Proteine (Merge). Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Der Einfluss der Polysialylierung auf homophile Interaktionen von Ncam1a bestätigt sich auch in Bead-Aggregation-Assays. Fluoreszente Partikel wurden mit Ncam1a beschichtet und anschließend die Hälfte der Reaktion *in vitro* mit rekombinanter Polysialyltransferase St8SialII und Sialinsäure inkubiert. Ncam1a Partikel bilden homophile Cluster (Abb. 27 A; vgl. zudem Abschnitt 4.2.1). Die homophile Bindung von Ncam1a wird durch St8SialII-vermittelte *in vitro* Polysialylierung aufgelöst und die Partikel liegen größtenteils vereinzelt vor (Abb. 27 B).

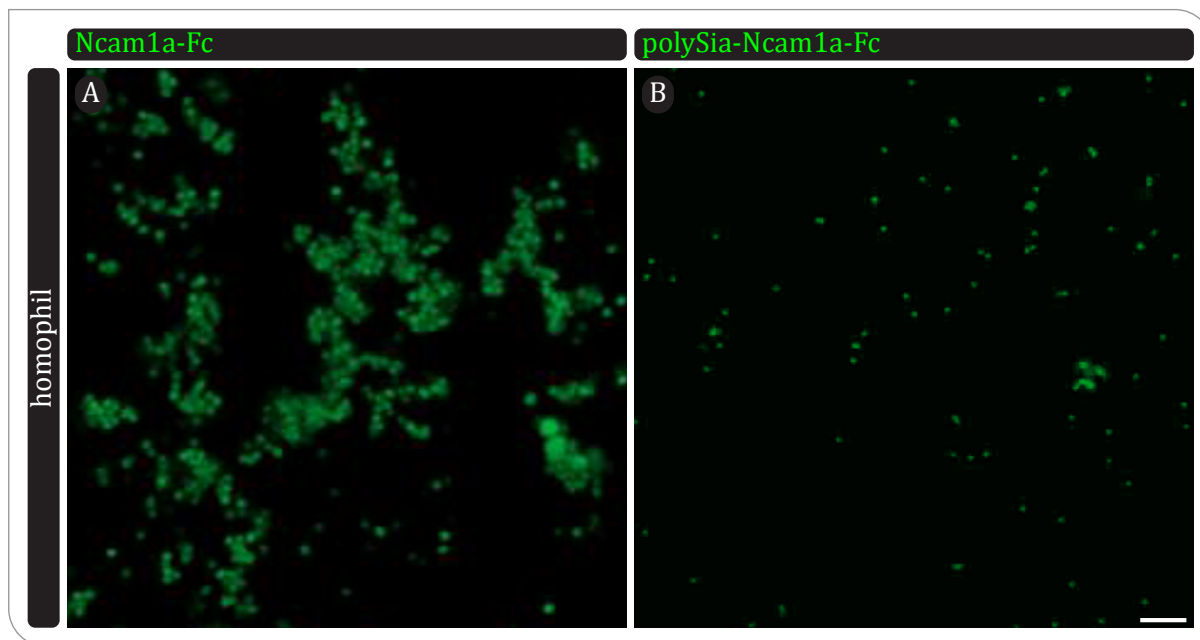


Abbildung 27: *In vitro* Polysialylierung verhindert die homophile Ncam1a/Ncam1a Interaktion. (A) Ncam1a-Fc Partikel bilden wie erwartet Aggregate. (B) polySia gebunden an Ncam1a verhindert, dass die Ncam1a-beschichteten Partikel Aggregate bilden. Der Maßstabsbalken gilt für Abbildungen A und B und entspricht 10  $\mu$ m.

#### 4.2.3 Die Modifikation mit Polysialinsäure hat keinen Einfluss auf die Ncam1b homophile Interaktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Polysialylierung die homophile Interaktion von Ncam1a verhindert, wurde untersucht ob die Ncam1b homophile Interaktion durch Modifikation mit polySia ebenso unterbunden wird. Hierfür wurde His-markiertes Ncam1b auf der Membran von polySia-negativen CHO-2A10 und polySia-positiven CHO-K1 Zellen exprimiert. Der Western Blot zeigt eine diskrete Bande bei circa 180 kDa und entspricht damit der Größe von Ncam1b-His. Ein Western Blot mit einem Antikörper gegen polySia zeigt nur für CHO-K1 Zelllysate einen polySia-spezifischen *Upshift* zwischen circa 180 kDa und 250 kDa. Ncam1b wird folglich von CHO-K1 Zellen in polysialylierter Form gebildet (Abb. 28B).

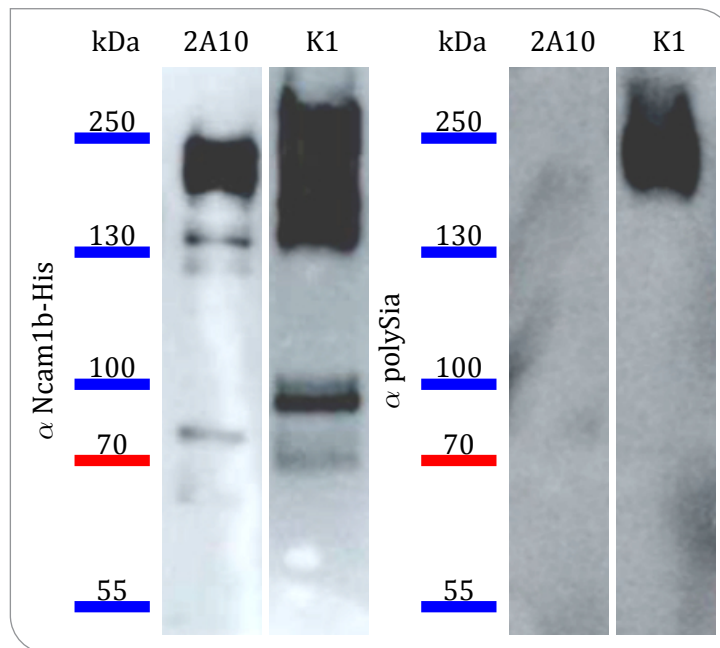


Abbildung 28: Expressionsnachweis von Ncam1b und polySia-Ncam1b in Zellkulturen. Beide Zelltypen exprimieren Ncam1b-His. Der Blot zeigt mit einem Antikörper gegen die His-Markierung in beiden Spuren eine Bande bei 180 kDa. Der Nachweis der Polysialylierung Ncam1b-His transfizierter Zellen mit einem  $\alpha$ -polySia Antikörper ist nur in CHO-K1 Zellen positiv. Diese polysialylieren das exprimierte Ncam1b-His, sodass ein typisches Bandenmuster zwischen 170 und 250 kDa entsteht.

In Zellen Overlay-Assays wurde Ncam1b von CHO-2A10 Zellen exprimiert und mit exogenen Ncam1b-Fc-Chimären inkubiert. Eine ausgeprägte Kolokalisation der Ncam1b-Proteine zeigt die homophile Interaktion von Ncam1b (Abb. 29 A). Das bestätigt die Beobachtungen der Bead-Aggregation. Die Färbung sämtlicher Zellen des Ansatzes mit Phalloidin (Aktinfilamente; dunkelrot) und DAPI (Zellkern; blau) zeigt, dass Ncam1b nicht an untransfizierte Zellen bindet (Abb. 29 A Aktin/DAPI bzw. Merge). Entgegen der Beobachtung zur homophilen Interaktion von Ncam1a in CHO-K1 Zellen (vgl. Abb. 26), führt eine Expression von Ncam1b in CHO-K1 Zellen nicht zur Reduktion der homophilen Ncam1b Interaktion. Das bedeutet, dass auch polysialyliertes Ncam1b homophil bindet (Abb. 29 B). Untransfizierte Zellen binden kein Ncam1b (Abb. 29 B). Die homophile Ncam1b-Interaktion ist kein Artefakt, da humanes Fc nicht an die transfizierten Zellen bindet (Abb. 29 C, D).



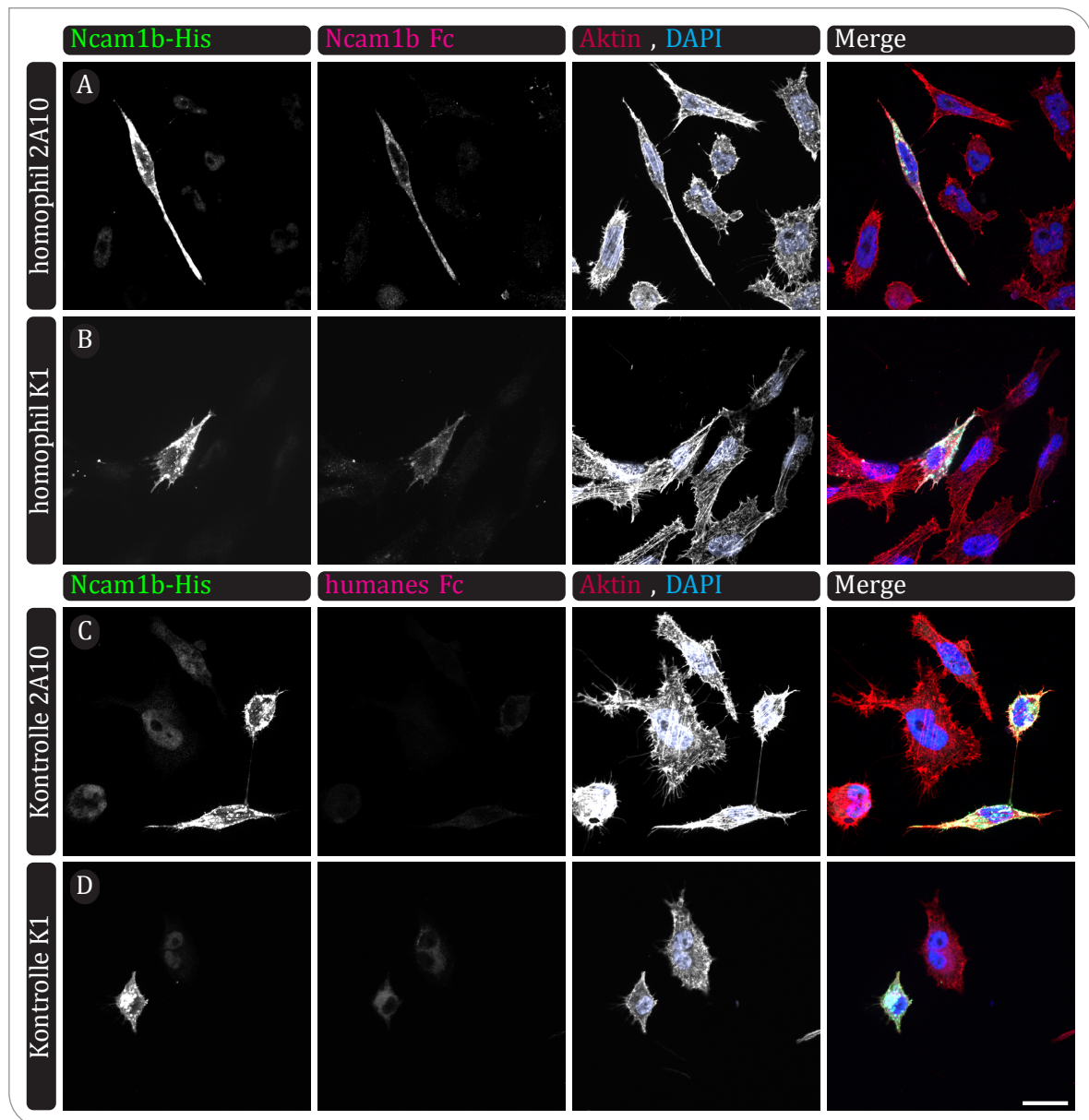


Abbildung 29: Polysialylierung hat keinen Einfluss auf die homophile Interaktion von Ncam1b. (A) CHO-2A10 Zellen exprimieren Ncam1b-His auf ihrer Oberfläche (grün). Werden die Zellen mit Ncam1b-Fc überlagert, bindet dieses nur an Ncam1b-His exprimierende Zellen (magenta). Die Zellumrisse wurden mit einer Aktin- und DAPI-Färbung visualisiert (rot, blau). Auch Ncam1b interagiert homophil (Merge). (B) Die polySia-positiven CHO-K1 Zellen exprimieren Ncam1b-His auf ihrer Oberfläche (grün). Dies hat keinen Einfluss auf die Ncam1b homophile Wechselwirkung (magenta). Die Ncam1b homophile Interaktion ist polySia unabhängig (Merge). (C)& (D) Die Fc Markierung des überlagerten Proteins hat keinen Einfluss auf diese homophile Wechselwirkung. CHO-2A10 und CHO-K1 Zellen die Ncam1b-His auf ihrer Oberfläche exprimieren (grün), binden nicht an humanes Fc (magenta). Es kommt zu keiner Kolo-kalisation der beiden Proteine (Merge). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Werden fluoreszente Partikel mit Ncam1b-Fc Protein beschichtet kommt es, wie bereits beschrieben, zur Aggregation der Partikel (Abb. 30 A; vgl. auch Abschnitt 4.2.1). Nach St8SialII-vermittelter *in vitro* Polysialylierung bilden die Ncam1b-Partikel weiterhin große Cluster. Die homophile Interaktion von Ncam1b wird also durch polySia nicht aufgehoben (Abb. 30 B).

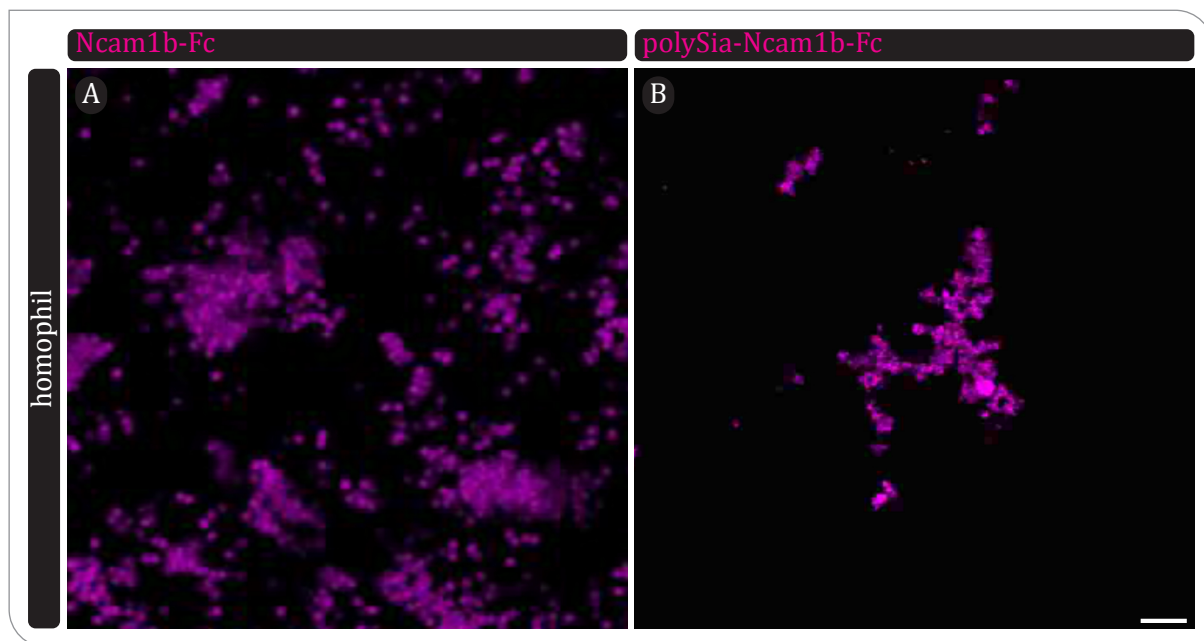


Abbildung 30: *In vitro* Polysialylierung hat keinen Einfluss auf die Ncam1b/Ncam1b Interaktion. (A) Ncam1b-Fc Partikel bilden Aggregate. (B) Auch polySia-Ncam1b beschichtete Partikel können Aggregate bilden. Der Maßstabsbalken gilt für Abbildungen A und B und entspricht 10 µm.

#### 4.2.4 Die Polysialinsäuremodifikation schwächt die A/B-heterophile Interaktion

Die heterophile Bead-Aggregation gab bereits Hinweise darauf, dass eine A/B-heterophile Interaktion zwischen den beiden Paralogen möglich wäre (vgl. Abb. 23). Auch die Sequenzanalyse bekräftigte diese Aussage. Da die Bead-Aggregation für einen heterophilen Interaktionsnachweis weniger gut geeignet erschien, wurde diesen Hinweisen in Zellen Overlay-Assays nachgegangen. Außerdem wurde der Einfluss der polySia-Modifikation auf diese A/B-heterophile Wechselwirkung untersucht, um weitere Indikatoren für eine Subfunktionalisierung der Paraloge zu erhalten.

Die in der Bead-Aggregation beobachtete heterophile Interaktion von Ncam1a mit Ncam1b kann in Zell-Overlay Assays bestätigt werden. CHO-2A10 Zellen, die Ncam1a transmembran (grün) exprimieren, binden lösliches Ncam1b (magenta) an ihrer Oberfläche. Das zeigt sich durch Kolokalisation nach einer Immunfärbung (Abb. 31 A). Wird das transmembrane Ncam1a-Konstrukt in CHO-K1 Zellen exprimiert, wird es von den Zellen polysialyliert. Nach Inkubation mit Ncam1b treten die beiden Proteine kaum mehr in Wechselwirkung. Die Intensität der Cy3 Fluoreszenz (Ncam1b Überlagerung) ist stark abgeschwächt (Abb. 31 B; gleiche Aufnahmeintensität wie in Abb. 31 A).

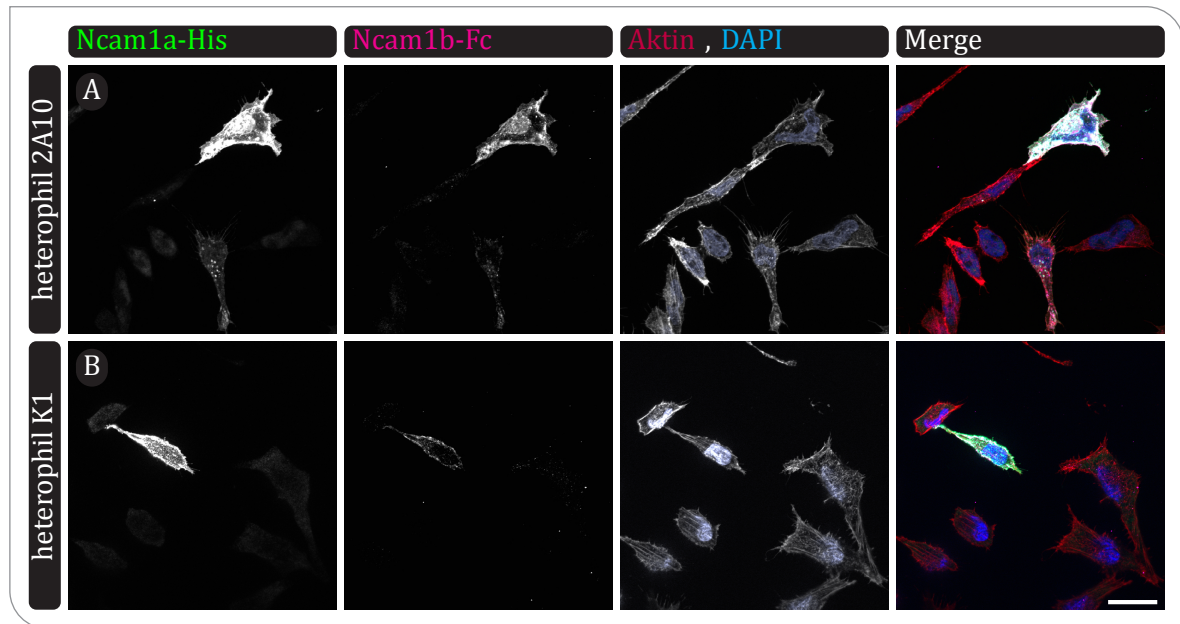


Abbildung 31: Die Heterophile Ncam1a Interaktion mit Ncam1b wird durch polySia stark reduziert. (A) Ncam1a-His wird auf der Oberfläche von CHO-2A10 Zellen exprimiert (grün) und rekombinantes Ncam1b-Fc bindet an diese Zellen (magenta). Die Zellumrisse wurden mit einer Aktin- und DAPI-Färbung visualisiert (rot, blau). Die Inkubation der Ncam1a-His exprimierenden CHO-2A10 Zellen mit Ncam1b-Fc führt zu einer heterophilen Bindung zwischen Ncam1a und Ncam1b (Merge). (B) Die polySia-positiven CHO-K1 Zellen exprimieren Ncam1a-His auf ihrer Oberfläche (grün). Rekombinantes Ncam1b-Fc kann nicht mehr bzw. nur noch sehr schwach an die Zellen binden (magenta). Die A-B-heterophile Interaktion wird durch die Anwesenheit von polySia geschwächt (Merge). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Auch in umgekehrter Konstellation, wobei Ncam1b-His (grün) von CHO-2A10 Zellen exprimiert und mit Ncam1a-Fc (magenta) inkubiert wird, können beide Proteine aneinander binden. (Abb. 32 A). Wird transmembranes Ncam1b-His durch Expression in CHO-K1 Zellen polysialyliert, vermindert dies ebenso die A-B-heterophile Interaktion (Abb. 32).

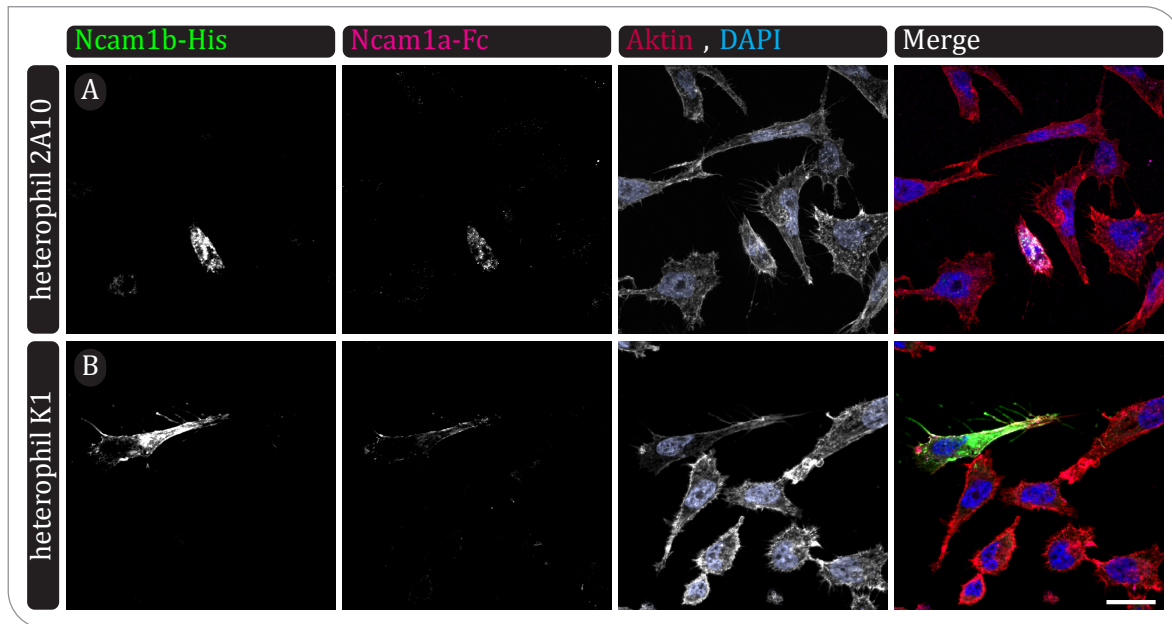


Abbildung 32: Heterophile Ncam1b Interaktion mit Ncam1a in Abhängigkeit von polySia. (A) polySia-negative CHO-2A10 Zellen exprimieren Ncam1b-His auf der Zelloberfläche (grün). Diese Zellen wurden mit rekombinantem Ncam1a-Fc inkubiert (magenta). Die Zellumrisse wurden mit einer Aktin- und DAPI-Färbung visualisiert (rot, blau). Auch in umgekehrter Konstellation, wobei CHO-2A10 Zellen Ncam1b-His exprimieren, bindet Ncam1a-Fc A-B-heterophil. Der Merge zeigt die Kolo-kalisation der beiden Proteine. (B) Polysialyliertes Ncam1b-His wird auf CHO-K1 Zellen exprimiert (grün). Rekombinantes Ncam1a-Fc bindet schwach an die Zellen (magenta). Die A-B-heterophile Interaktion wird durch die Anwesenheit von polySia geschwächt (Merge). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Aus vorher Erläutertem lässt sich schließen, dass sich die Ncam1-Paraloge des Zebrafischs in großen Teilen analog zu den NCAM1-Orthologen anderer Vertebraten verhalten (Kiselyov et al., 2005). Ncam1a und Ncam1b können sowohl in einem homophilen also auch in einem A/B-heterophilen Mechanismus in Wechselwirkung treten. PolySia beeinflusst diese Interaktionen auf unterschiedliche Weise. polySia-Ncam1a kann keine homophilen- oder Ncam1b-Bindungen eingehen. Die Situation für Ncam1b weicht in Teilen davon ab, sodass eine homophile Bindung von Ncam1b trotz Modifikation mit polySia eingegangen wird. Ist Ncam1a in diese heterophile polySia-Ncam1b Wechselwirkung mit einbezogen, kommt es zu keiner Interaktion.

Diese Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass sich Ncam1a und Ncam1b auch auf Ebene homophilen Interaktion unterscheiden. Daraus lässt sich ein weiterer Hinweis auf eine Subfunktionalisierung ableiten.

### 4.3 Heterophile Interaktionen der Ncam1-Paraloge mit Tag-1 und Neurolin

Aus anderen Vertebraten ist bekannt, dass NCAM1 auch an andere neuronale Zellerkennungsmoleküle aus der Ig-Superfamilie bindet (Übersichtsartikel: Nielsen et al., 2010). Um zu untersuchen, ob das auch im Zebrafisch gilt und ob sich die Paraloge Ncam1a und Ncam1b in dieser Hinsicht ähneln oder unterscheiden, wurden exemplarisch zwei Mitglieder der Ig-Superfamilie ausgewählt und auf heterophile Interaktion mit den Ncam1-Paralogen untersucht.

Für das GPI-verankerte Transient Axonal Glycoprotein-1 (Tag-1) ist bekannt, dass es im Huhn mit NCAM1 in Wechselwirkung tritt (Milev et al., 1996). Funktionelle Analysen der vorliegenden Arbeit zeigten Tendenzen auf, dass es auch in der Wegfindung von Motoraxonen eine gewisse Rolle spielen könnte (vergleiche Abschnitt 4.1.6).

Für das transmembrane Neurolin ist gibt es noch keine Beobachtungen hinsichtlich einer Interaktion mit NCAM1. Allerdings zeigen vorausgegangene Studien, dass Neurolin im Zebrafisch im Prozess der axonalen Wegfindung retinaler Ganglienzellen (Ott et al., 1998) als auch von Motoraxonen (Ott et al., 2001) von großer Wichtigkeit ist. Funktionelle Studien unter Einsatz von Morpholino-



Injektion der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Arbeiten (vergleiche auch 4.1.6).

#### **4.3.1 Tag-1 interagiert schwach homophil und heterophil mit Ncam1b**

Für TAG-1 ist mehrfach beschrieben, dass es homophile Bindungen eingeht (Tsiotra et al., 1996; Kunz et al., 2002). Die Tag-1 homophile Interaktion des Zebrafisch-Orthologs wurde noch nicht untersucht. Um diese Frage zu beantworten, wurden Bead-Aggregationen und Zellen-Overlay-Assays durchgeführt.

Tag-1 beschichtete Partikel treten untereinander wenig ausgeprägt in Wechselwirkung (Abb. 33 A'). Die Auswertung von 10 Zufallsbilder ist in einem Spektrum aufgetragen. Der Großteil der Fläche wird von singulären Partikeln eingenommen. Kleinere Aggregate entsprechen einer durchschnittlichen Größe zwischen zwei und 250 Partikeln und einer maximalen Größe 700 Partikeln (Abb. 33 A'').

Partikel beschichtet mit humanem Fc bilden keine Aggregate, sodass die Partikel hauptsächlich vereinzelt vorliegen (Abb. 33 B'). Es werden in der Kontrolle durchschnittlich 30 Beads/Aggregat dokumentiert (Abb. 33 B'').

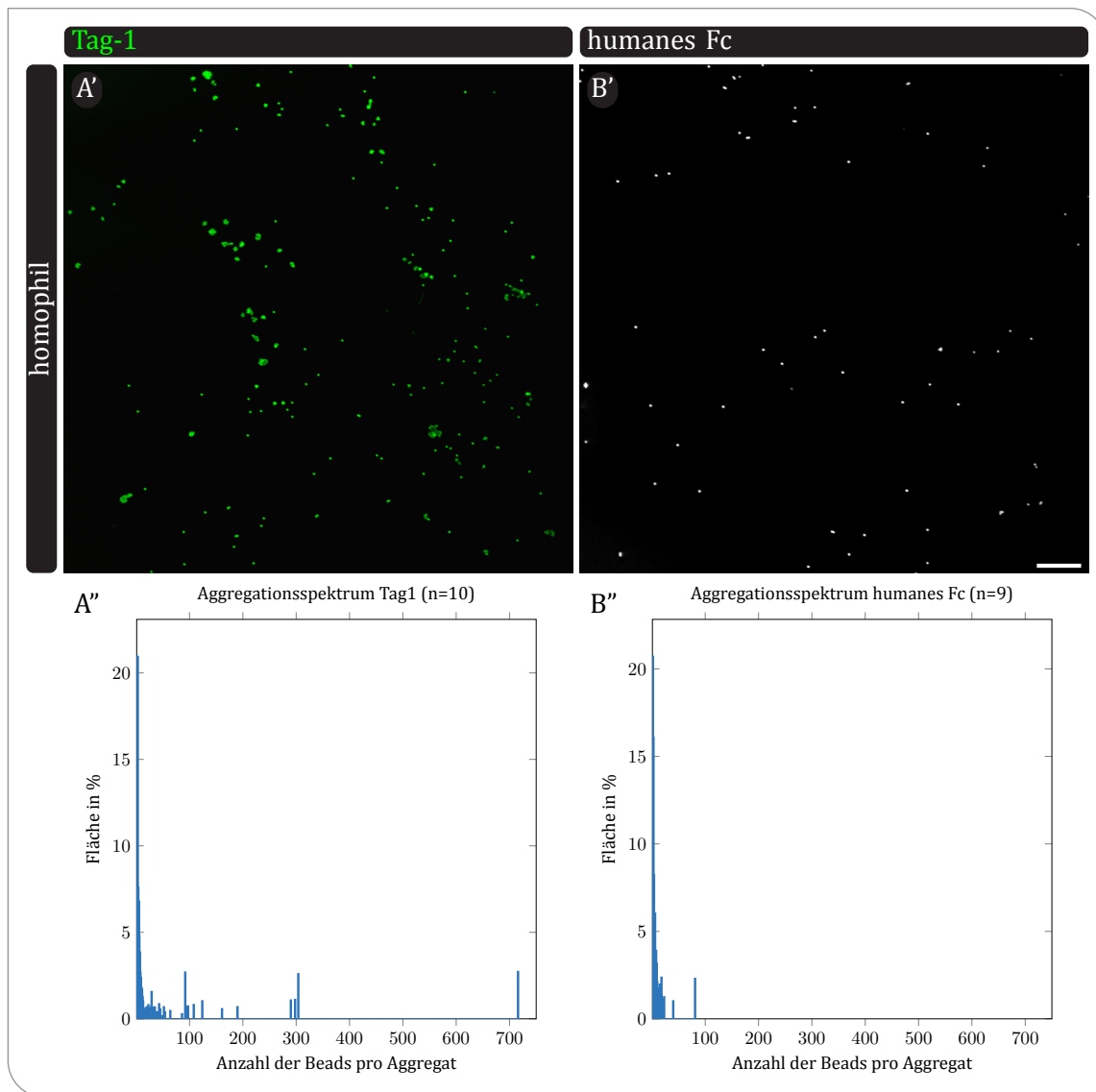


Abbildung 33: Tag-1 des Zebrafischs bildet nur schwache homophile Aggregate aus. (A) Tag-1-beschichtete fluoreszente Partikel aggregieren mit einer durchschnittlichen Größe von etwa zwei bis 300 Partikeln und einer maximalen Größe etwa 730 Partikeln ( $n = 10$  Zufallsaufnahmen). (B) Die Kontrolle aggregiert nicht. Das Spektrum über die Aggregationsgrößen zeigt, dass sich die Aggregation hauptsächlich zwischen einem und 30 Partikeln/Aggregation bewegt. Zwei Maximalwerte von etwa 50 und 80 Beads/Aggregat lassen auf einen Fehler der Resuspension schließen. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

In einem homophilen Interaktionsnachweis von Tag-1 über Overlay Assays sollte die schwache Tag-1 Interaktion aus der Bead-Aggregation überprüft werden. Tag-1-His wird von CHO-K1 Zellen in der Zellmembran exprimiert (grün) und mit Tag-1-Fc überlagert (magenta) (Abb. 34 A). Überlagertes Tag-1 bindet kaum an exprimiertes Tag-1.

Die Negativkontrolle mit überlagertem humFc zeigt keine Kolo-kalisation (Abb. 34 B).

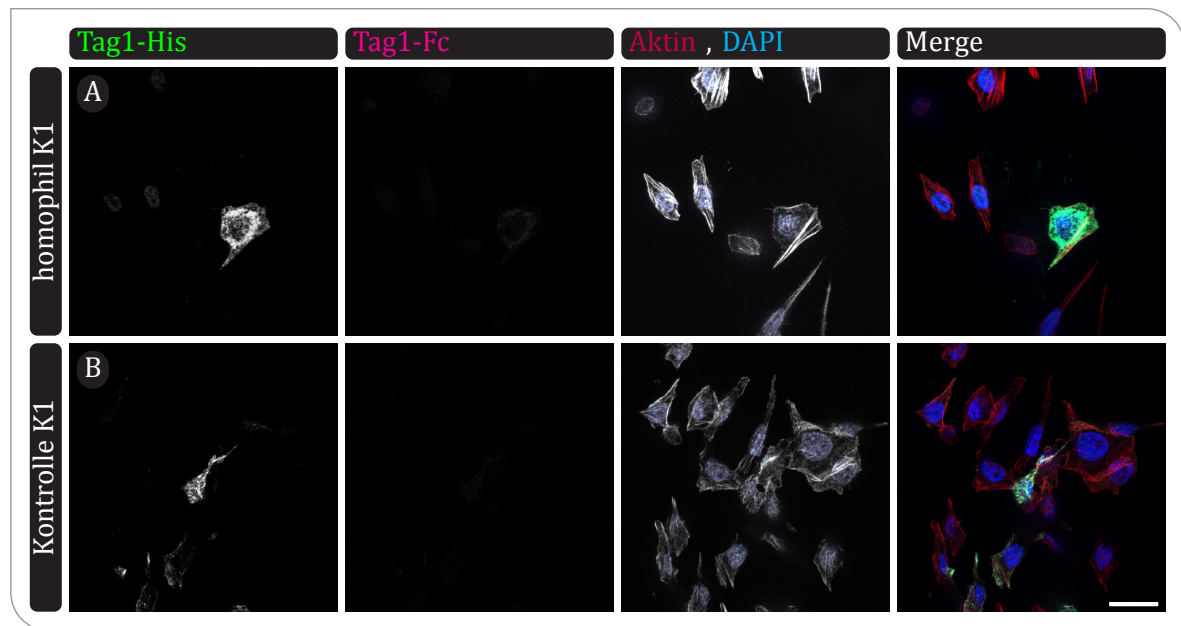


Abbildung 34: Tag-1 interagiert in Zellen Overlay-Assays sehr schwach homophil. CHO-K1 Zellen exprimieren Tag-1-His auf der Zellmembran (grün). Werden diese Zellen mit rekombinantem Tag-1-Fc inkubiert (magenta), können die Proteine in sehr geringem Maße aneinander binden (Merge). (B) Die Kontroll-Inkubation Tag-1-exprimierender Zellen (grün) mit humanem Fc (magenta) führt zu keiner Bindung. Die Zellumrisse wurden mit einer Aktin- und DAPI-Färbung visualisiert (rot, blau). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Ein aktuelles Interaktionsmodell beschreibt die homophile *trans* Interaktion von humanem Tag-1 (Mortl et al., 2007). Hierbei treten die antiparallelen  $\beta$ -Stränge der beiden Ig2-G-Stränge miteinander in Wechselwirkung. Ausschlaggebend für eine Dimerisierung der Stränge sind die hydrophoben Taschen, die durch die Benzolringe der drei Phenylalanine (F143, F185 und F194) gebildet werden (Mortl et al., 2007). Ein Sequenzvergleich unterschiedlicher Spezies miteinander zeigt, dass entsprechend dieses Modells die Bereiche zwischen Mensch, Maus und Huhn konserviert sind. Allein der Zebrafisch besitzt an Stelle des F185 ein Valin (V185) und an Stelle F194 ein Alanin (A194). Die für die Dimerisierung wichtigen Benzolringe fehlen.

Aus anderen Vertebraten ist bereits bekannt, dass TAG-1 heterophile Bindungen mit einigen neuronalen Zellerkennungsmolekülen eingehen kann. Hierzu gehören unter Anderem L1 (Kuhn et al., 1991), NgCAM (Buchstaller et al., 1996),  $\beta$ Integrin (Felsenfeld et al., 1994) und NCAM1 (Milev et al., 1996). Ob sich Tag-1 des Zebrafischs auch heterophil mit Ncam1a oder Ncam1b interagieren kann, ist bisher nicht untersucht. Da es aber transient auf Motoraxonen exprimiert wird (Dodd et al., 1988) und das Projektionsverhalten von Wachstumskegeln beeinflusst (Wolman et al., 2008) stellt es in jeder Hinsicht einen potentiellen Bindepartner für die Ncam1-Paraloge dar.

In Overlay-Assays wurden CHO-2A10 Zellen mit Ncam1a (grün) transfiziert und mit rekombinantem Tag-1 (magenta) überlagert. Beide Proteine kolokalisieren miteinander (Abb. 35 A). Exprimieren die Zellen Ncam1b auf ihrer Oberfläche (grün), findet auch hier eine Assoziation von Tag-1 (magenta) an Ncam1b statt (Abb. 35 B).

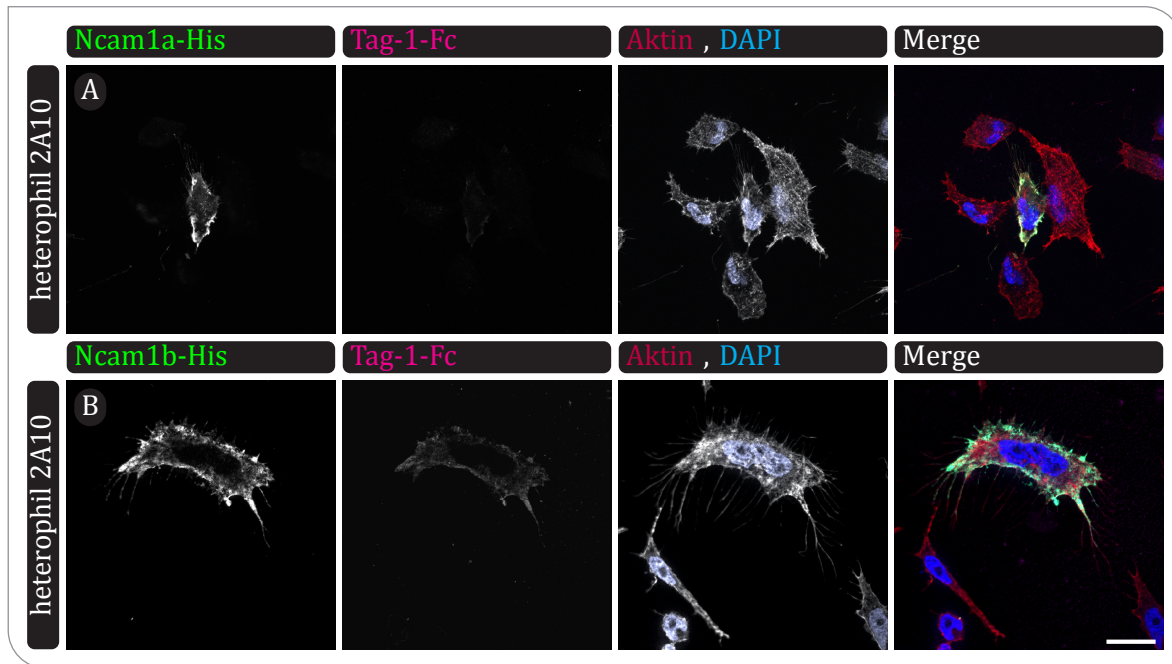


Abbildung 35: Tag-1 interagiert nicht mit Ncam1a aber heterophil mit Ncam1b. (A) CHO-2A10 Zellen exprimieren Ncam1a-His auf der Zelloberfläche (grün). Diese Zellen wurden mit rekombinantem Tag-1 inkubiert (magenta). Es kommt zu keiner Koloration von Ncam1a mit Tag-1 (Merge). Die beiden Proteine können nicht miteinander in Wechselwirkung treten. (B) Auch Ncam1b wurde auf CHO-2A10 Zellen exprimiert (grün). Die Inkubation mit Tag-1 (magenta) führt zu einer heterophilen Bindung an Ncam1b (Merge). Die Zellumrisse wurden mit einer Aktin- und DAPI-Färbung visualisiert (rot, blau). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass bezüglich der heterophilen Interaktion mit Tag-1 ein weiterer Unterschied zwischen den Paralogen Ncam1a und Ncam1b vorliegt. Ncam1b kann heterophil mit Tag-1 interagieren. Dies stimmt mit der beschriebenen Situation der Orthologe Ncam1 und Axonin-1 im Huhn überein. Eine heterophile Interaktion zwischen Ncam1a und Tag-1 bleibt aus.

#### 4.3.2 Neurolin interagiert homophil mit sich selbst und heterophil mit den Ncam1-Paralogen

Neurolin im Zebrafisch ist das humane ALCAM-Ortholog. Für ALCAM ist bekannt, dass es homophile Wechselwirkungen eingeht (Kempen et al., 2001). Neben der homophilen Interaktion gibt es auch beschriebene heterophile Bindepartner von ALCAM, beispielsweise mit dem L1-verwandten NrCAM (DeBernardo & Chang, 1996). Eine heterophile Interaktion zwischen ALCAM und NCAM1 ist bisher noch nicht beschrieben.

Ob auch das Zebrafisch Ortholog Neurolin homophile Interaktionen oder heterophil mit Ncam1a oder Ncam1b in Wechselwirkung tritt, ist bisher noch nicht bekannt. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden Bead-Aggregationen und Overlay-Assays angefertigt.

In der Bead-Aggregation bilden Neurolin beschichtete Partikel homophile Aggregate. Die Aggregatsgröße bewegt sich zwischen einem und 300 Beads, es treten aber auch vereinzelt einige größere Cluster mit maximal 880 Beads auf. (Abb. 36 A). Es verhält sich also in diesem Bezug wie sein humanes Ortholog. Diese Reaktion ist spezifisch für Neurolin, da die Kontroll-Partikel beschichtet mit humFc nicht aggregieren (Abb. 36 B).

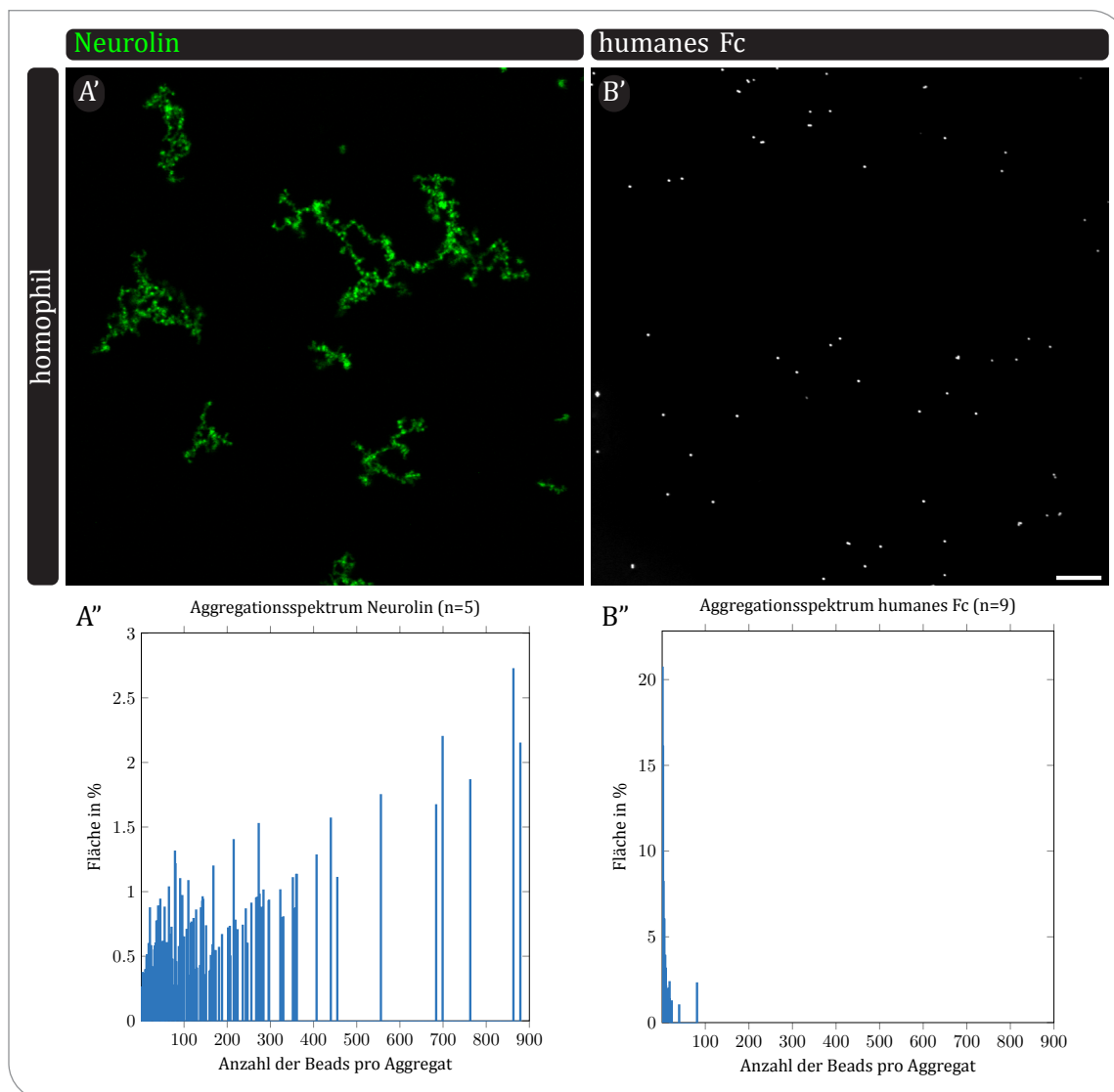


Abbildung 36: Neurolin interagiert homophil. (A) Neurolin-beschichtete Partikel bilden Aggregate zwischen zehn und 300 Beads aus. Neurolin verhält sich wie sein humanes Ortholog. (B) Partikel die mit humanem Fc in einer Kontrollreaktion beschichtet wurden aggregieren nicht. (C) Der Maßstabsbalken gilt für A und B und entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Um die heterophilen Interaktionen von Neurolin mit den Ncam1-Paralogen zu untersuchen, wurden CHO-2A10 Zellen mit Ncam1a bzw. Ncam1b transfiziert. Werden die Zellen in den Overlay-Assays mit Neurolin inkubiert, kann dieses nur sehr schwach mit Ncam1a (Abb. 37 A) und etwas stärker mit Ncam1b interagieren (Abb. 37 B).

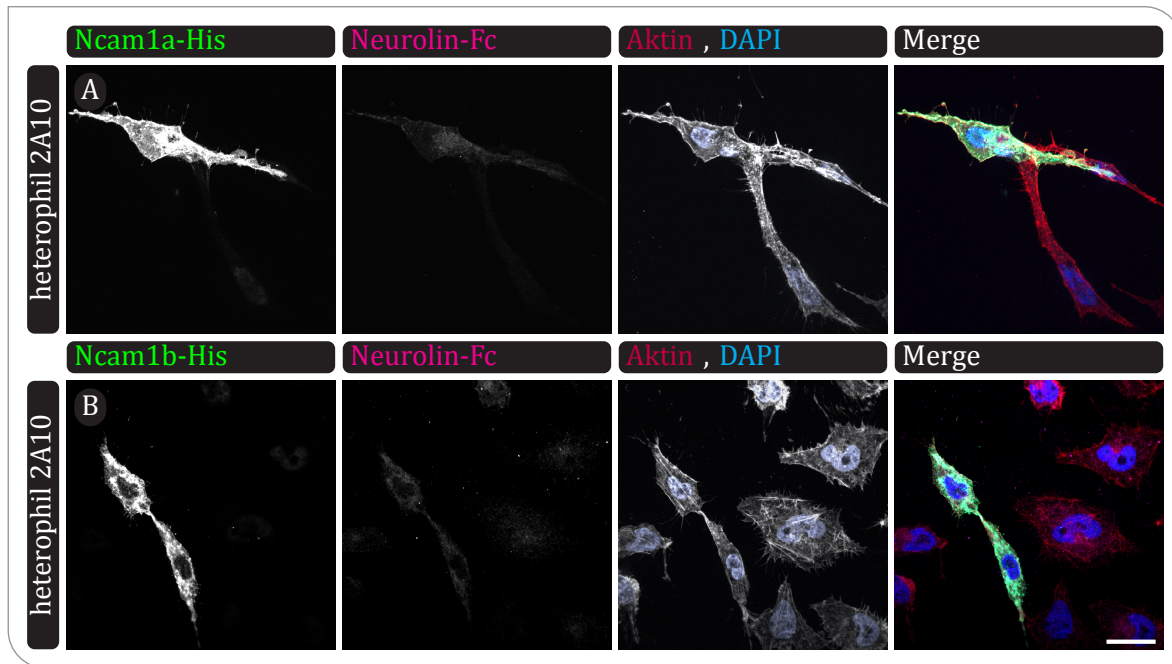


Abbildung 37: Neurolin interagiert schwach heterophil mit Ncam1a und Ncam1b. (A) polySia-negative CHO-2A10 Zellen exprimieren Ncam1a-His auf der Zelloberfläche (grün). Diese Zellen wurden mit rekombinantem Neurolin inkubiert (magenta). Der Merge zeigt die Kolo-kalisation der beiden Proteine. Neurolin bindet in einer heterophilen Reaktion schwach an Ncam1a. (B) Auch Ncam1b wurde auf CHO-2A10 Zellen exprimiert (grün). Die Inkubation mit Neurolin (magenta) führt ebenso zu einer schwachen heterophilen Bindung an Ncam1b (Merge). Die Zellumrisse wurden mit einer Aktin und DAPI Färbung visualisiert (rot, blau). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 Native Interaktionspartner der Ncam1-Paraloge

In den bisher durchgeführten Experimenten wurden immer definierte Komponenten, d.h. rekombinant exprimierte Proteine auf ihre Wechselwirkungen miteinander untersucht. In den weiterführenden Untersuchungen lag der Fokus auf der Identifizierung von Wechselwirkungen mit nativen Bindungspartnern. Hierfür wurden die rekombinanten Proteine als Sonde in Affinity-Probes, bzw. als immobilisierten *bait* in Pulldown-Assays verwendet.

##### 4.4.1 Hinweise auf Interaktionspartner von Ncam1a und Ncam1b

In *Whole-Mount Affinity-Probes* wurden rekombinantes Ncam1a-Fc und Ncam1b-Fc als Sonde verwendet um die Lokalisation von Bindungspartnern im Embryo *in situ* zu ermitteln. Da die Färbungen häufig unzureichende Qualität hatten, wurden die Ergebnisse schriftlich zusammengefasst und nur einige repräsentative Konfokalbilder aufgenommen.

Die Ncam1a-Sonde bindet native freie Interaktionspartner auf den Somiten die den Rumpf oberflächlich durchziehen. Zu den Entwicklungsstadien von 24, 30 und 48 hpf ist diese diffuse Bindung in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten. Abbildung 38 A zeigt einen Embryo zu 24 hpf, der GFP unter dem Seitenlinienorgan-spezifischen ClaudinB Promotor (Tg(cldB::GFP)). Im Rumpf kann ein gradueller Bindepartner von Ncam1a detektiert werden. Dieser beginnt bei 24 hpf sehr weit cranial auf Höhe des vierten Somiten. Mit fortschreitendem Alter wird die craniale Grenze immer weiter nach caudal verschoben und befindet sich nach 30 hpf auf Höhe des 12. Somiten. Nach 48 hpf befindet sie sich in Nähe der Schwanzspitze bei etwa dem 22. Somiten. Diese Beobachtungen korrelieren mit der Wachstumsbewegung des Primordium (Chitnis et al., 2012). Wird die polySia-Expression durch einen Knockdown verhindert, wird die Position des Bindepartners von Ncam1a nach cranial in Richtung des 14. Somiten verschoben (Abb. 38 B). Auch diese Beobachtung stimmen mit dem Verhalten des Primordiums überein (Heiny, 2012; laufende Doktorarbeit R.



Dries).

Wird eine Ncam1b-Sonde verwendet, kann ein ebenso den Rumpf durchziehendes, unspezifisches Muster detektiert werden. Allerdings verändert sich diese weder temporal noch durch einen *st8sialII*-Knockdown und durchzieht den Embryo im beobachteten Zeitraum (24 - 48 hpf) von cranial bis caudal (Daten nicht gezeigt).

Daraus ergibt sich, dass Ncam1a einen möglichen Einfluss auf die Migration des Primordiums haben könnte.

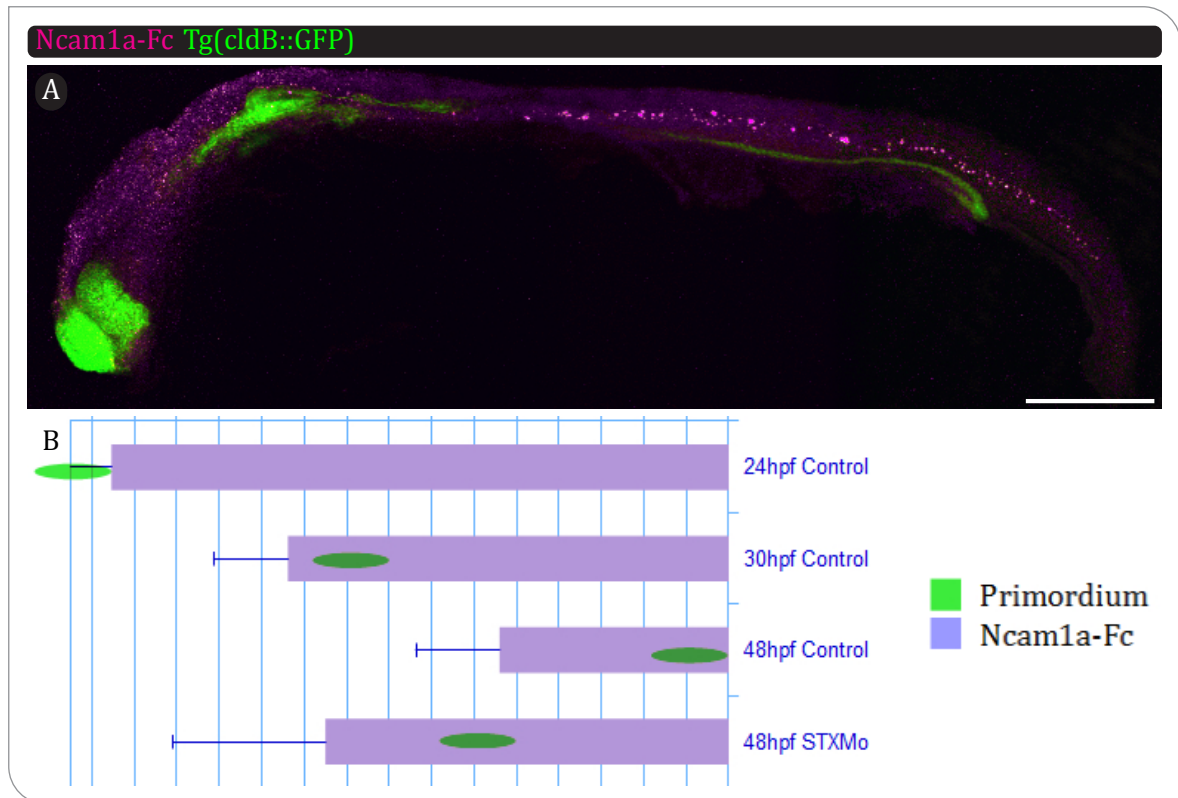


Abbildung 38: Native Bindepartner von Ncam1a sind auf dem Rumpf lokalisiert. (A) Ncam1a-Fc bindet nach 24 hpf in einem graduellen und punktförmigen Muster an den Rumpf 24 hpf alter Embryonen (magenta). Die Embryonen exprimieren GFP unter dem Seitenlinien-spezifischen Promotor ClaudinB (grün). (B) Betrachtet man Zeitpunkte von 24, 30 und 48 hpf reduziert sich der Bindepartner immer weiter Richtung Schwanzspitze. Ein Knockdown von *st8sialII* verbreitert das Bindemuster von Ncam1a. Alle Beobachtungen korrelieren mit dem Wachstumsverhalten des Primordiums (p). Der Maßstabsbalken aus A entspricht 50 µm.

Der Verlust von polySia legt für Ncam1a außerdem auch native Bindepartner auf den Zellen des Rückenmarks, auf der Floorplate sowie auf muskulären Strukturen frei (Abb. 39 A). Diese Bindeaffinität ist spezifisch für Ncam1a, da der Fc-Tag allein zu keiner Bindung führt (Abb 39 B).

Ncam1b hat weder freie Bindepartner zu 48 Stunden noch nach einem *st8sialII*-Knockdown (Daten nicht gezeigt).

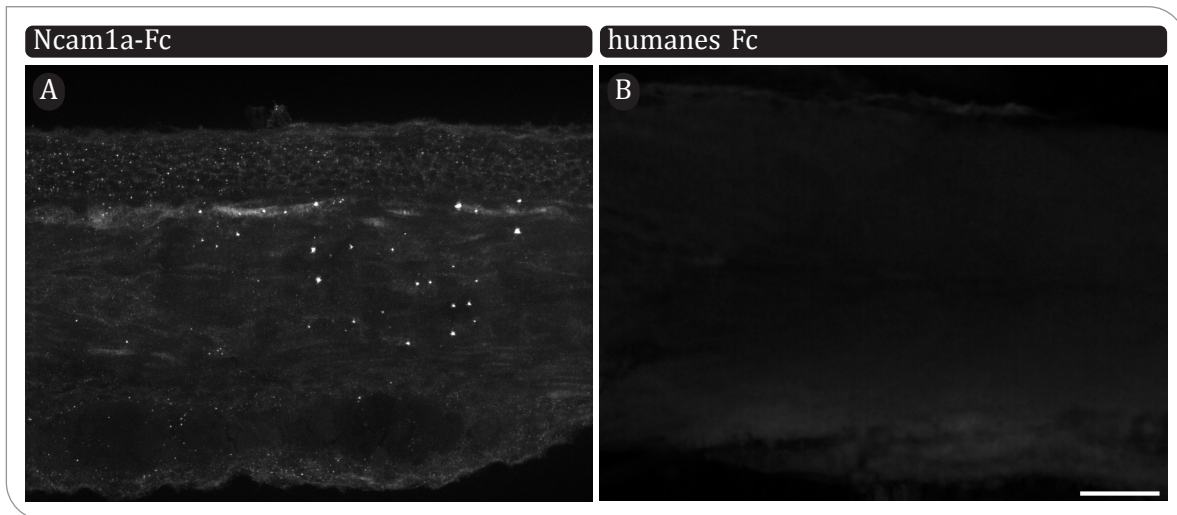


Abbildung 39: Ncam1a-Affinitätssonden detektieren native Bindepartner von Ncam1a auf Zellen des Rückenmarks, der Floorplate und auf muskulären Strukturen *st8SialII*-Knockdown. Lateralanschnitte von Konfokalaufnahmen 48 hpf alter Embryonen, cranial ist links. (A) Nach einem Knockdown der Sialyltransferase kann die Ncam1a-Sonde an den Zellkörpern des Rückenmarks und an den Somiten freie Bindungspartner lokalisieren. (B) Die Kontroll-Sonde aus humanem Fc allein, führt zu keiner Affinität. Der Maßstabsbalken gilt für beide Abbildungen und entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Eine Problematik dieses Experimenteaufbaus ist die Tatsache, dass die Sonde nur dann an native Bindungspartner assoziieren kann, wenn diese nicht bereits durch andere Bindepartner okkupiert oder beispielsweise durch polySia nicht für andere Moleküle zugänglich sind.

Daher wurden in einem weiteren Ansatz die Tg(hb9::GFP) Larven erst zu 10 dpf fixiert um diese Optionen zu minimieren. Die konfokalen Aufnahmen zur Bindung der Affinitätssonden zeigen einen Lateralanschnitt 10 dpf (Lateralansicht 10 dpf, Abb. 40). Die Ncam1a-Sonde bindet an keine spezifische Struktur (Lateralansicht 10 dpf, Abb. 40 A, magenta). Es treten lediglich einige diffuse Färbungen auf den Somiten auf. Diese befinden sich aber in unmittelbarer Nähe zum Motoraxonbündel (grün). PolySia wird auch noch nach 10 Tagen auf den Axonen von Motoneuronen exprimiert. Außerdem ist in dieser Aufnahme position auch die Expression von polySia auf dem Seitenliniennerv zu erkennen. Die Zellkörper tragen die Glykanmodifikation zu diesem Zeitpunkt nicht mehr (blau).

Die Ncam1b-Sonde (Abb. 40 B, magenta) trifft auf einen freien Interaktionspartner sowohl auf Motoraxonen (grün) als auch auf dem Seitenliniennerv. Die Affinität der Ncam1b-Fc Sonde wird durch die Anwesenheit von polySia (blau) nicht verhindert.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Effekte durch den Fc-Tag hervorgerufen wurden, diente humanes Fc als Kontrollsonde. Dieses kann an keine der Strukturen binden (Abb. 40 C).



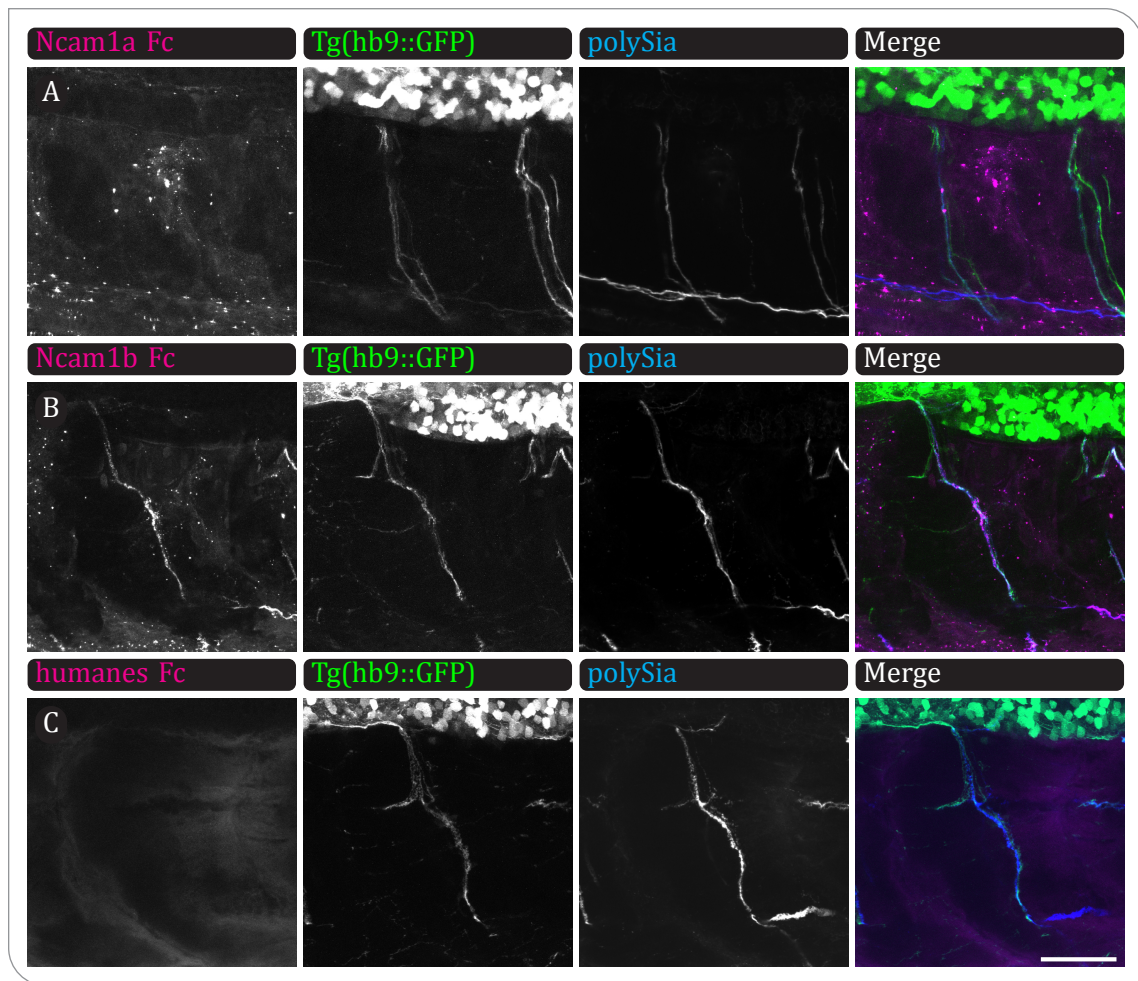


Abbildung 40: Native Bindungspartner von Ncam1a und Ncam1b auf den Motoraxonen und dem Seitenliniennerv. Lateralausschnitte von Konfokalaufnahmen 10 dpf alter Larven, cranial ist links. (A) Ncam1a bindet in diffusem Muster an die Somiten (magenta). Die Motoneurone exprimieren GFP (grün) und tragen polySia (blau). Dieses ist auch auf dem Seitenliniennerv vorzufinden. (B) Ncam1b (magenta) lokalisiert native Bindepertner auf den Motoraxonen (grün) und dem Seitenliniennerv. Diese Interaktion ist unabhängig von polySia, da sie auf beiden Strukturen stattfindet (blau). (C) Die humFc Kontrolle zeigt keinerlei Bindeaffinität. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es für Ncam1a auf nicht näher zu definierende Strukturen auf dem Rumpf gibt. Auffällig war, dass sich die scheinbar unspezifische Affinität der Ncam1a-Sonde mit fortschreitendem Alter immer weiter nach caudal verschiebt. Die Grenze des Bindepertners korreliert mit der Position des Primordiums. Der *st8siall*-Knockdown führt neben den bereits beschriebenen Effekten außerdem zu einer Wachstumsverzögerung des Primordiums. Zudem verschiebt sich die Grenze des Ncam1a-Bindepertners weiter nach cranial, was ebenso mit der Position des Primordiums übereinstimmt (Heiny, 2012; laufende Doktorarbeit R. Dries). Unabhängig vom Primordium zeigt eine Detailaufnahme, dass es nach einem *st8siall*-Knockdown zusätzlich freie Bindungspartner auf Zellkörpern des Rückenmarks, der Floorplate sowie auf den Somiten native Bindungspartner gibt. Außerdem konnte nach 10 dpf eine diffuse Bindung um den Bereich der Motoraxone detektiert werden. Da zu diesem Zeitpunkt noch polySia auf den Axonen exprimiert wird, kann hier die Ncam1a-Sonde aufgrund dessen vermutlich nicht binden. Die Ncam1a-Interaktion wird also auch unter nativen Bedingungen von polySia beeinträchtigt.

Die Ncam1b-Sonde hat zu 48 hours post fertilization (hpf) keine freien Bindepertner. Erst nach 10 dpf sind kann die Sonde auf den Motoraxonen und auf dem Seitenliniennerv native Interaktionspartner binden. Die Anwesenheit von polySia scheint die Wechselwirkung auch unter nativen Bedingungen nicht zu beeinträchtigen.

#### 4.4.2 Pulldown Assays bestätigen Interaktion von Ncam1b mit Tag-1

In Pulldown Assays wurden die nativen Bindungspartner von Ncam1b untersucht und versucht näher zu beschreiben. Dazu wurde mit einer Präparation angereicherter Motoneuronen (GFP+) und einer Präparation nicht-motoneuronaler Zellen (GFP-) gearbeitet. Diese wurden über Fluoreszenzflusssortierung (*fluorescence-activated cell sorting* (FACS)) voneinander getrennt (FACS Kooperation mit Yuya Hayashi) und anschließend für 48 Stunden auf Laminin inkubiert. Zellhomogenate wurden mit Ncam1b-Fc inkubiert, um native Interaktionspartner zu isolieren. Als Kontrolle diente humanes Fc. Der Proteinkomplex wurde über Protein-G-Sepharose extrahiert und in einem Western Blot mit einem Tag-1 spezifischen Antikörper ausgewertet.

Wurden die Zellhomogenate mit Ncam1b-Fc Protein inkubiert, kann im Western Blot mit einem Antikörper Tag-1 spezifischen Antikörper sowohl in GFP- als auch GFP+ Fraktionen eine Bande bei etwa 25 kDa und eine bei etwas mehr als 130 kDa nachgewiesen werden. Das 25 kDa große Protein kommt in allen Fraktionen vor und entspricht vermutlich dem Protein-G des Substrats. Tag-1 ist ein verhältnismäßig großes Molekül der Ig-Superfamilie mit etwa 135 kDa (Dodd et al., 1988) und entspricht damit der Größe der oberen Bande. Da Tag-1 neben Motoraxonen auch auf anderen Axonen des Nervensystems exprimiert wird, kann diese Immunreaktion sowohl in GFP- als auch GFP+ nachgewiesen werden. Die Spezifität dieses Effekts kann dadurch gezeigt werden, dass das Fc-Tag ist, zeigt die Inkubation der Zellhomogenate mit humFc. Dies führt im Western Blot zu keiner Immunreaktion. Tag-1 konnte über einen Pulldown Assay als nativer, heterophiler Interaktionspartner von Ncam1b bestätigt werden.

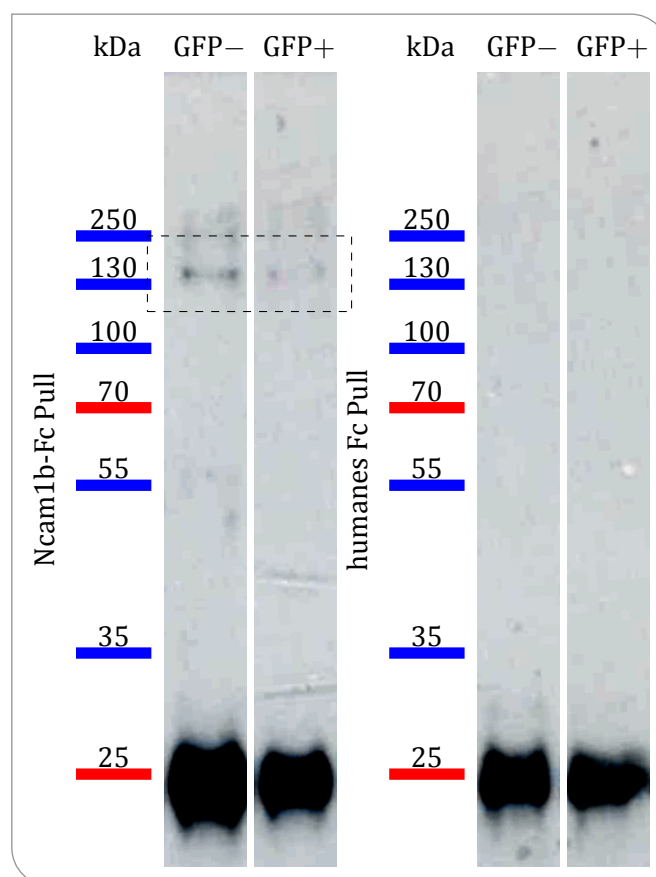


Abbildung 41: Pulldown-Assay bestätigt Tag-1 als nativen Interaktionspartner Ncam1b. Der Western Blot zeigt die Immunreaktion eines Tag-1 spezifischen Antikörpers auf einen Pulldown von Ncam1b-Fc bzw. humanem Fc GFP-negativer (GFP -) und -positiver (GFP +) Zellhomogenate. Es treten zwei Banden auf. Das 25 kDa große Fragment entspricht vermutlich dem Protein G der Sepharose-Partikel und kommt in allen Fraktionen vor. Die 130 kDa große Bande tritt nur bei Fraktionen mit Ncam1b-Pulldown auf und entspricht Tag-1.

Der Pulldown-Assay bestätigt die Annahme, dass Ncam1b mit Tag-1 in Wechselwirkung treten kann und eröffnet einen neuen, interessanten Aspekt in Bezug auf neuronale Wegfindung in der Ncam1b eine wichtige Rolle einzunehmen scheint.

## 4.5 Spinale Motoneurone im Zellkultursystem

Bisherige Untersuchungen zur Funktion von Ncam1a und Ncam1b beim Auswachsen von spinalen Motoneuronen wurden stets *in vivo*, d.h. im kompletten Embryo durchgeführt. In diesem System ist es möglich, Gene durch Mutation oder Morpholino-Knockdown auszuschalten, nicht aber den auswachsenden Axonen definierte Bedingungen in ihrer Umgebung zu präsentieren. Um das zu ermöglichen, wurden Primärzellkulturen etabliert, in denen hb9::GFP-markierte Motoneurone aus Embryonen im 18 - 20 Somiten-Stadium isoliert und anschließend auf Deckgläsern ausgesät wurden, die mit Laminin oder Ncam1a/b beschichtet waren. Nach 48 Stunden wurden die Motoneurone fixiert und durch GFP- und Immunfluoreszenz ausgewertet. Es wurden dabei nur Neurone ausgewertet, die isoliert vorlagen und keine Kontakte zu anderen Zellen hatten.

### 4.5.1 Phänotypische Kategorien in Motoneuronen Primärzellkulturen

Motoneurone in der Primärzellkultur wurden nach der Morphologie auswachsender Axone in drei phänotypische Kategorien unterteilt (Abb. 42). Der **Outgrowth** Phänotyp repräsentiert die Gruppe der Motoneurone mit einem Zellkörper dem ein oder zwei unverzweigte axonale Projektionen entspringen (Abb. 42 A). Der **Branched** Phänotyp entspricht Motoneuronen von deren Zellkörper ein oder mehrere stark verzweigte Projektionen ausgehen (Abb. 42 B). Hat ein Motoneuron keine Neuriten, ist aber nach der Zellkernfärbung zu urteilen vital, entspricht dies dem **No Outgrowth** Phänotypen (Abb. 42 C).

In dieser Form wurden die von mir etablierten Kategorien in einer eng betreuten Masterarbeit bereits verwendet (Walter, 2014).

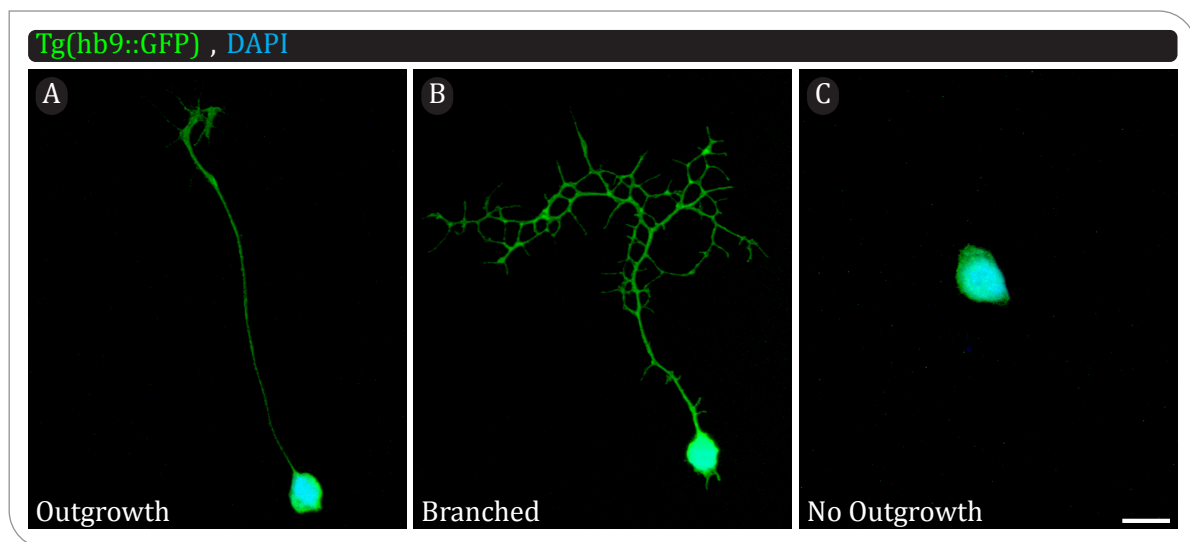


Abbildung 42: Motoneuronen-Phänotypen isoliert auf Laminin. GFP exprimierende Motoneurone zeigen unterschiedliche Phänotypen in der Primärzellkultur. Die Zellkerne der Neuronenkulturen wurden nach dem fixieren mit DAPI gefärbt (blau). (A) Motoneurone, die dem Outgrowth Phänotypen entsprechen, entsenden ein oder zwei Axone in die Peripherie. (B) Dem Branched Phänotypen entsprechen Motoneurone deren axonale Projektion stark verzweigt ist. (C) Bilden die Motoneurone keine Neuriten aus, entsprechen sie dem No Outgrowth Phänotypen. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 10  $\mu$ m.

Alle drei Kategorien kommen sowohl in Zellpopulationen uninjizierter Kontrollen (w/o I: N = 6, n = 965) als auch in Kontroll-Morpholino-injizierten Kontrollen (C-MO: N = 9, n = 2463) vor (Abb. 43). Nach statistischem Vergleich der Kontrollgruppen führt die Mikroinjektion in der Zellkultur zu keiner signifikanten Veränderung der prozentualen Verteilung der Kategorien ( $\chi^2$ -Test:  $p \geq 0,01$ ). Die Kontroll-Morpholino-injizierten Zellpopulationen dienen in den weiteren Analysen als Kontrollgruppe. Mit  $49 \% \pm 13$  wird der Outgrowth-Phänotyp in Kontroll-Morphanten mit  $50 \% \pm 10$  repräsentiert. Der Branched-Phänotyp tritt mit  $18 \% \pm 8$  und der No Outgrowth-Phänotyp mit  $32 \% \pm 4$  auf.

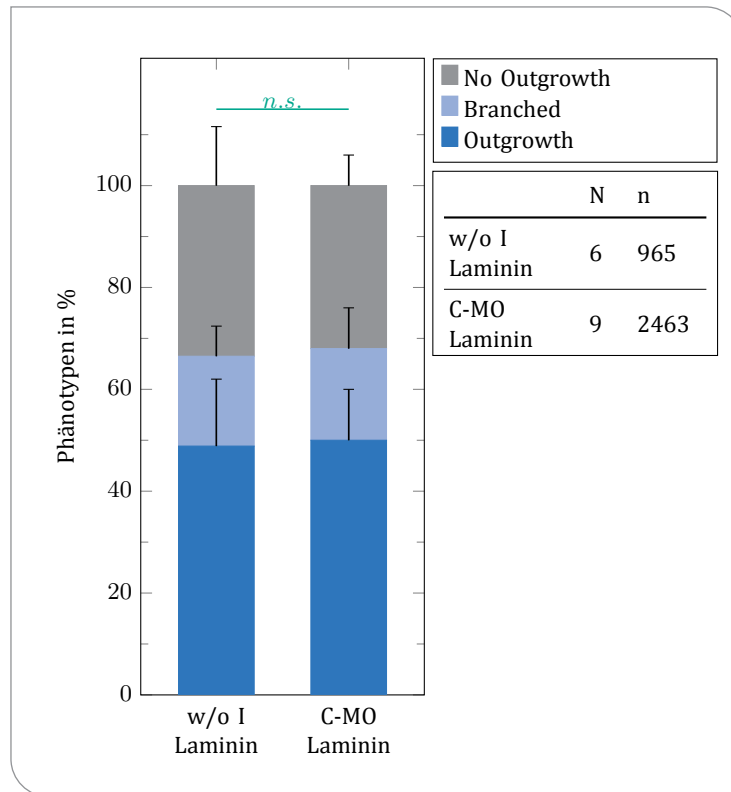


Abbildung 43: Quantifizierung der Projektionsmuster von Motoneuronen unterschiedlicher Kontrollen auf Laminin. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.). Abkürzungen: w/o I Laminin: ohne Injektion auf Laminin, C-MO Laminin: Kontroll-Morpholino-Injektion auf Laminin, n.s.: nicht signifikant, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Zellen.

Das Auswachsverhalten eines isolierten Motoraxons (C-MO injiziert) auf Laminin ist in Abb. 44 in Momentaufnahmen aus einer Zeitrafferserie dargestellt. (Videodatei M 1 auf angehängter CD ; n = 8 von 12). Das Motoneuron adhärirt innerhalb von fünf Minuten auf der Oberfläche und erkundet mit den Wachstumskegeln die Umgebung. Dabei werden bis zum Abschluss der Dokumentation (75 Minuten) zwei unverzweigte Neuriten ausgebildet, der Zellkörper verlässt nachdem er die Zellkontakte ausgebildet hat, die ursprüngliche Position kaum.



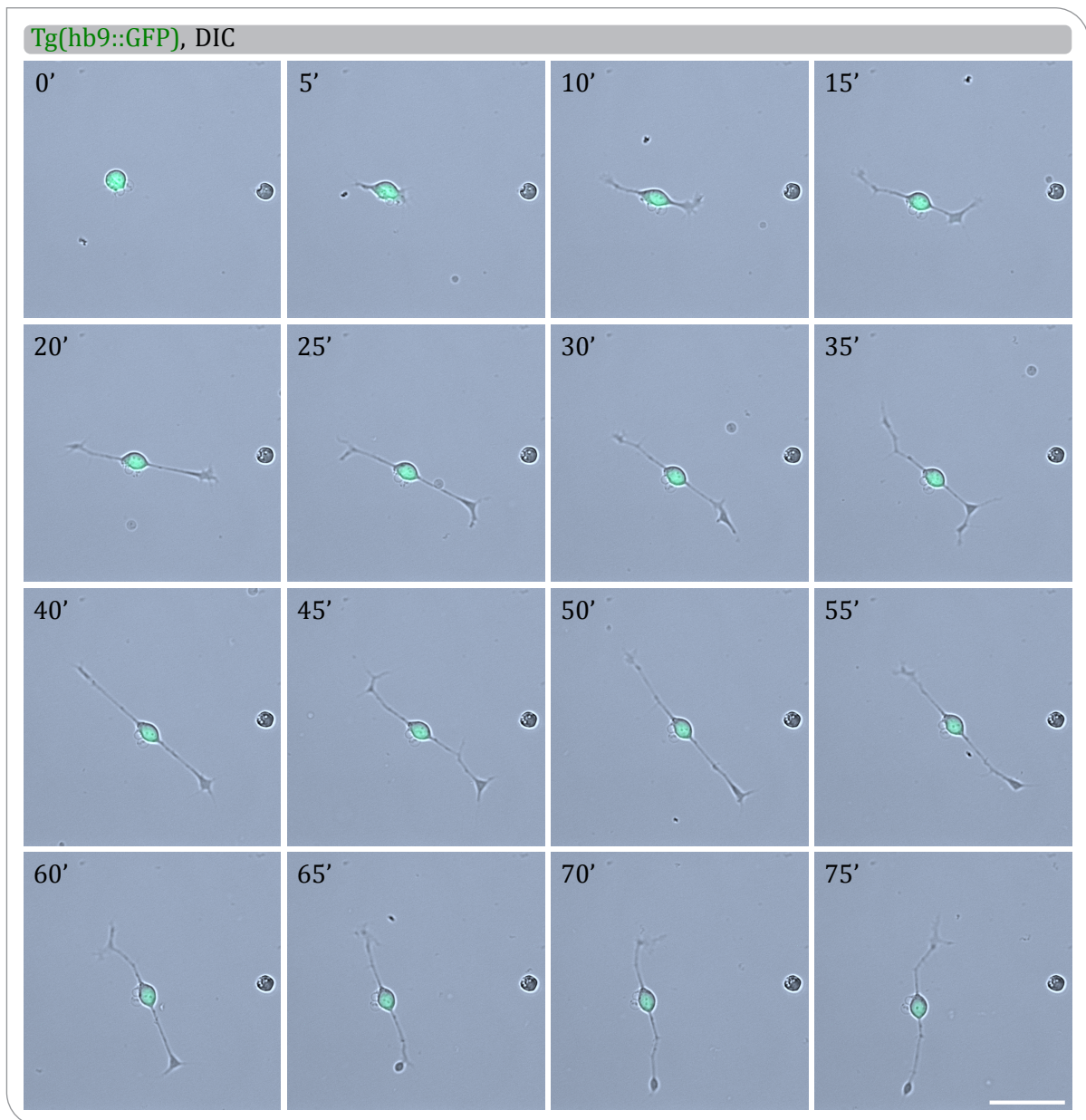


Abbildung 44: Zeitrafferaufnahme eines Kontroll-Motoneurons auf Laminin. Das Motoneuron wurde im Fünfminuten-takt über 75 Minuten dokumentiert ( $n = 12$ ). Nachdem das GFP exprimierende Motoneuron auf Laminin adhärirt hat, projiziert es zwei Neuriten in die Peripherie ( $n = 8$  von 12 beobachteten Zellen). Auch nach 75 Minuten befindet sich der Zellkörper an seiner Ursprungsposition. Lediglich die Neuriten werden verlängert. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht  $20\ \mu\text{m}$ .

#### 4.5.2 Motoneurone auf unterschiedlichen Substraten: Ncam1a und Ncam1b sind permissiv

Um Neuritenwachstum *in vitro*, d.h. in der Primärzellkultur zu ermöglichen, werden neben Nährstoffen im Zellkulturmedium auch spezielle wachstumsfördernde Substanzen benötigt. Hierzu zählen Zelladhäsionsmoleküle und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) (Clark et al., 1993). Das Standardsubstrat für das Neuritenwachstum in Zellkulturen ist das permissiv wirkende quervernetzte ECM Protein Laminin. Laminin schafft die nötige Umgebung für neuronales Wachstum (Manthorpe et al., 1983; Clark et al., 1993; Bonner & O'Connor, 2001). Laminin ist ein standardisiertes Wachstumssubstrat für Neuronenkulturen. Es verbessert das Neuritenwachstum gegenüber Fibronectin und Poly-L-Lysin signifikant (Z. Chen et al., 2013). Diese Daten konnten durch eine betreute Masterarbeit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Sauer, 2013).

Der experimentelle Ansatz, isolierte Neurone auf Ncam1-funktionalisierten Oberflächen auswaschen zu lassen erlaubt es zu untersuchen, welchen Einfluss die Interaktion mit Proteinen in der Umgebung haben. Dabei können rekombinantes Ncam1a und Ncam1b sowohl in homogener Beschichtung als auch in Streifenbeschichtung Laminin/Ncam1 verwendet werden.

Es lassen sich auf diese Weise Axon/Axon *trans*-Interaktionen und *trans*-Interaktionen zwischen den Axonen und den Geweben in das sie einwandern simulieren. Außerdem kann der gleichzeitige Einsatz von Morpholino-Knockdowns Hinweise darauf geben ob das Zielprotein innerhalb der Membran (in *cis*) für eine Ncam1-vermittelte Signalweiterleitung nötig ist oder ob die Interaktion auf einer *trans*-Bindung basiert und damit eine Signalkaskade nur durch die extrazelluläre Domäne von Ncam1 stimuliert wird.

Die Motoraxone aus Kontrollen auf Laminin entsprechen mit  $50 \% \pm 10$  dem Outgrowth-Phänotypen (C-MO Laminin; N = 9, n = 2463). Werden Motoneuronen aus C-MO injizierten Populationen auf Ncam1a (C-MO Ncam1aFc) oder Ncam1b (C-MO Ncam1bFc) homogen beschichteten Substraten ausgesät, verändert sich die Verteilung der Phänotypenkategorien nicht signifikant (Abb. 45; C-MO Ncam1aFc: N = 4, n = 684,  $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ; C-MO Ncam1bFc: N = 5, n = 787  $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ). Da es sich bei den rekombinanten Proteinen um Chimären mit einem humanem Fc-Tag handelt, wurde humanes Fc als Kontroll-Substrat verwendet. In diesen Kontrollen weisen  $91 \% \pm 4$  der Neurone den *no outgrowth* Phänotypen auf. Die Ausbildung von Neuriten auf humanem Fc als Wachstumssubstrat ist reduziert und unterscheidet sich hoch signifikant zur Kontrolle (C-MO humFc: N = 4, n = 1053,  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ).

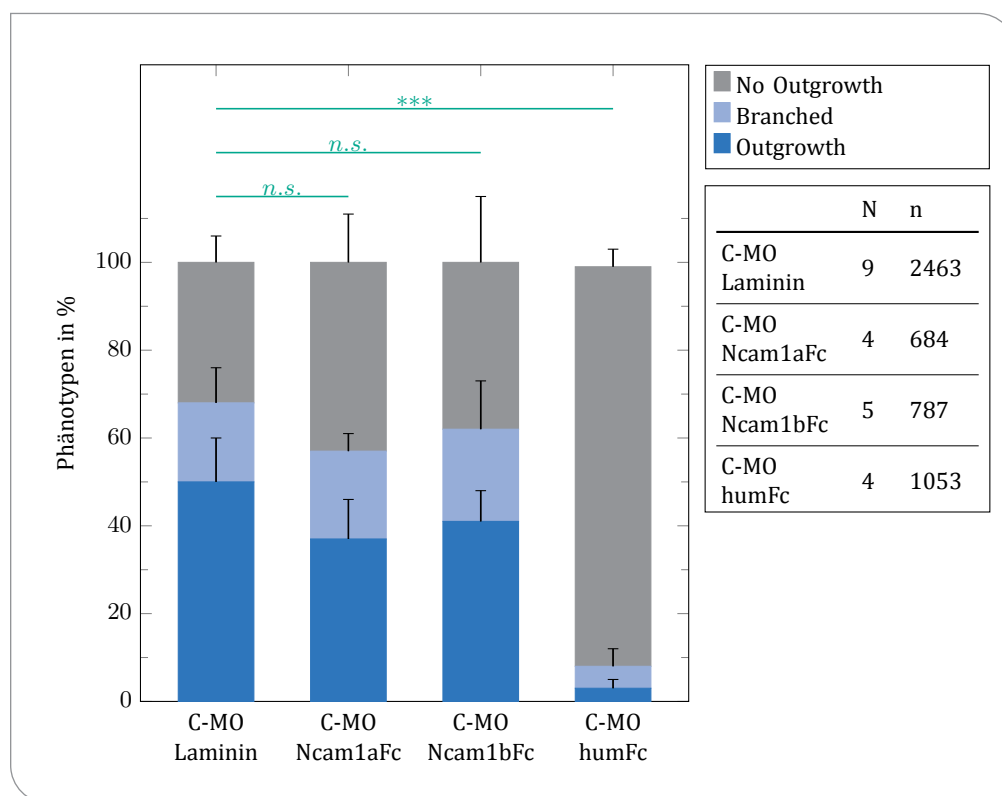


Abbildung 45: Quantifizierung des Projektionsmusters von Motoneuronen auf unterschiedlichen Substraten. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung auftretender Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*\*). Abkürzungen: C-MO Laminin: Kontroll-Morpholino-Injektion auf Laminin, C-MO Ncam1aFc: Kontroll-Morpholino-Injektion auf rekombinantem Ncam1a-Fc Protein, C-MO Ncam1bFc: Kontroll-Morpholino-Injektion auf rekombinantem Ncam1b-Fc Protein, C-MO humFc: Kontroll-Morpholino-Injektion auf humanem Fc, n.s. : nicht signifikant, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Zellen



Wird den Motoneuronen in Streifenassays neben Laminin auch Ncam1b angeboten, zeigen diese keine Präferenz für Laminin oder das Ncam1-Paralog. Sie sind gleichermaßen auf Laminin ( $51 \% \pm 7$ ;  $N = 4$ ,  $n = 112$ ) wie auf Ncam1b ( $49 \% \pm 5$ ;  $N = 4$ ,  $n = 122$ ) vorzufinden (Zweistichproben-t-Test, zweiseitig:  $p < 0,01$ ).

Stellvertretend zeigt die Zeitrafferaufnahme ein Kontroll-Motoneuron auf alternierenden Streifen von Laminin (orange) und Ncam1b (nicht gefärbte Bereiche) (Abb. 46). Über einen Zeitraum von 75 Minuten zeigt das Motoneuron keine Präferenz und überwächst mit dem Wachstumskegel beide Proteine ( $n = 5$  von 7 beobachteter Zellen).

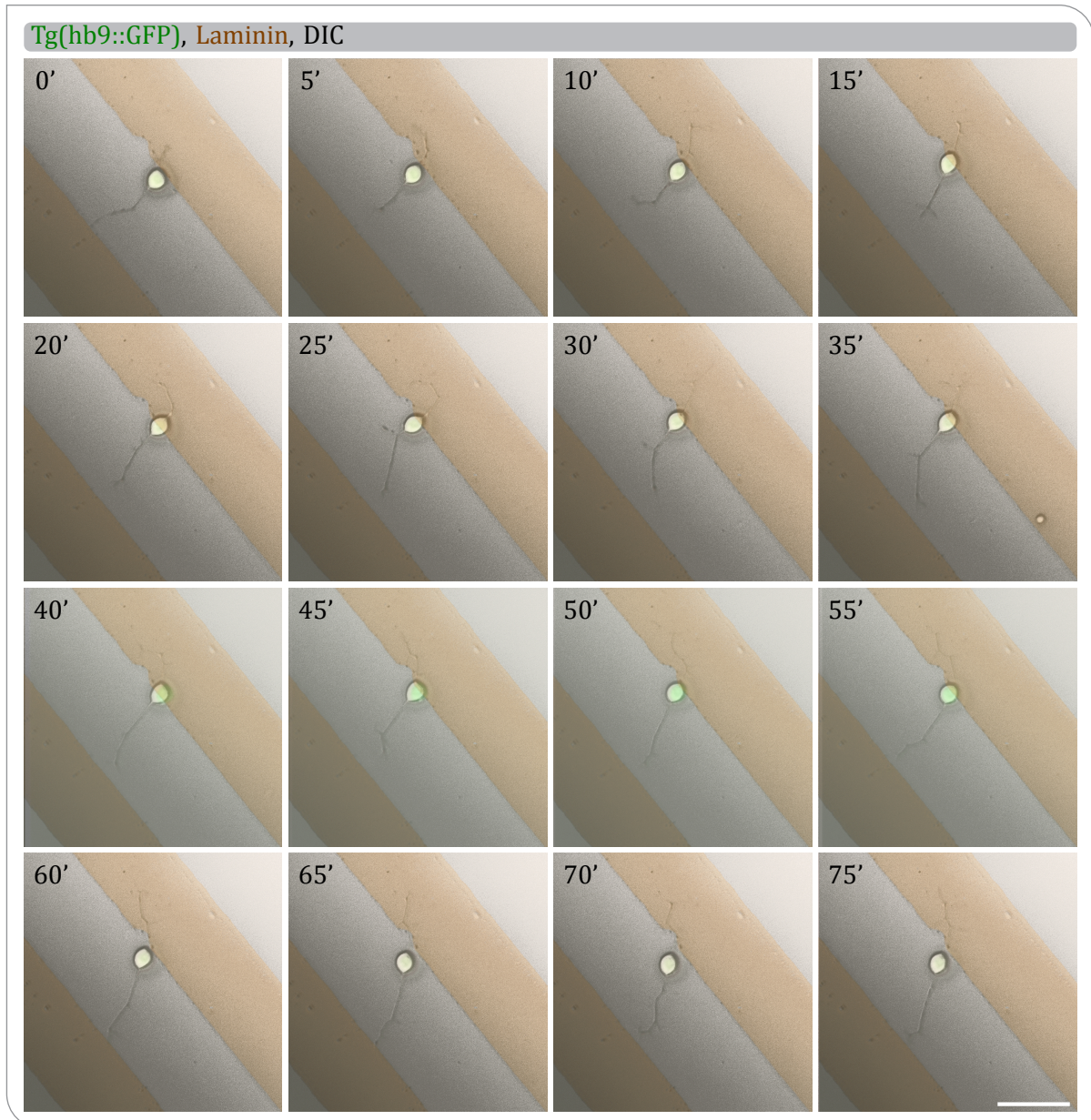


Abbildung 46: Zeitrafferaufnahme eines Kontroll-Motoneurons auf alternierenden Laminin und Ncam1b-Fc Streifen. Die Motoneurone wurden in Intervallen á fünf Minuten über einen Zeitraum von 75 Minuten dokumentiert ( $n = 7$ ). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht  $40 \mu\text{m}$ . Nachdem das GFP exprimierende Motoneuron auf Laminin adhärert hat, projiziert je eines der Neuriten auf Laminin und auf Ncam1b-Fc. Der Zellkörper bleibt dabei an gleicher Position ( $n = 5$  von 7 beobachteter Zellen).

#### 4.5.3 Der Knockdown von *ncam1a* verhindert die Bildung axonaler Projektionen von Motoneuronen in der Zellkultur

Ncam1a-defiziente und isolierte Neurone in einem definierten System zu analysieren, ermöglicht es die Funktion die Ncam1a auf Motoneuronen und auf den umliegenden Zellen zu untersuchen. Den Knockdown-Zellen kann exogenes Ncam1a als Substrat präsentiert werden. Dies simuliert benachbarte Axone und damit die Wechselwirkungen zwischen diesen.

Isolierte Motoneurone (grün) in der Zellkultur exprimieren Ncam1a (magenta) auf dem Soma und auf den Neuriten (Abb. 47 A). Das entspricht dem Expressionsmuster von Ncam1a in den *Whole Mount* Färbungen (vgl. Abschnitt 4.1.3 Abb. 11).

Diese Expression lässt sich durch Morpholino-Injektion unterbinden. Der Verlust von Ncam1a auf den Motorneuronen beeinträchtigt die Ausbildung axonaler Projektionen (Abb. 47 B).

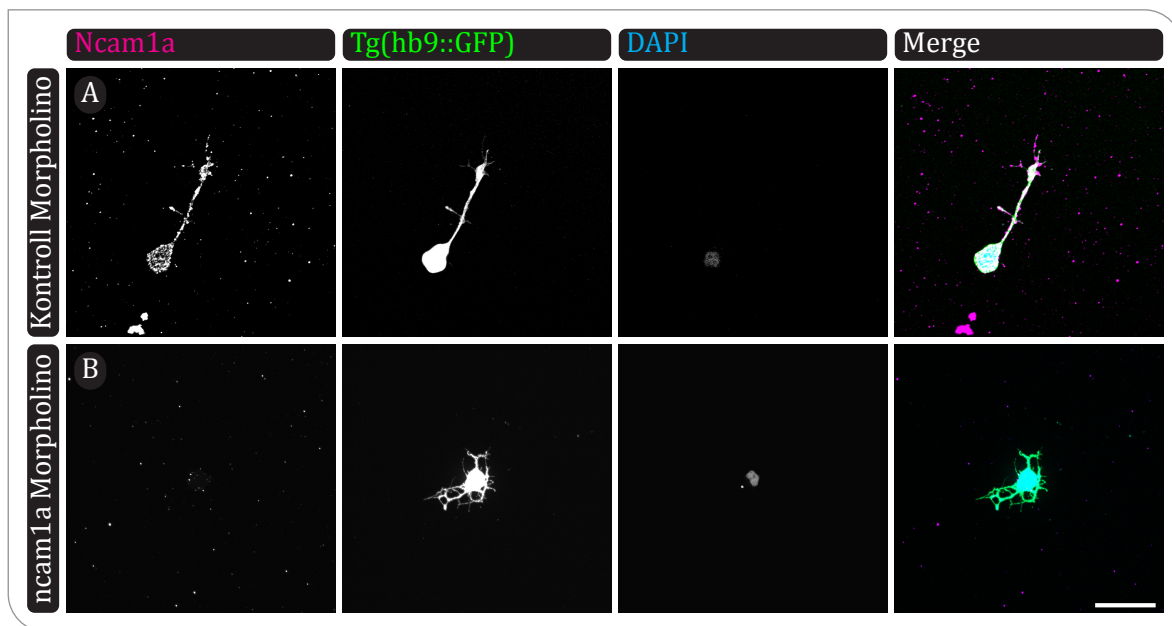


Abbildung 47: Ncam1a wird auf Motoneuronen in der Zellkultur exprimiert. (A & B) Konfokale Aufnahme von Motoneuronen nach Kontrollbehandlung und *ncam1a*-Morpholino-Injektion. (A) Ncam1a (magenta) wird auf Motoneuronen Primärzellkulturen (grün) exprimiert. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau). (B) Nach *ncam1a*-Knockdown wird die Ncam1a Expression auf Motoneuronen reduziert. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Welche Rolle Ncam1a auf Motoneuronen in Bezug auf die Ausbildung derer Axone hat, wird durch Morpholino-Knockdowns gezeigt.

Die Motoraxone der Kontrollen auf Laminin entsprechen mit  $50 \% \pm 10$  dem Outgrowth-Phänotypen und  $32 \% \pm 6$  der Motoneurone bilden keine Axone aus (C-MO Laminin;  $N = 9$ ,  $n = 2463$ ). Wird die Expression von Ncam1a durch Morpholino-Injektion gestört (A-MO Laminin) unterscheidet sich die Verteilung der phänotypischen Kategorien signifikant zu der Situation in der Kontrolle (A-MO auf Laminin  $N = 9$ ,  $n = 2540$ ,  $\chi^2$ :  $p < 0,005$ ). Es bilden jetzt  $52 \% \pm 11$  der Ncam1a-defizienten Motoneurone keine Axone mehr auf Laminin aus (Abb. 48). Dieser Phänotyp nimmt im Vergleich zur Kontrolle auf Laminin signifikant zu (Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ).

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Knockdown von *ncam1a* zur Reduktion neuronaler Projektionen führt, stellte sich die Frage, durch was dieser Effekt begründet ist. Ncam1a kann von den Motoneuronen innerhalb der Zellmembran in *cis* benötigt werden und der Ncam1a-vermittelten Signaltransduktion dienen. Es kann aber auch möglich sein, dass eine *trans*-Interaktion ausreicht, um Neuritenwachstum zu fördern. Um diese Frage zu beantworten kann den *ncam1a*-Morphanten



anstelle von Laminin, Ncam1a als Wachstumssubstrat angeboten werden. Wird das Neuritenwachstum nicht wieder hergestellt, ist eine *trans*-Interaktion nicht ausreichend.

Werden *ncam1a*-Morphanten Ncam1a als Substrat angeboten, kann die Ausbildung von Axonen nicht wieder hergestellt werden und (A-MO Ncam1aFc). Es gibt keinen signifikanten Unterschied verglichen mit *ncam1a*-Morphanten auf Laminin (Abb. 48; A-MO Ncam1aFc: N = 7, n = 1296, A-MO Ncam1aFc vs. A-MO Laminin  $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ).

Ncam1b als Wachstumssubstrat stört die Bildung der Ncam1a-defizienten Motoneurone, sodass  $92 \% \pm 2$  der Motoneurone keine Neuriten mehr ausbilden (Abb. 48 A-MO Ncam1bFc). Verglichen mit der Situation auf Laminin stört Ncam1b als Substrat die Ausbildung von Neuriten signifikant (A-MO auf Ncam1bFc: N = 4, n = 1655, A-MO Ncam1bFc vs. A-MO Laminin  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ). Wird den Motoneuronen humanes Fc angeboten, bilden  $92 \% \pm 6$  der Ncam1a defizienten Motoneurone keine Neuriten mehr aus. Das Auswachsverhalten der Motoneurone ist verglichen mit A-MO auf Laminin signifikant reduziert (A-MO auf humFc: N = 4, n = 450, A-MO humFc vs. A-MO Laminin  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ).

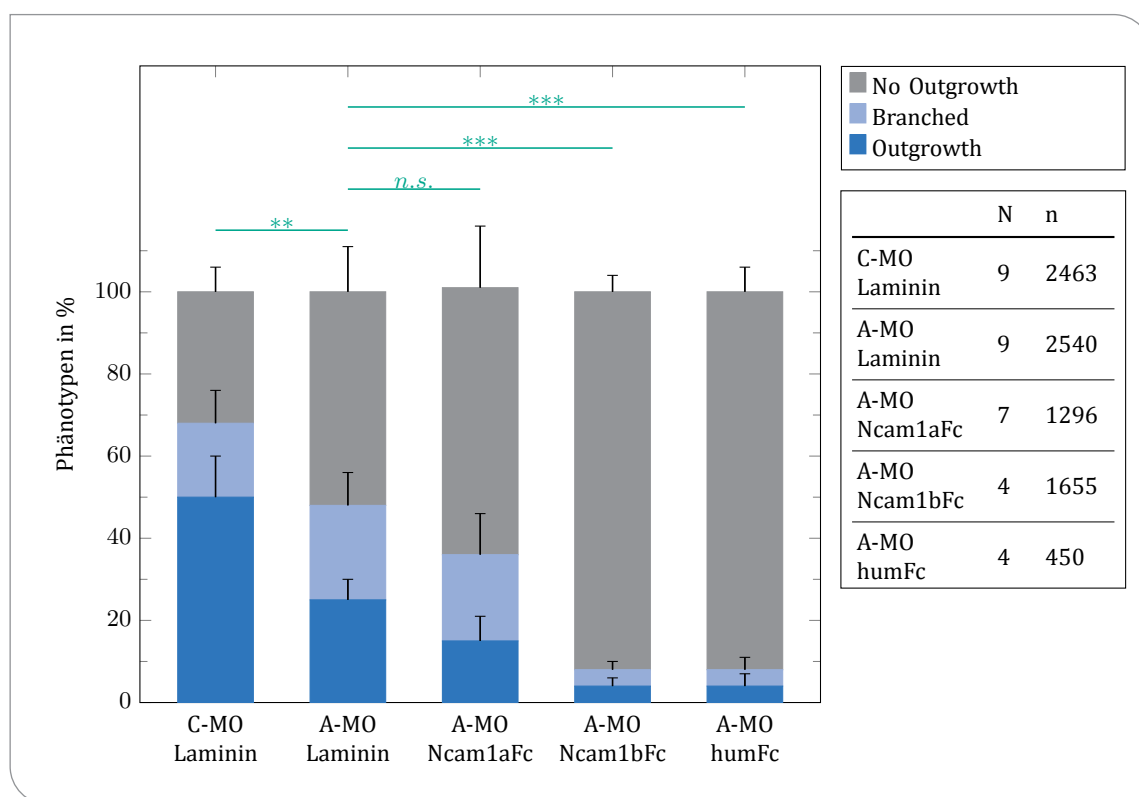


Abbildung 48: Quantifizierung des Projektionsmusters *ncam1a*-defizienter Motoneurone auf unterschiedlichen Substraten. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.),  $p < 0,005$  (\*\*) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*\*). Abkürzungen: C-MO Laminin: Kontroll-Morpholino-Injektion auf Laminin, A-MO Laminin: *ncam1*-Morpholino-Injektion Laminin, A-MO Ncam1aFc: *ncam1*-Morpholino-Injektion auf rekombinantem Ncam1a-Fc Protein, A-MO Ncam1bFc: *ncam1*-Morpholino-Injektion auf rekombinantem Ncam1b-Fc Protein, A-MO humFc: *ncam1*-Morpholino-Injektion auf humanem Fc, n.s.: nicht signifikant, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass etwa 50 % der Kontroll-Morpholino-injizierte Zellpopulationen auf Laminin dem Outgrowth-Phänotypen entsprechen. Ncam1a als Zellsubstrat hat auf Kontroll-Morpholino-injizierte Zellpopulationen keinen Effekt und entspricht der Phänotypenverteilung auf Laminin. Der Verlust von Ncam1a führt zu einer signifikanten Reduktion des Outgrowth-Phänotypen auf etwa 25 % und einem zeitgleichen Anstieg des No Outgrowth-Phänotypen um etwa 20 %. Wird *ncam1a*-Morphanten Ncam1a als Substrat angeboten, hat dies keinen Einfluss auf das Auswachsen der Axone, wohingegen Ncam1b als Substrat den Effekt des Knockdowns verschärft

und etwa 92 % der Motoneurone keine Axone mehr ausbilden.

Ncam1a wird innerhalb der Zellmembran, d.h. in *cis* benötigt, um Neuritenwachstum zu fördern.

#### 4.5.4 Der Knockdown von *ncam1b* führt zum Branching von Motoraxonen in der Zellkultur

Ncam1b wird im *Whole Mount* sowohl auf Motoneuronen als auch auf dem umliegenden Gewebe exprimiert. Analysiert man Motoneuronen Zellkulturen von *ncam1b*-Morphanten in einem definierten System, ermöglicht das die Funktion Ncam1b bei der axonalen Wegfindung zu untersuchen. Exogenes Ncam1b als Wachstums substrat simuliert zum einen die Umgebung, in die die Axone einwandern und zum anderen Ncam1b das von benachbarten Axonen präsentiert wird.

Ncam1b (magenta) wird von Motoneuronen (grün) auf dem Soma (Zellkernfärbung, blau) und auf den Neuriten exprimiert (Abb. 49 A). Die Immunfärbung mit einem Ncam1b-spezifischen Antikörper entspricht der Situation in den *Whole Mount* Färbungen (vgl. Abschnitt 4.1.4 Abb. 13). Ein Ncam1b spezifischer Knockdown verhindert die Expression von Ncam1b (Abb. 49 B).

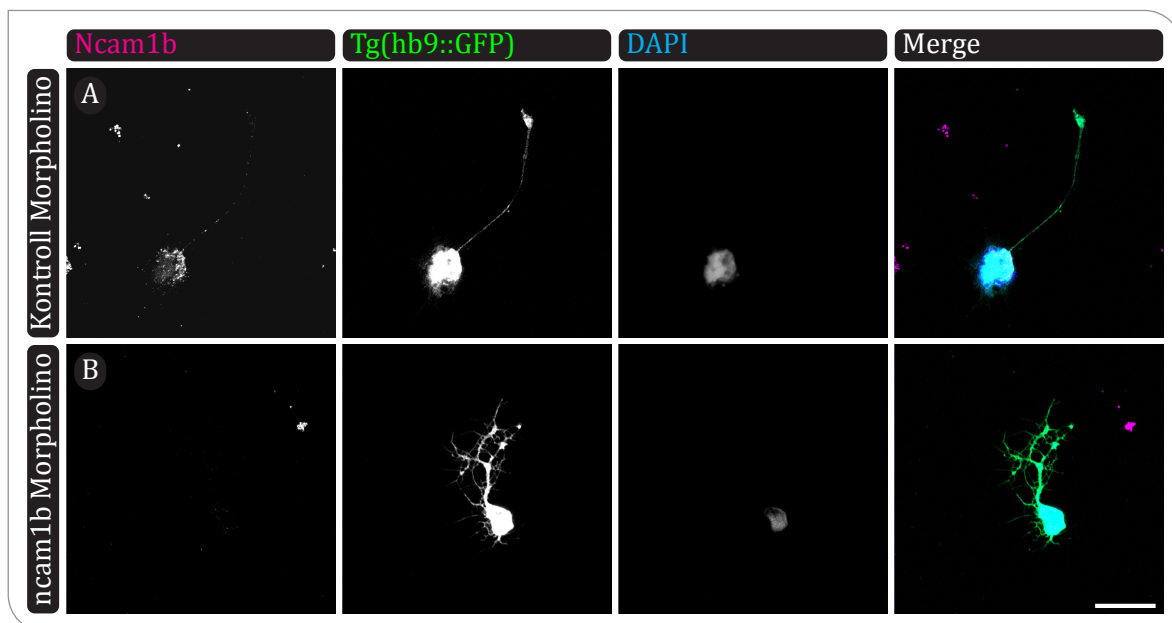


Abbildung 49: Ncam1b wird auf Motoneuronen in der Zellkultur exprimiert. (A) Ncam1b (magenta) wird auf Motoneuronen Primärzellkulturen (grün) exprimiert. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau). (B) Bei der Injektion eines *ncam1b*-spezifischen Morpholinos wird die Ncam1b Expression auf Motoneuronen reduziert. Diese projizieren ihr Axon daraufhin stark verändert in die Peripherie. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Welchen Einfluss Ncam1b in auswachsenden Motoneuronen hat, zeigen die Auswertungen funktioneller Studien (Abb. 50). Werden Kontroll-Morphanten auf Laminin ausgesät, entsprechen 50 %  $\pm$  10 der Axone dem Outgrowth-Phänotypen und nur 18 %  $\pm$  8 dem Branched-Phänotypen (C-MO Laminin; N = 9, n = 2463). Der Knockdown von *ncam1b* beeinflusst das Projektionsmuster der auswachsenden Motoraxone hoch signifikant (B-MO Laminin: N = 11, n = 1576, C-MO Laminin vs. B-MO Laminin  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ). Auf Laminin verringert sich der Outgrowth-Phänotyp in Ncam1b-Morphanten auf 22 %  $\pm$  5, wohingegen der Branched-Phänotyp mit 39 %  $\pm$  9 den Hauptphänotypen repräsentiert. Dies entspricht einem deutlichen Anstieg des Branched-Phänotypen im Vergleich mit der Kontrolle auf Laminin (Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ) und sogar mit dem Ncam1a Knockdown auf Laminin (Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ).

Der Verlust von Ncam1a hat die Reduktion neuronaler Projektionen zur Folge, wohingegen der Knockdown von *ncam1b* zu starken Defekten neuronaler Projektionen, ausgeprägtem Axonbranching und vermutlich auch den Verlust der Selbsterkennung (*self-avoidance*) führt.

Auch hier stellt sich die Frage, ob Ncam1b von den Motoneuronen dafür auch innerhalb der Zellmembran in *cis* benötigt wird oder ob eine *trans*-Interaktion ausreicht. Um das zu ermitteln wurden *ncam1b*-Morphanten auf Ncam1b als Substrat ausgesät.

Wird für Ncam1b-defiziente Motoneurone Ncam1b als homogenes Wachstumssubstrat verwendet, beeinflusst das die Verteilung der phänotypischen Kategorien (Abb. 50; B-MO auf Ncam1bFc: N = 6, n = 831). Ein Vergleich mit Kontrollen auf Laminin macht deutlich, dass morphologische Veränderungen, die durch den *ncam1b*-Knockdown hervorgerufen werden, durch exogenes Ncam1b gerettet werden können (B-MO Ncam1bFc vs. C-MO Ncam1bFc  $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ).

Ncam1a als Wachstumssubstrat verschlimmert das Wachstum Ncam1b-defizienter Motoneurone (B-MO Ncam1aFc: N = 3, n = 611, B-MO Laminin vs. B-MO Ncam1aFc  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ). Auch auf humanem Fc wachsen die Ncam1b-Morphanten schlecht aus (B-MO humFc: N = 4, n = 394, B-MO Laminin vs. B-MO humFc:  $\chi^2$ :  $p < 0,001$ ).

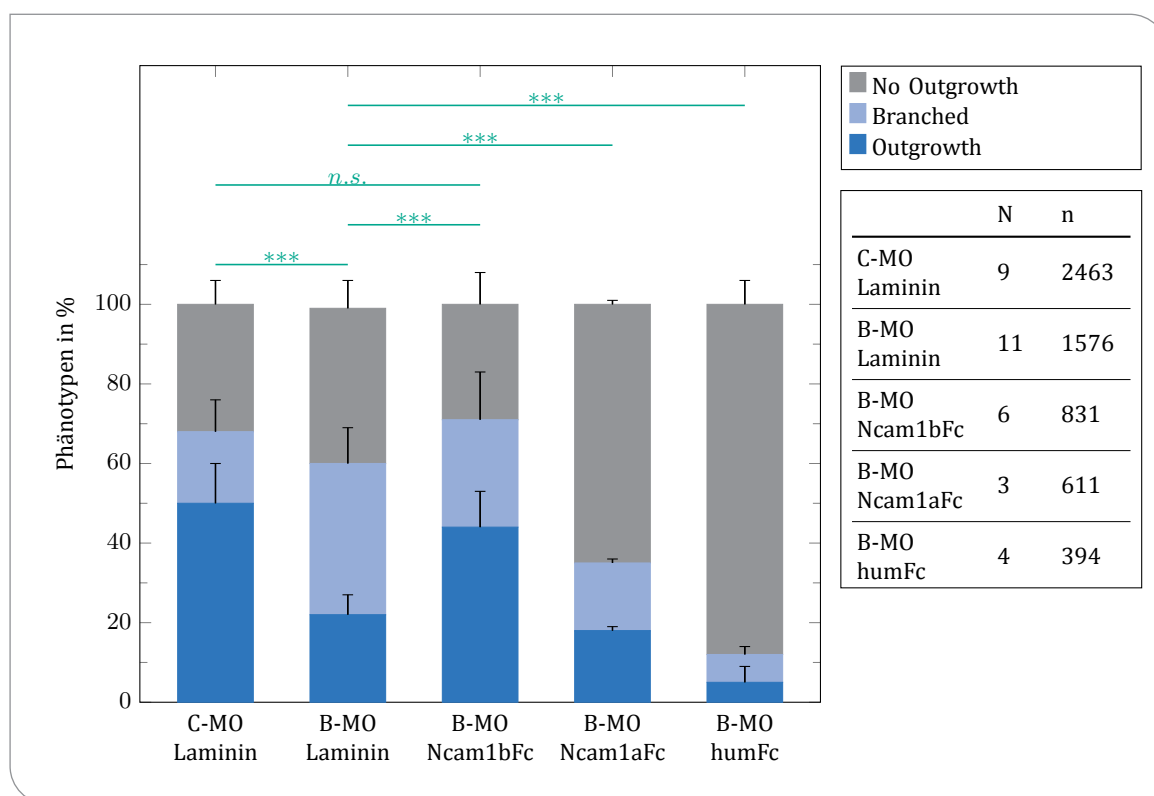


Abbildung 50: Quantifizierung des Projektionsmusters *ncam1b*-defizienter Motoneurone auf unterschiedlichen Substraten. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung der Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*\*). Abkürzungen: C-MO Laminin: Kontroll-Morpholino-Injektion auf Laminin, C-MO Ncam1bFc: Kontroll-Morpholino-Injektion auf rekombinantem Ncam1b-Fc Protein, C-MO Ncam1aFc: Kontroll-Morpholino-Injektion auf rekombinantem Ncam1a-Fc Protein, C-MO humFc: Kontroll-Morpholino-Injektion auf humanem Fc, n.s.: nicht signifikant, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Zellen.

Das stark ausgeprägte Axonbranching nach Knockdown von *ncam1b* lässt sich auch in Zeitrafferaufnahmen darstellen. Die Momentaufnahmen zeigen eine Zelle nach einem *ncam1b* Knockdown auf Laminin. Diese hat einen Defekt in der Axonstabilisierung, der Zellkörper wandert auf dem eigenen kurzen Axon auf und ab. Die gebildeten Axone zeigen auffälliges und unkontrolliertes Branching. (Abb. 51, Videodatei M2 auf angehängter CD ; n = 4 von 10).

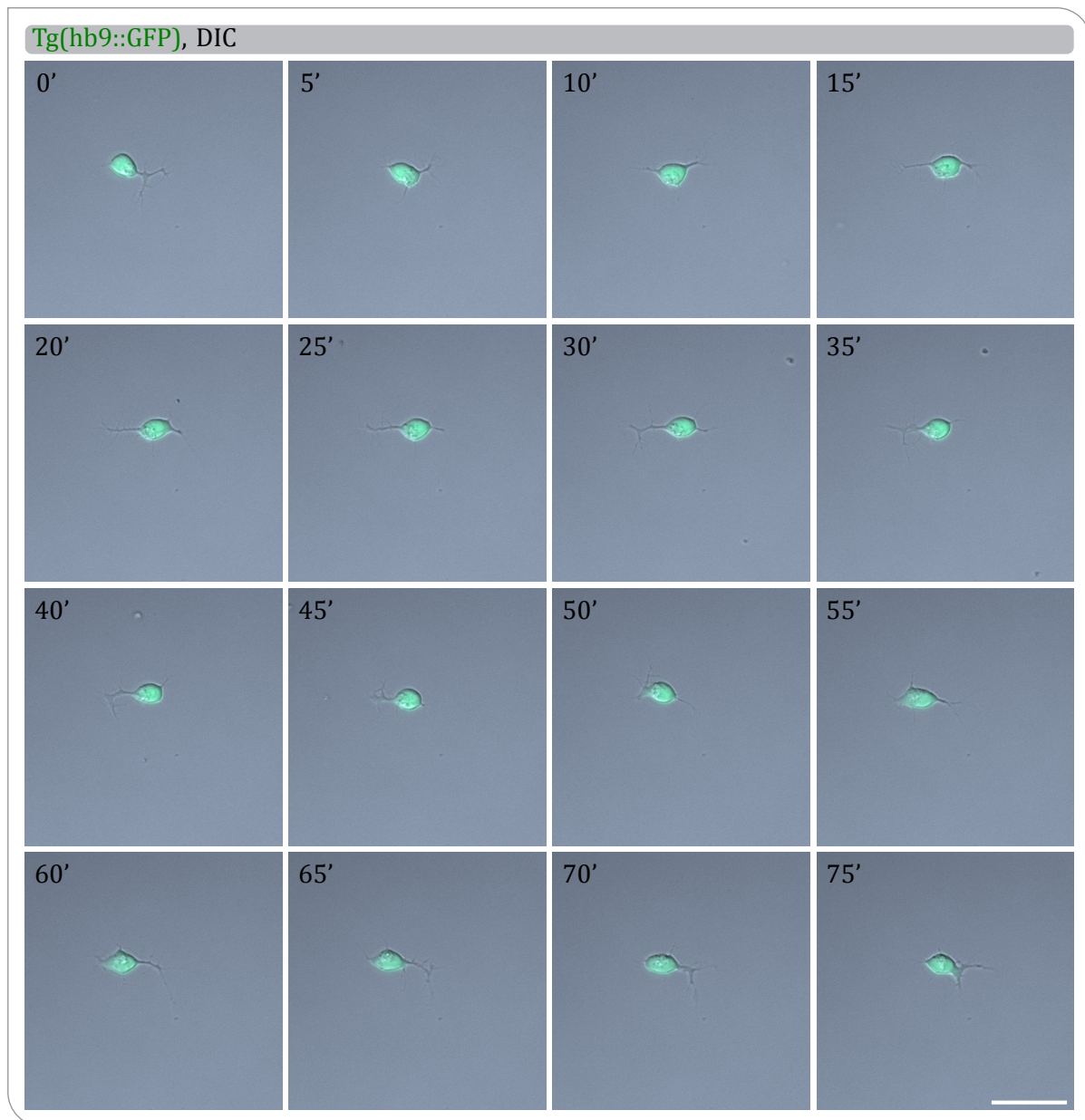


Abbildung 51: Zeitrafferaufnahme eines *ncam1b*-defizienten Motoneurons auf Laminin über einen Zeitraum von 75 Minuten. Die Motoneurone wurden im fünf Minuten Abstand dokumentiert ( $n = 10$ ). Das GFP exprimierende Motoneuron projiziert stark verzweigte Neuriten in die Peripherie. Der Zellkörper wird entlang des gerade ausgebildeten Axons bewegt, woraufhin dieses kollabiert ( $n = 4$  von 10 beobachteten Zellen). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht  $20\ \mu\text{m}$ .

In Streifenassays werden Ncam1b-funktionalisierte Streifen von Ncam1b defizienten Motoneuronen gegenüber Laminin bevorzugt (Graph nicht gezeigt).  $69\% \pm 11$  der Ncam1b defizienten Motoneurone halten sich zum Zeitpunkt der Fixierung auf Ncam1bFc auf. Im Vergleich dazu befinden sich  $31\% \pm 11$  der Motoneuronen auf Laminin. Dies entspricht einer hochsignifikanten Präferenz der Ncam1b defizienten Motoneuronen von Ncam1bFc ( $N = 3$ ,  $n = 299$ , Zweistichproben-t-Test:  $p < 0,001$ ). Ncam1b-defiziente Motoneurone migrieren aktiv auf Streifen die mit Ncam1b beschichtet sind und werden gegenüber Laminin bevorzugt.

In Zeitrafferaufnahmen lässt sich das Migrieren Ncam1b-defizienter Motoneurone ausgesät auf Laminin/Ncam1b-Streifen nachvollziehen. Zu Beginn der Aufnahme befindet sich das Motoneuron auf einem Laminin-Streifen (Abb. 52). Dort teilt es sich und wandert innerhalb von 95 Minuten auf einen Ncam1b-Streifen ( $n = 10$  von 12 beobachteten Zellen).



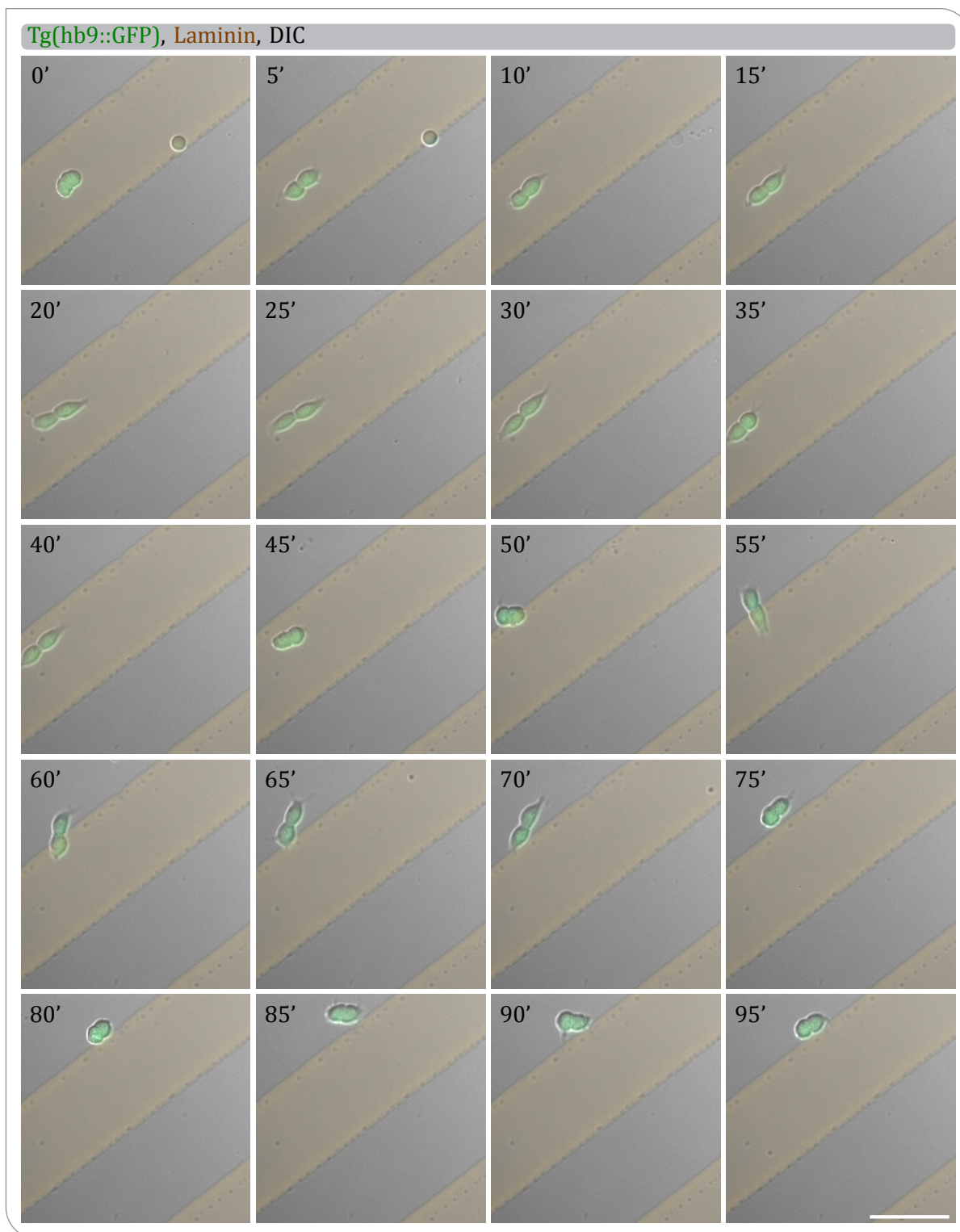


Abbildung 52: Migration eines *ncam1b*-defizienten Motoneurons von Laminin auf einen Ncam1b-Streifen in einer Zeitrafferaufnahme. Nachdem das Motoneuron auf Laminin adhärirt hat teilt es sich zunächst. Anschließend wandert sie innerhalb von 95 Minuten auf den darüberliegenden Ncam1b-Streifen (n = 10 von 12 beobachteten Zellen). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 40  $\mu$ m.

Auf dem Ncam1b-Streifen hält sich das Motoneuron für 75 Minuten auf und erkundet mit seinem Axon den Ncam1b-Streifen (nicht gezeigt). Von dieser Position (170 Minuten) aus startet die zweite Zeitrafferaufnahme (Abb. 53). Das Motoneuron projiziert ein Axon über den Laminin-Streifen hinweg. Solange sich der Wachstumskegel auf Laminin aufhält, verbleibt der Zellkörper auf dem

Ncam1b-Streifen. Sobald das Axon einen anderen Ncam1b-Streifen erreicht, wird der Zellkörper dorthin transloziert (n = 5 von 12 beobachteten Zellen).

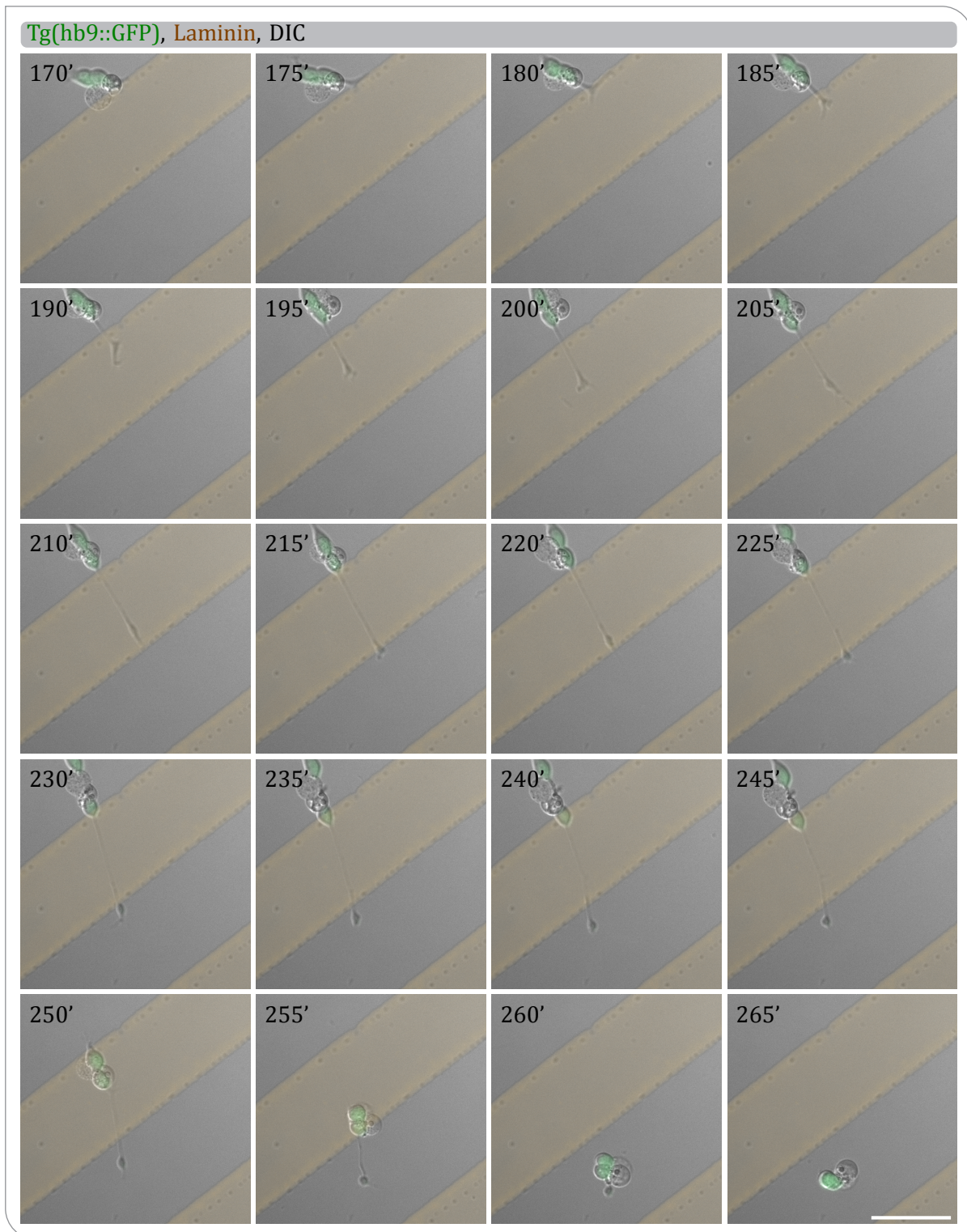


Abbildung 53: Migration eines *ncam1b*-defizienten Motoneurons das Ncam1b-Streifen bevorzugt in Zeitrafferaufnahmen. Der Zellkörper befindet sich auf dem Ncam1b-Streifen, dort hält es sich für 75 Minuten auf. Mit diesem Zeitpunkt (170 Minuten; Zeitpunkt 0 Minuten vgl. Abb. 52) startet die Zeitrafferaufnahme. Das Motoneuron sendet ein Axon in die Peripherie. Nachdem das Axon den Laminin-Streifen überwachsen hat trifft der Wachstumskegel auf einen weiteren Ncam1b-Streifen. Das führt dazu, dass der Zellkörper nachgezogen wird und die Zelle nun auf dem zweiten Ncam1b-Streifen adhärirt (n = 5 von 12 beobachteten Zellen). Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 40  $\mu\text{m}$ .



Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse für Ncam1b herausstellen. Ncam1b als Zellsubstrat hat in Kontroll-Morpholino-injizierten Zellpopulationen keinen Effekt auf das Projektionsmuster der Motoraxone. Wie in der Kontrolle repräsentieren etwa 50 % der Zellen den Outgrowth-Phänotypen. Auf strukturierten Substraten alternierender Laminin und Ncam1b Streifen zeigen die Kontroll-Neurone keine Präferenz für die Substrate. Der Verlust von Ncam1b führt zu ausgeprägtem Axonbranching und womöglich zu einer Verminderung der *self-avoidance*. Wird *ncam1b*-Morphanten Ncam1b als Substrat angeboten, was eine *trans*-Interaktion simuliert, kann der Effekt des *ncam1b*-Knockdowns kompensiert werden. Haben die Ncam1b-defizienten Zellen die Wahl zwischen Laminin und Ncam1b durch alternierende Streifen, bevorzugen die Morphanten Ncam1b als Substrat. Wird den Ncam1b-defizienten Zellen Ncam1a als Substrat angeboten, führt dies zu einer Verschlimmerung und weniger Neurone projizieren Axone.

Ncam1b erfüllt sowohl innerhalb der Zellmembran, d.h. in *cis*, als auch außerhalb in *trans* seine Funktion im Neuritenwachstum.

#### 4.5.5 Der Einfluss von Polysialinsäure wird von Motoneuronen beim Ausbilden von Axonen benötigt

Nachdem sich gezeigt hat, wie Ncam1a und Ncam1b das Auswachsen von Axonen aus isolierten Motorneuronen beeinflussen, wurde untersucht, wie sich die Ncam1-spezifische Zuckermodifikation Polysialinsäure (polySia) darauf auswirkt.

polySia lässt sich auch auf den Zellkörpern und auswachsenden Axonen von Motoneuronen in der Zellkultur nachweisen und die Synthese der polySia wird mit einem Knockdown der Polysialyltransferase St8SiaII verhindert. Der Knockdown hat keine hundertprozentige Effektivität: Nicht alle Motoneurone tragen nach *st8siaII*-Knockdown keine Polysialinsäure mehr. Es handelt sich um gemischte Populationen unterschiedlicher Effizienzzraten. Abbildung 54 zeigt zwei Motoneurone. Die Immunfärbung gemischter Populationen eines St8SiaII-Knockdowns mit einem polySia-spezifischen Antikörper markiert polySia (magenta) auf Soma und Neuriten eines der Motoneurone (grün mit magenta). Wird ihre Synthese durch Morpholino-Knockdown der St8SiaII unterdrückt, wird kein polySia mehr synthetisiert und verhindert so die Polysialylierung des anderen Motoneurons (grün ohne magenta). Die Zellkerne sind über eine DAPI-Färbung in blau dargestellt. Beide Beobachtungen stimmen mit der *Whole Mount* Situation überein (vgl. Abschnitt 4.1.5, Abb. 15).



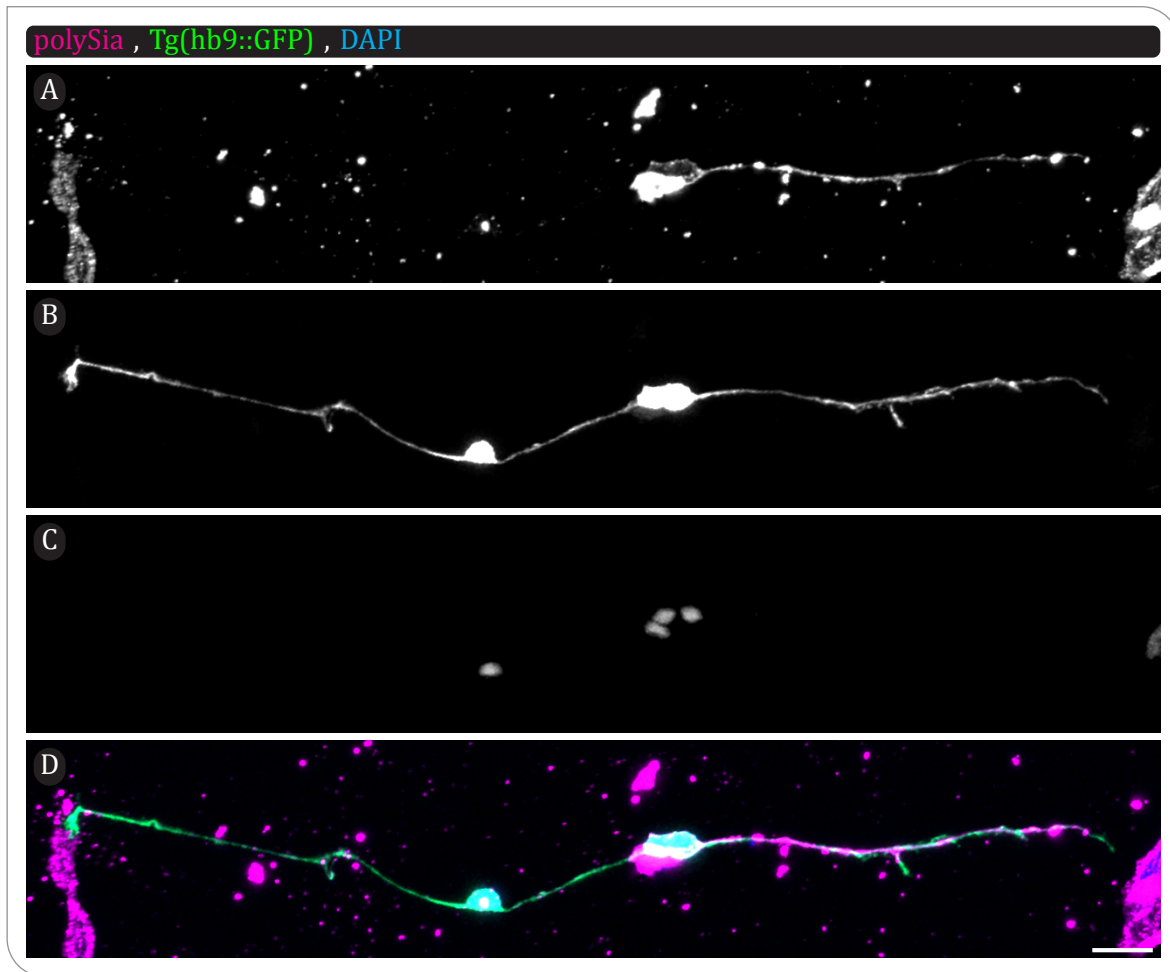


Abbildung 54: polySia wird auf Motoneuronen in der Zellkultur exprimiert. Gezeigt ist eine Immunfärbung mit einem polySia spezifischen Antikörper (magenta) zweier Motoneurone eines *st8siaII*-Knockdowns. Nicht jeder Morpholino-Knockdown ist zu 100% effizient. Es kommt zu Mischkulturen. polySia (magenta, A) wird auf einem der beiden Motoneuronen (grün, B) exprimiert. Der Zellkern wurde mit DAPI gefärbt (blau, C). (D) Der Merge zeigt deutlich, dass polySia nur noch auf dem rechten Motoneuron exprimiert wird. Der Maßstabsbalken gilt für alle Abbildungen und entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Verhindert man die Synthese von polySia, beeinflusst dies das Auswachsverhalten der Motoraxone nicht signifikant (Abb. 55; *st8siaII*-MO Laminin:  $N = 4$ ,  $n = 569$ , C-MO Laminin vs. *st8siaII*-MO Laminin  $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ). Es lässt sich allerdings eine leichte Tendenz hin zu einem verminderten Auswachsen feststellen. Nur noch  $34 \% \pm 9$  der Neuriten werden nach dem Outgrowth-Phänotypen gebildet, was einer Reduktion von 11 % entspricht. Diese Beobachtung ist allerdings nicht signifikant. Vergleicht man jedoch polySia-defiziente Zellkulturen mit *Ncam1a*-Morphanten Zellkulturen auf Laminin, unterscheiden sich auch diese nicht signifikant voneinander ( $\chi^2$ :  $p \geq 0,01$ ). In dieser Hinsicht gleichen sich der Verlust von *Ncam1a* und polySia. Neben einem tendenziellen Einfluss von polySia auf die Motoneuronenzellkultur, sind außerdem vermutlich beide Moleküle funktional miteinander assoziiert.

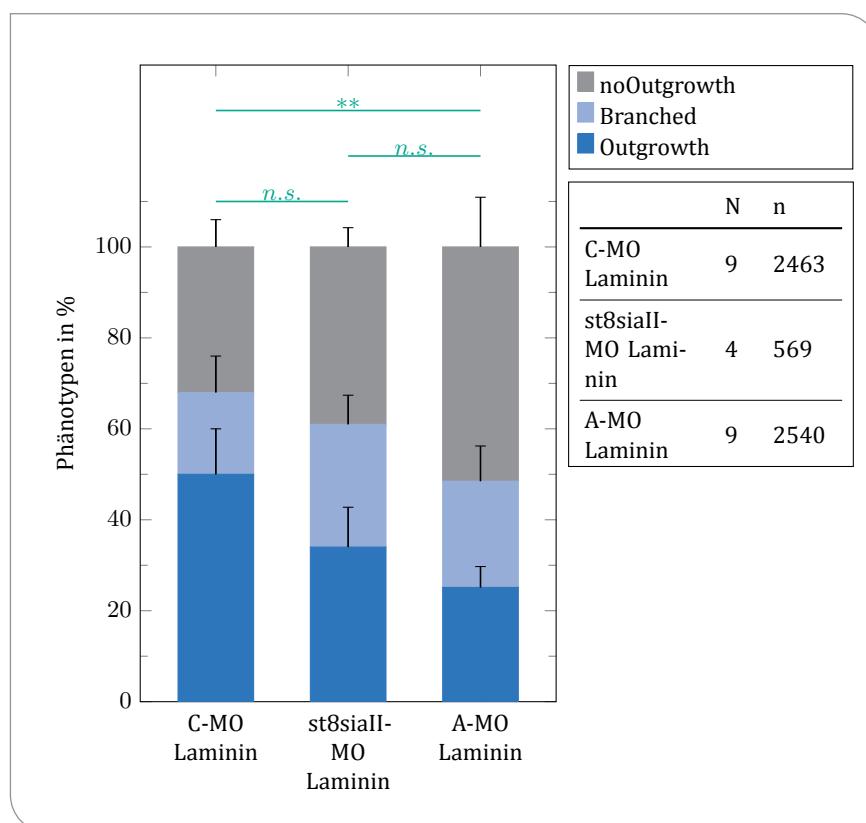


Abbildung 55: Quantifizierung des Projektionsmusters polySia-defizienter Motoneurone auf Laminin. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Verteilung auftretender Phänotypen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $\chi^2$ -Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \geq 0,01$  (n.s.) bzw.  $p < 0,005$  (\*\*). Abkürzungen: C-MO Laminin: Kontroll-Morpholino-Injektion auf Laminin, st8siaII-MO Laminin: *st8siaII*-Morpholino-Injektion auf Laminin, A-MO Laminin: *ncam1a*-Morpholino-Injektion auf Laminin, n.s.: nicht signifikant, N: Anzahl unabhängiger Replikate, n: Anzahl ausgewerteter Zellen.

Mit dieser Studie konnte erstmals anhand von Motoneuronen in Zellkulturen und im *Whole Mount Embryo* gezeigt werden, dass sich die Zebrafisch-Paralogue *Ncam1a* und *Ncam1b* funktionell unterscheiden.

*Ncam1a* steuert das initiale Aussenden von Neuriten und wird benötigt um Motoneuronenbündel zu faszikulieren. Hierin ähnelt sich auch die Funktion der Glykanmodifikation polySia. Diese kann nicht nur an *Ncam1a* gebunden werden sondern verhindert zudem die homophile *Ncam1a*-Interaktion. *Ncam1b* unterstützt die neuronale Wegfindung auch in Bezug auf Selbsterkennung der Axone. *Ncam1b* kann polysialyliert werden, dennoch geht *Ncam1b* homophile Wechselwirkungen ein.

---

## 5 Diskussion

Neuronale Zellerkennungsmoleküle wie NCAM1 steuern in der Entwicklung des Nervensystems adhäsive Vorgänge und stoßen intrazelluläre Signalkaskaden an. Sie regulieren dabei zahlreiche Prozesse wie Axogenese, Wegfindung und Faszikulation von Axonbündeln. Die Wachstumskegel auswachsender Axone müssen auf dem Weg zu ihrer Zielregion mit unterschiedlichen Zellen über Liganden und Rezeptorkomplexe interagieren, woran verschiedenste Moleküle und fein abgestimmte Mechanismen beteiligt sind (Übersichtsartikel: Dickson, 2002; Bashaw & Klein, 2010).

Durch die Teleostei-spezifische Genomduplikation wird NCAM1 im Zebrafisch durch die beiden Paraloge Ncam1a und Ncam1b repräsentiert (Mizuno et al., 2001). Auf Grundlage von Sequenz- und Expressionsanalyse sowie Funktionsstudien wurde in einer vorausgegangenen Arbeit von einer Subfunktionalisierung der Ncam1-Paraloge ausgegangen (Langhauser et al., 2012). Die molekularen Grundlagen der Subfunktionalisierung sollten in der vorliegenden Arbeit an spinalen Motoneuronen untersucht werden.

### 5.1 Ncam1a und Ncam1b sind an unterschiedlichen Aspekten der axonalen Projektion von Motoneuronen beteiligt

Motoneurone des Zebrafischs sind ein hervorragendes System, um Axogenese, Wegfindung und Faszikulation zu untersuchen. Die verhältnismäßig wenigen Neurone sind sehr leicht zugänglich und projizieren in eine segmental aufgebaute Muskulatur. Zudem sind die stereotypen Wege der Axone sehr gut dokumentiert (Übersichtsartikel: Beattie, 2000). Desweiteren ist es möglich, Motoneurone durch ihr großes Wachstumspotential auf Einzelzellebene in der Primärzellkultur zu untersuchen (Z. Chen et al., 2013).

Die Funktionen von Ncam1a/Ncam1b und polySia auf den Motoneuronen wurden unter der Verwendung von Morpholino-Knockdowns im *Whole Mount Embryo (in situ)* genauer untersucht und charakterisiert. Die beobachteten Auswachsmuster können in die vier Kategorien (A) Unverändert, (B) Defaszikuliert, (C) Aberrante Seitenäste und (D) Aberrante Ventralprojektion eingeteilt werden. Die Phänotypen gehen graduell ineinander über (vgl. Abb. 9). Axonbündel der Kontrolle entsprechen vornehmlich dem unveränderten Phänotyp. Diese verlaufen in einer leichten Bogenform nach caudal. Sowohl der Knockdown von Ncam1a als auch der der Sialyltransferase St8SialII führen zu einem Anstieg defaszikulierter Motoraxonbündel, die Axone projizieren dennoch in ihre Zielregionen (vgl. Abb. 12 bzw. 14). Der Effekt, der durch einen Knockdown von Ncam1b hervorgerufen wird, ist mit Bezug auf die Wegfindung drastischer. Die Motoraxone verzweigen stark und bilden aberrante Seitenäste oder erreichen ihre Zielregion nicht (vgl. Abschnitt 4.1.4).

Diese Ergebnisse untermauern die Schlussfolgerungen der Arbeiten von Langhauser (2012) und Walter (2014; von mir betreute Masterarbeit) mit einer detaillierteren Beschreibung der Effekte und ihrer Quantifizierung. Langhauser (2012) hat beobachtet, dass der Effekt eines *ncam1b*-Knockdowns deutlich stärker ausfällt als der eines *ncam1a*-Knockdowns. Eine differenzierte morphologische Kategorisierung wurde in dieser Studie jedoch nicht durchgeführt. Walter (2014) beschreibt eine 'reduzierte Zellzahl' als Konsequenz des *ncam1b*-Knockdowns. Auch wenn beide Studien nicht detailliert auf die Phänotypen eingehen, lässt sich eine Übereinstimmung im Hinblick auf die Effekte des *ncam1b*-Knockdowns feststellen. Langhauser (2012) spricht Ncam1a, aufgrund der nicht so offensichtlichen Effekte des Knockdowns nur eine unbedeutende Rolle beim Auswachsen der Motoneurone zu. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass Ncam1a für die Faszikulierung der Axone notwendig ist. Im Hinblick auf die Situation im adulten Fisch kann davon ausgegangen werden, dass die Ncam1b-vermittelte Zielfindung der Axone der primär wichtigere Effekt ist. Eine finale Bedeutung im adulten Organismus der Ncam1a-vermittelten Faszikulierung dagegen abzuwägen, ist mit Hilfe der bisherigen Daten nicht möglich.

Beobachtungen, dass der Verlust von polySia durch einen *st8sialII*-Knockdown zur Defaszikulation

und zur Faszikulation von Axonen führen kann, werden kontrovers diskutiert.

Marx et al. (2001) zufolge verursacht der *st8sialII*-Knockdown, dass die posteriore Kommissur defaszikuliert. Marx (2002) beschreibt zusätzlich, dass auch retinale Axone durch den Verlust von polySia defaszikulieren. Dies entspricht den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen (vgl. Abb. 16).

Allerdings wird polySia in den meisten Fällen als Zuckermodifikation beschrieben, die NCAM1-vermittelte Adhäsion verhindert und damit zu einer erhöhten Zell-Zell-Adhäsion führt (Übersichtsartikel Hildebrandt & Dityatev, 2015). Wenn Motoraxone des Huhns das Neuralrohr verlassen, faszikulieren sie. Dies geht einher mit einer kurzfristigen Reduktion von polySia. Gelangen sie aber an ihre Zielregion, defaszikulieren sie durch einen Anstieg der polySia-Expression und innervieren die Muskulatur (Landmesser et al., 1990). Wird polySia zum Zeitpunkt der Innervierung der Muskeln entfernt, sind die Axonbündel nicht mehr in der Lage zu defaszikulieren und die Wachstumskegel können die Verknüpfungen mit der Muskulatur nicht mehr herstellen (Tang et al., 1994).

Marx et al. (2001) gehen sehr detailliert auf die beschriebene Kontroverse ein. Es wird zu dem Schluss gekommen, dass der Verlust von polySia zu zwei unterschiedlichen Effekten - Faszikulation und Defaszikulation von Axonen - führen kann. Diese ist abhängig von der Menge an polySia auf den Axonen zu der Adhäsivität der Umgebung. Ist die Umgebung stark adhäsiv und die der Axone relativ gesehen schwächer, führt der Verlust von polySia dazu, dass die Axone eher defaszikuliert auswachsen, da sie dann mehr mit ihrer Umgebung in Kontakt treten können. Umgekehrt ist die Situation für eine schwach adhäsive Umgebung, wenn die Adhäsivität der Axonbündel stärker ist. Hier kommt es nach Entfernen der polySia zu einer erhöhten Faszikulation (Marx et al., 2001).

Auch beschreibt Marx (2002), dass der *st8sialII*-Knockdown nicht zu einer Defaszikulation der Motoraxone führt.

In dieser Arbeit wurde jedoch nicht mit einer transgenen Linie, sondern mit Immunfärbung von Tag-1 gearbeitet (Marx, 2002). Tag-1 wird auf Axonen und Schwannschen Zellen exprimiert (Karagogeos et al., 1991; Traka et al., 2002). Axone sensorischer und motorischer Neurone sowie Schwannsche Zellen werden gleichermaßen mit einer Immunfärbung detektiert. Dies könnte zu einem verbreiterten Erscheinungsbild der spinalen Motoraxone führen, welches mildere Effekte nicht eindeutig erkennen lässt. In der vorliegenden Arbeit wurde mit transgenen Embryonen der Linie hb9::GFP gearbeitet. Diese exprimieren GFP unter dem motoneuronen-spezifischen Promotor hb9 (Ferrier et al., 2001; Flanagan-Steet et al., 2005). Verglichen mit der Tag-1-Antikörper-Färbung des Spinalnervs erscheint die GFP Expression auf den Motoraxonen der transgenen Linie deutlich filigraner (vgl. Abb. 17 A).

Es kann durchaus in Erwägung gezogen werden, dass die Effekte die durch einen *st8sialII*-Knockdown entstehen, erst dann zur Geltung kommen, wenn keine umgebenden Zellen durch Antikörperfärbung das Erscheinungsbild verfälschen.

Der hier beschriebene Effekt, dass der Knockdown der Sialyltransferase zur Defaszikulation der Motoraxone führt, ist also nicht ausgeschlossen, sondern kann mit diesen Annahmen eher bekräftigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Ncam1a und Ncam1b unterschiedliche Funktionen mit Hinblick auf die Ausbildung motoneuronaler Trakte haben. Ncam1a ist ein wichtiger Faktor in der Faszikulation. Fehlt Ncam1a auf den Axonen, können diese weniger stark faszikulieren (Abb. 56). Dafür könnte eine homophile Interaktion von Ncam1a verantwortlich sein. Die Faszikulation von Axonbündeln wird durch eine homophile NCAM1-Interaktion vermittelt (Rutishauser et al., 1982; Acheson et al., 1991).

Ncam1b beeinflusst die Wegfindung von Motoraxonen. Fehlt Ncam1b, erreichen die Motoraxone nicht ihre vorbestimmte Region und es kommt zu Störungen in der Wegfindung der Axone. Entweder verlassen einzelne Axone oder kleine Bündel den Haupttrakt oder die Ventralprojektion wird nicht mehr ordnungsgemäß ausgebildet. Welches die Interaktionspartner sind, die für die Ncam1b-vermittelte Wegfindung von Bedeutung sind, ist noch nicht bekannt (Abb. 56).

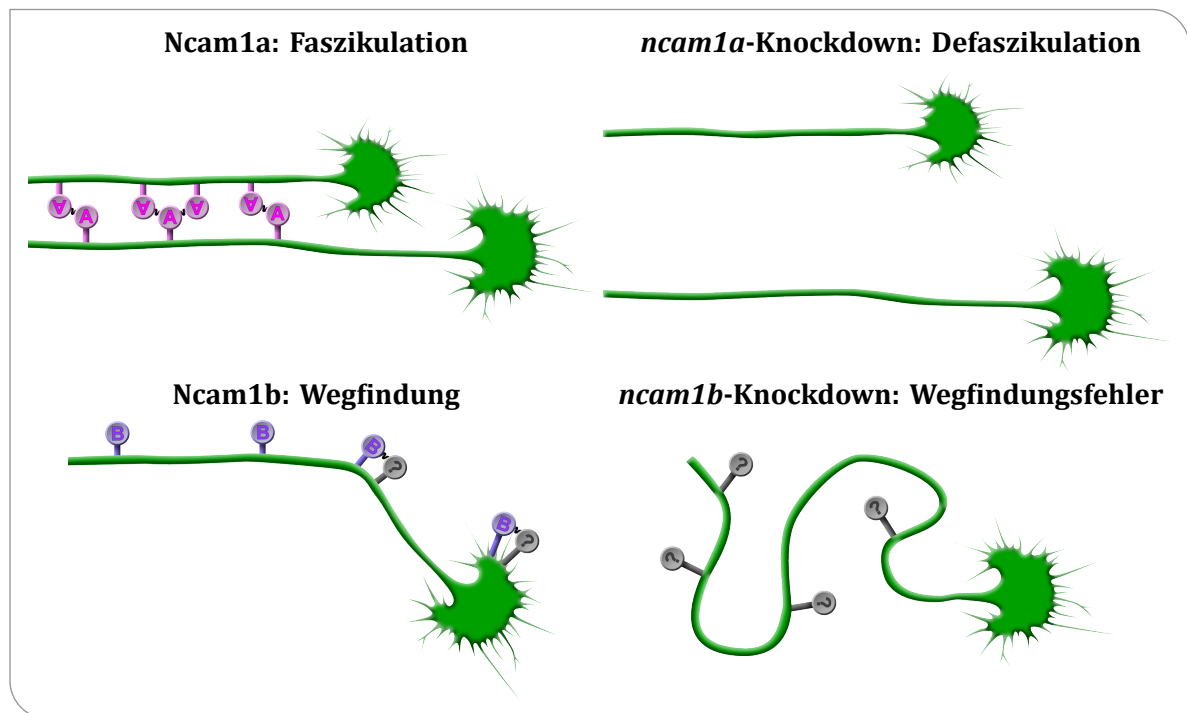


Abbildung 56: Modell zur Funktion von Ncam1a und Ncam1b im *Whole Mount*. Ncam1a ist notwendig um Axone zu faszikulieren. Dafür sind vermutlich homophile Wechselwirkungen von Ncam1a verantwortlich. Ncam1b unterstützt die Wegfindung der Axone. Ein heterophiler Interaktionspartner dafür kann nicht näher beschrieben werden.

Beide Effekte, Faszikulation und Wegfindung, sind für NCAM1-vermittelte Funktionen bereits in höheren Vertebraten beschrieben worden und konnten in dieser Arbeit um die Ncam1-Paraloge des Zebrafischs erweitert werden (Cremer et al., 1997; Rolf et al., 2002; Übersichtsartikel: Walmod et al., 2004).

## 5.2 Unterschiedliche Interaktionen der Ncam1-Paraloge

Die Ausbildung motoneuronaler Netzwerke basiert auf den unterschiedlichen Funktionen von Ncam1a und Ncam1b. Um diese zu verstehen, ist es wichtig, die Interaktionspartner zu kennen. Es wurden die Wechselwirkungen zwischen den Ncam1-Paralogen sowie die Interaktion mit Tag-1 und Neurolin untersucht. Viele dieser Interaktionen werden primär über die Extrazellulärdomäne vermittelt (Kiselyov et al., 2005; Walmod et al., 2004). *Bead-Aggregations-Assays* zeigen homophile und heterophile Wechselwirkungen zwischen Ncam1a und Ncam1b, *Zell-Overlay-Assays* zeigen den Einfluss von Polysia auf diese Interaktionen.

### 5.2.1 Homophile und heterophile Interaktionen zwischen den Ncam1-Paralogen

In *Bead-Aggregations-Assays* wurden die extrazellulären Domänen von Ncam1a und Ncam1b an fluoreszente Partikel gekoppelt, um homophile Interaktionen nachzuweisen. Die Größe der gebildeten Aggregate wurde mit einem speziell für diese Anwendung entwickelten Programm dokumentiert.

Es werden homophile Interaktionen von Ncam1a und Ncam1b eingegangen, wobei die Wechselwirkungen von Ncam1b stärker ausgeprägt sind (vgl. Abschnitt 4.2.1).

Die homophile Interaktion von Ncam1a wird durch Polysialylierung aufgehoben (vgl. Abb. 26), wohingegen die homophile Bindung von Ncam1b davon nicht betroffen war (vgl. Abb. 29), auch

interagieren sie heterophil, deren Interaktion durch Polysialylierung abgeschwächt wird (vgl. Abb. 31, 32).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Ncam1-Paraloge unterschiedliche homophile Bindungsarten eingehen. Die homophile Bindung von Ncam1b ist so stark, dass sie auch nach Anheftung der als sterisch inhibierend beschriebenen polySia noch möglich ist. Darüber, welche der extrazellulären Domänen daran beteiligt sind, kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden.

Es gibt verschiedene Ansätze die beschreiben, welche der Ig-Domänen die homophile Interaktion von NCAM1 vermitteln können (Soroka et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass die ersten und zweiten Ig-Domänen reziprok aneinander binden (Kiselyov et al., 1997). Außerdem können auch die dritten Ig-Domänen aneinander binden (Rao et al., 1994; Soroka et al., 2003) oder es können alle fünf Ig-Domänen beteiligt sein (Ranheim et al., 1996).

Mit Hilfe eines Sequenzvergleich verschiedener NCAM1 Orthologe wurde darüber spekuliert, welche der Aminosäuren an der homophilen Bindung zwischen der ersten und zweiten Ig-Domäne beteiligt sind (Kasper et al., 2000). Dieser Vergleich wurde um die Ncam1-Paraloge erweitert (vgl. Abschnitt 4.2.1). Wichtige an der Interaktion beteiligte Aminosäuren, sind zwischen den Spezies und auch innerhalb der Ncam1-Paraloge konserviert. Eine homophile und heterophile Interaktion zwischen den Ncam1-Paralogen erscheint unter Einbeziehung dieses Modells plausibel.

Betrachtet man, dass polySia die Ncam1a-homophile Interaktion verhindert, aber auf die Ncam1b-homophile Interaktion keinen Einfluss hat, kann man durchaus erahnen, dass es optionale Binde-mechanismen geben muss.

Die unterschiedlichen NCAM1 Isoformen können verschiedene Konzentrationen von polySia an ihrer extrazellulären Domäne tragen (Edelman & Chuong, 1982). NCAM1 kann außerdem homophile Bindungen in Form von *Zippern* eingehen (Übersichtsartikel Walmod et al., 2004). An einem zweidimensionalen *Zipper* kann nur NCAM1 partizipieren, dass nicht mit polySia modifiziert ist, weil die NCAM1-Moleküle zu dicht gepackt sind (Kiselyov et al., 2005). In Anwesenheit von polySia könnten die NCAM1-Moleküle dann schwächere eindimensionale *compact-* oder *flat-Zipper* ausbilden.

Es wäre denkbar, dass auch Ncam1a und Ncam1b unterschiedlich stark polysialyliert werden. Wenn davon ausgegangen wird, dass Ncam1a andere homophile *Zipper* ausbildet als Ncam1b, könnte die Interaktion trotz Anwesenheit von polySia für Ncam1b weiterhin möglich sein (Soroka et al., 2003; Kiselyov et al., 2005).

Es wird außerdem auch darüber berichtet, dass je nach polySia-Konzentration unterschiedliche *Zipper*-unabhängige Bindungen eingegangen werden können (Kiselyov et al., 1997). Wenn kein polySia an NCAM1 gebunden ist, binden alle fünf Ig-Domänen aneinander, wohingegen die ersten und die zweiten Ig-Domänen reziprok aneinander binden, wenn NCAM1 stärker polysialyliert ist. Ein solcher oder ähnlicher Mechanismus wäre auch für die Ncam1-Paraloge denkbar. Um eine abschließende Aussage darüber treffen zu können, müssten die an diesen Interaktionen beteiligten Domänen identifiziert werden. Beispielsweise wäre ein *Zell-Overlay-Assay*, der die Interaktionen der einzelnen Ig-Domänen von Ncam1a und Ncam1b betrachtet, ein Ansatz dies zu untersuchen. Auch könnte der Polymerisationsgrad von polySia beider Moleküle gemessen werden, um detailliert auf die funktionellen Unterschiede einzugehen (Nakata & Troy, 2005).

Das Modell verdeutlicht die unterschiedlichen Bindeeigenschaften der Ncam1-Paraloge und ebenso, wie diese durch polySia moduliert werden (Abb. 57). Ncam1a und Ncam1b können homophil in Wechselwirkung treten. Die Anwesenheit von polySia verhindert die homophile Interaktion von Ncam1a und reduziert die heterophile Bindung zwischen Ncam1a und Ncam1b. Die homophile Interaktion von Ncam1b ist nicht betroffen.



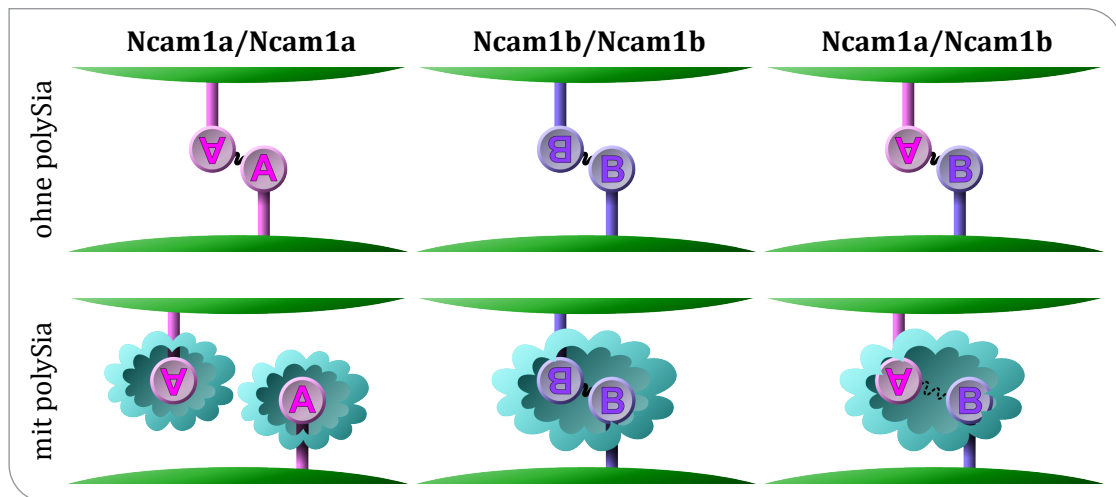


Abbildung 57: Modell zur homophilen und heterophilen Interaktion der Ncam1-Paralogen. Ncam1a und Ncam1b können homophile und miteinander heterophile Wechselwirkungen ausbilden. Die Polysialylierung verhindert die homophile Interaktion von Ncam1a, wohingegen polySia-Ncam1b weiterhin homophil binden kann. Die Interaktion zwischen polySia-Ncam1a/polySia-Ncam1b wird geschwächt; die Moleküle können aber weiterhin in Wechselwirkung treten.

### 5.2.2 Native Bindepertner von Ncam1a und Ncam1b

In den bisher durchgeführten Experimenten konnte ein unterschiedliches Interaktionsverhalten der Ncam1-Paralogen gezeigt werden. In den weiterführenden Untersuchungen lag der Fokus auf der Identifikation nativer Bindungspartner. In *Affinity-Assays* wurden die rekombinanten Proteine als Affinitäts-Sonden verwendet, um potentielle Interaktionspartner spezifischen Strukturen zuzuordnen. Eine Einschränkung dieses Experiments stellt sich dadurch, dass Interaktionspartner nur dargestellt werden können, wenn sie für die Proteinsonde frei zugänglich sind. Dies ist nicht der Fall, wenn dieser durch andere Bindepertner abgesättigt ist oder eine Bindung durch Anwesenheit von polySia sterisch gehemmt wird. polySia muss dann durch einen Knockdown der Sialyltransferase entfernt werden. Welche Nebeneffekte ein *st8sialII*-Knockdown mit sich trägt ist nicht bekannt. Beispielsweise könnte Ncam1a, das zuvor polysialyliert war, nach einem *st8sialII*-Knockdown nun mit anderen Molekülen in Wechselwirkung treten, da polySia fehlt. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass selbst der Verlust von polySia nicht unbedingt dazu führen muss, dass anschließend freie Bindungsstellen vorhanden sind.

Die Ncam1a-Proteinsonden binden in Anwesenheit von polySia nicht an spezifische Strukturen sondern detektieren etwas, das an einen zeitlich-abhängigen Gradienten erinnert. Während Ncam1a zu 24 hpf noch in einem durchgängigen Strahl den Rumpf durchzieht, reduziert sich der Strahl nach 48 hpf auf Bereiche der Schwanzspitze (vgl. Abb. 38). Wird die Synthese von polySia durch Knockdown der Sialyltransferase gehemmt, verschiebt sich das Bindemuster der Ncam1a-Proteinsonde wieder weiter cranial. In einer Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass das Migrationsverhalten des Primordiums - eine Struktur des Seitenliniensystems - verlangsamt wird, wenn polySia fehlt (Heiny, 2012; laufende Doktorarbeit R. Dries). So wurde in der vorliegenden Arbeit für diese Experimente eine andere transgene Fischlinie genutzt, um die Migration des Primordiums zu beobachten. GFP wird in dieser Linie unter einem Promotor exprimiert, der spezifisch für das Seitenliniensystem ist. Wird die Ncam1a-Proteinsonde unter dem Aspekt der Migration des Primordiums betrachtet, korreliert die Position des Primordiums mit dem Versatz der Ncam1a-Proteinsonde (Chitnis et al., 2012). Der Bindepertner könnte also durchaus mit der Ausbildung des Seitenliniensystems in Verbindung gebracht werden.

Die Migration des Primordiums wird durch verschiedene Signalkaskaden gesteuert. Beispielsweise wird entlang des Zebrafisch-Rumpfs der Chemotaxis-induzierende Gradient *Sdf-1 $\alpha$*  aufgebaut und auf dem Primordium dessen Rezeptoren *Cxcr4* und *Cxcr7* exprimiert (Li et al., 2004). Das

Primordium legt durch spezifische Expression der Chemokin-Rezeptoren die Migrationsrichtung fest. *Cxcr4b* wird in der Leading-Zone des Primordiums exprimiert und durch Aktivierung des Chemokins *Sdf1 $\alpha$*  wird eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade ausgelöst. Diese fördert die Migration in Richtung des Chemokins. Die Training-Zone des Primordiums exprimiert *Cxcr7*. Dieser baut das Chemokin durch Endozytose ab, wodurch ein Chemokin-Gradient in Richtung der Schwanzspitze entsteht (Aman & Piotrowski, 2008; Dona et al., 2013). Eine Interaktion zwischen NCAM1 und *Sdf-1 $\alpha$*  konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Die Vorstellung wäre diesbezüglich, dass polySia-Ncam1a den Liganden bindet und damit eine Signalweiterleitung durch *Cxcr4b* fördert. Beispielsweise ist bekannt, dass polySia-NCAM1 Wachstumsfaktoren bindet, um sie so für ihre Rezeptoren zugänglich zu machen (Kanato et al., 2008). Fehlt polySia auf Ncam1a, würde dies also im Umkehrschluss zu einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit des Primordiums führen; der Chemokin-Gradient wird entweder nicht ausreichend schnell an der Leading-Zone des Primordiums erkannt, oder aber der *Sdf-1 $\alpha$*  Ligand wird nicht schnell genug an der Trailing-Zone abgebaut, sodass der Gradient nicht weiter aufgebaut werden kann.

Ncam1a kann nach dem Verlust von polySia durch den Knockdown der Sialyltransferase außerdem an Zellen des Rückenmarks, der Floorplate und an muskuläre Strukturen binden (vgl. Abb. 39). Da dieses Affinitätsmuster nur in Abwesenheit von polySia auftritt, kann daraus geschlossen werden, dass die Bindung an den nativen Interaktionspartner durch polySia inhibiert wird. Dieser Interaktionspartner könnte natives Ncam1a selbst sein. Dafür spricht, dass natives Ncam1a auf diesen Strukturen exprimiert wird (vgl. Abb. 11A) und homophile Ncam1a/Ncam1a-Bindungen in den *in vitro*-Assays gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 22 sowie 26). Desweiteren haben Studien im Säuersystem ergeben, dass NCAM1 auch *in vivo* homophile Wechselwirkungen eingehen kann (Übersichtsartikel: Walmod et al., 2004).

Dass sich keine Bindung der Ncam1a-Proteinsonde an die Ncam1a exprimierenden Motoraxone beobachten lässt könnte mehrere Gründe haben. Zum einen könnten alle Ncam1a-Moleküle auf den Motoneuronen durch Bindungen abgesättigt sein, z.B. durch die homophilen Bindungen, die für die Faszikulierung der Axone notwendig sind. Zum anderen ist die Hintergrundfärbung in diesem Bereich so stark, dass eine schwache Bindung an die dünnen Motoraxone dadurch überlagert werden könnte.

Auch für Ncam1b wurden die *Affinity-Assays* durchgeführt. Zu 48 hpf waren keine aussagekräftigen Bindemuster zu erkennen. Vermutlich sind die nativen Interaktionspartner der Ncam1b-Proteinsonde noch durch native Interaktionspartner gebunden, sodass es zu keiner Bindung der Proteinsonde kommen kann.

Es bleibt fraglich, warum die Ncam1a-Proteinsonde zu diesem Zeitpunkt (zumindest nach *st8siall*-Knockdown) einen Interaktionspartner findet und Ncam1b nicht. Eine letztendlich schlüssige Erklärung dafür gibt es nicht. Es wäre denkbar, dass alle potentiellen Bindepartner durch andere Interaktionen abgesättigt sind.

In 10 dpf alten Larven lässt sich jedoch eine Bindung der Ncam1b-Proteinsonde an die Motoneurone nachweisen. Diese Bindung ist unabhängig davon, ob polySia gebildet wird oder nicht (vgl. Abb.40B). Als Interaktionspartner kämen u.a. beide Ncam1-Paraloge, aber auch die Zellerkennungsmoleküle Neurolin und Tag-1 in Frage. Sie alle werden zu diesem Zeitpunkt auf den Motoneuronen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Zudem können natürlich auch andere Proteine unabhängig von der Ig-Superfamilie an Ncam1b binden. Spekulationen würden zu diesem Punkt zu weit führen und können nicht abschließend geklärt werden.

Da die Entwicklung der Motoneurone nach 10 dpf weitgehend abgeschlossen ist, wäre denkbar, dass nun nicht mehr alle potenziellen Ncam1b-Bindepartner durch andere Interaktionen abgesättigt sind. Das könnte damit erklärt werden, dass zur axonalen Wegfindung andere Interaktionen benötigt werden als zur Aufrechterhaltung der Projektionen.

Um die nativen Bindungspartner von Ncam1b zu isolieren, wurden Pulldown-Assays aus einem Homogenat aus isolierten Motoneuronen durchgeführt. Dabei wurde das Zellerkennungsmolekül

Tag-1 als Interaktionspartner von Ncam1b identifiziert (vgl. Abb. 41). TAG-1 ist ein transient exprimiertes Protein der Ig-Superfamilie (Karagogeos et al., 1991). Es wird auf Axonen, Schwannschen Zellen und Glia exprimiert (Karagogeos et al., 1991; Traka et al., 2002). Im Huhn ist NCAM1 ein Interaktionspartner von TAG-1/Axonin-1 und moduliert so Zelladhäsion und Migration (Milev et al., 1996). Im Zebrafisch ist eine Interaktion zwischen Ncam1b und Tag-1 bisher nicht beschrieben worden. Es ist durchaus denkbar, dass eine vergleichbare Rolle auch zwischen Ncam1b und Tag-1 im Zebrafisch eingenommen wird und die Interaktion zwischen beiden der Axonlenkung und Zelladhäsion dient.

### 5.2.3 Tag-1: Funktion und Interaktionen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Tag-1 ein Interaktionspartner von Ncam1b ist. Daher wurden die funktionellen Studien um Tag-1 erweitert.

Der *tag-1*-Knockdown führt zur Defaszikulation der Axonbündel im *Whole Mount* (statistische Analyse im Einzelvergleich dieser Kategorie), allerdings ist die Veränderung auf alle Phänotypen insgesamt nicht signifikant (vgl. Abschnitt 4.1.6). Außerdem führt der *tag-1*-Knockdown auch zu einer dosisabhängigen Defaszikulation der posterioren Kommissur (vgl. Abb. 19).

In retinalen Ganglienzellen im Goldfisch hat die Injektion polyklonaler Antikörper gegen Tag-1 keinen Effekt (Ott (2000) hier Anm. zu Diplomarbeit C. Klisa). Zellkulturen legten aber nahe, dass Funktionen wie Axonlenkung und Faszikulation über TAG-1 vermittelt werden können (Rader et al., 1993).

Warum es im Zebrafisch nach einem *tag-1*-Knockdown nicht zu einem ausgeprägten morphologischen Effekt kommt, kann zu diesem Zeitpunkt keine genauere Aussage gemacht werden. Die Menge an injiziertem Morpholino sollte ausreichend gewesen sein, da mit einer Injektion von etwa 6-8 ng Morpholino keine Tag-1 Expression mehr vorhanden ist (vgl. Abb. 17).

Bead-Aggregations-Assays zeigen, dass Tag-1 eine schwach homophile Bindung eingeht (vgl. Abb. 33). Über die Bindungskonstante von anderen TAG-1 Orthologen ist nichts beschrieben, sodass ein Vergleich nicht möglich ist. Die homophile Interaktion von humanem TAG-1 beruht auf aromatischen Aminosäuren zweier Ig2-G-Stränge, die ausschlaggebend für eine Dimerisierung sind (Mortl et al., 2007). Der Sequenzvergleich zeigt, dass die an diesem Mechanismus beteiligten Aminosäuren zwischen Huhn, Maus und Mensch konserviert, im Zebrafisch aber ausgetauscht sind (vgl. Abschnitt 4.3.1). Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass Tag-1 im Zebrafisch im Gegensatz zum Maus Ortholog nur schwache homophile Wechselwirkungen eingeht. Genauere Untersuchungen wie beispielsweise bezüglich der Bindekonstante könnten diese Kontroverse genauer beleuchten. Im Huhn können TAG-1/Axonin-1 und NCAM1 heterophil interagieren und modulieren so die Zelladhäsion und die Migration (Milev et al., 1996). Als potenzieller Interaktionspartner wurde Zebrafisch Tag-1 mit den Ncam1-Paralogen auf heterophile Interaktion untersucht. So konnte ein weiterer Unterschied zwischen Ncam1a und Ncam1b aufgedeckt werden. Ncam1a interagiert nicht mit Tag-1 (vgl. Abb 35A). Andererseits stellte sich heraus, dass Ncam1b und Tag-1 miteinander interagieren können. Diese Wechselwirkung konnte sowohl *in vitro* über heterophile *Overlay-Assays* (vgl. Abb. 35B) und wie bereits erwähnt auch als nativer Interaktionspartner über *Pulldown-Assays* gezeigt werden (vgl. Abb. 41).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Tag-1 im Zebrafisch nicht so ausgeprägte Funktionen erfüllt, als die aus Huhn oder Maus beschriebenen. Zebrafisch Tag-1 vermittelt Neuritenwachstum, Axonpolarität und Axonlenkung sowie Faszikulation (Wolman et al., 2008). Obwohl es als eines der typischen Axonlenkungs-Moleküle gilt, beeinflusst es die Motoraxon-Lenkung im Zebrafisch nicht. Im *Whole Mount* Embryo ist Tag-1 ausschließlich an der Faszikulation beteiligt, nicht aber an der Axonlenkung und -wegfindung.

Im Zebrafisch geht Tag-1 zudem nur geringe homophile Wechselwirkungen ein. Darüber hinaus

bindet Tag-1 an Ncam1b nicht aber an Ncam1a (Abb. 58).

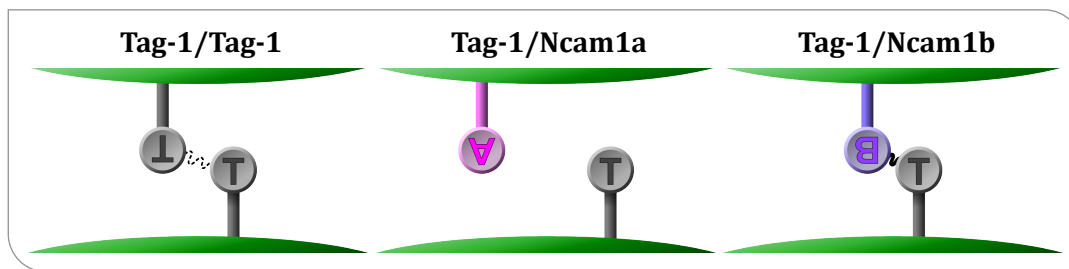


Abbildung 58: Modell zur homophilen und heterophilen Interaktion von Tag-1. Tag-1 kann im Zebrafisch nur schwach homophil interagieren. Mit Ncam1a geht Tag-1 keine Wechselwirkung ein, wohingegen Ncam1b als ein Interaktionspartner für Tag-1 sowohl *in vitro* als auch im nativen System nachgewiesen werden konnte.

#### 5.2.4 Neurolin: Funktion und Interaktionen

Neurolin wird im Zebrafisch auf sekundären Motoneuronen und auf retinalen Ganglienzellen exprimiert. Es ist ein wichtiger Faktor für Motoraxonwachstum und -lenkung dieser Neuronentypen (Ott et al., 1998; Ott et al., 2001).

Wird die Expression von Neurolin inhibiert, defaszikulieren die Axone und bilden viele aberrante Projektionen aus. Der *common path* defaszikuliert. Vermutlich tritt hier ein Fehler in der Axonwegfindung auf, woraufhin die Axone an dieser Landmarke nicht mehr weiter wachsen (vgl. Abschnitt 4.1.6).

Diese Ergebnisse bestätigen großenteils Antikörper-Injektionen, die zur Blockade von Neurolin in Zebrafischembryonen injiziert wurden (Ott et al., 2001). Die Blockade von Neurolin führt zu Wegfindungsstörungen und aberranten Projektionen der Motoraxone. Die Motoraxone defaszikulieren allerdings nicht. In der Gesamtheit wird aber auch von einer Verbreiterung des *common path* gesprochen, die mit der hier vorgetragenen Defaszikulation des *common path* übereinstimmen könnte (Ott et al., 2001).

Neurolin aus Zebrafisch kann homophile Bindungen eingehen (vgl. Abb. 36). Damit ähnelt es seinem humanen Homolog, für das ebenfalls homophile Wechselwirkungen beschrieben wurden (Kempen et al., 2001).

Ncam1a und Ncam1b sind schwach heterophile Interaktionspartner von Neurolin (Abb. 59; vgl. auch Abb. 37). Heterophile Interaktionen mit NCAM1 waren bisher noch nicht bekannt. Neurolin wird wie Ncam1a/1b auf den sekundären Motoneuronen exprimiert. Die heterophile Interaktion von Neurolin mit Ncam1a/1b könnte eine Funktion in der Wegfindung sekundärer Motoraxone haben.

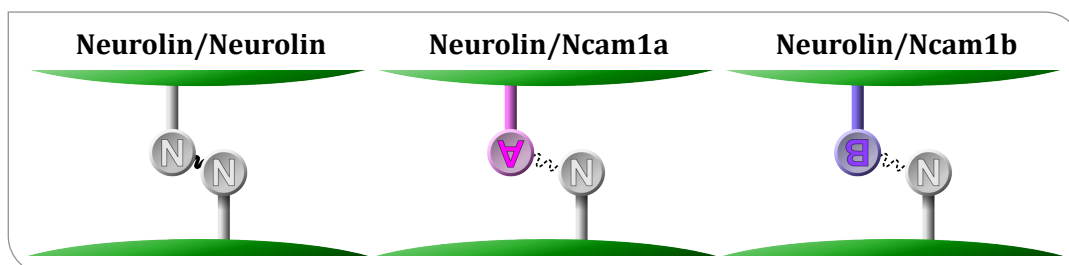


Abbildung 59: Modell zur homophilen und heterophilen Interaktion von Neurolin. Wie das humane Homolog kann Zebrafisch Neurolin homophil binden. Auch heterophile Interaktionen von Neurolin mit Ncam1a und Ncam1b wurden nachgewiesen, allerdings sind diese nicht stark ausgeprägt.

### 5.3 Funktionsanalysen von Ncam1a und Ncam1b in der Primärzellkultur

Vor dem Hintergrund unterschiedlicher Funktionen der Ncam1-Paraloge, wurden diese bezüglich des Axonwachstums in Primärzellkulturen untersucht. In diesem Ansatz wurden die Motoneurone aus Rückenmarksexplantaten von Zebrafischembryonen aus der nativen Umgebung isoliert, in der sie durch das umgebende Gewebe mit einer Vielzahl von Einflüssen konfrontiert sind. Die Primärzellkultur ermöglicht es, stattdessen Zellen unter definierten Wachstumsbedingungen zu beobachten. Unter Einbezug von Morpholino-Knockdowns und der Verwendung unterschiedlicher Oberflächensubstrate kann der Einfluss der einzelnen Faktoren differenziert betrachtet werden. Als Substrate wurden neben Laminin, auch Ncam1a und Ncam1b verwendet.

Beim Auswachsen der Axone lassen sich drei unterschiedliche Phänotypen beobachten: *Outgrowth* (einfaches unverzweigtes Axon), *Branched* (übermäßig stark verzweigtes Axon) sowie *No Outgrowth* (Ausbleiben der Bildung von Neuriten) (vgl. Abb. 42).

Axone aus Kontrollen auf Laminin zeigen überwiegend den Outgrowth-Phänotyp. Laminin fördert im gewissen Maße das Wachstum isolierter Neurone aus dem Vorder- und Hinterhirn sowie retinaler Ganglienzellen und Motoneuronen von Zebrafischen (Z. Chen et al., 2013). Einer der wohl bekanntesten Laminin-Rezeptoren ist die Integrin-Familie (Hynes, 2002). Integrine können eine Vielzahl zytosolischer Signalproteine binden und regulieren so die Dynamik von Wachstumskegeln. Indem Axonlenkungs-Moleküle und Wachstumsfaktoren die Integrin-vermittelte Adhäsion regulieren können, werden Integrin-Laminin Wechselwirkungen mit axonaler Wegfindung in Zusammenhang gebracht (J. P. Myers et al., 2011).

Auch Kontrollen die auf Ncam1a oder Ncam1b auswachsen verändern die Morphologie ihrer Axone nicht. Sie wachsen lang und unverzweigt aus (vgl. Abb. 45). NCAM1 hat auf Neuronenkulturen aus dem Mittelhirn von Mäusen im Vergleich zu Fibronektin eine wachstumsfördernde Eigenschaft (García-Pena et al., 2014). Sauer (2013) konnte im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit diese Ergebnisse für Motoneuronen-Primärzellkulturen aus dem Zebrafisch bestätigen.

Es gibt Hinweise darauf, dass es eine direkte Interaktion zwischen NCAM1 und Laminin geben könnte (Cole & Schachner, 1987). NCAM1 besitzt eine Heparin-Bindestelle und interagiert damit über Heparin mit Laminin (Kiselyov et al., 1997). Ob die hier beobachtete permissive Wirkung von Laminin auf direkten Wechselwirkungen mit Ncam1a oder Ncam1b auf den Axonen beruht, kann nicht gesagt werden. Es ist nicht bekannt ob die Ncam1-Paraloge mit Laminin interagieren können. Ncam1a und Ncam1b als Wachstumssubstrat haben die gleichen Effekte auf die Neuronen wie Laminin, sodass die Axone ungehindert auswachsen können. Haben die Zellen auf Streifensubstraten die Wahl zwischen Laminin und Ncam1b, zeigen die Neurone keine Präferenz für die Substrate (vgl. Abb. 46). Diese Wachstumssubstrate fördern vermutlich gleichermaßen das Neuritenwachstum (Edgar et al., 1984; Cole & Schachner, 1987).

Die Schemazeichnung fasst die Ergebnisse noch einmal zusammen. Zur Vereinfachung sind nur die Interaktionen abgebildet, auf die im späteren Verlauf noch eingegangen wird (Abb. 60).

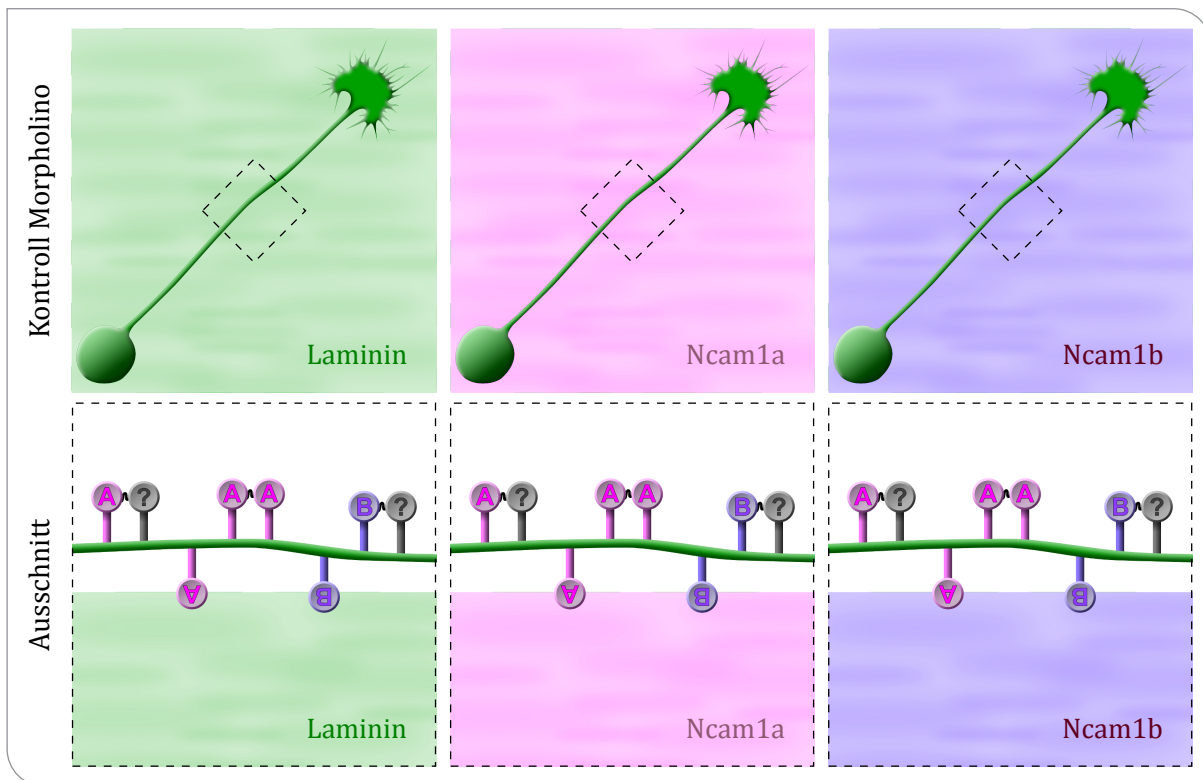


Abbildung 60: Modell zum Wachstum von Motoneuronenkulturen auf unterschiedlichen Oberflächensubstraten. Laminin, Ncam1a und Ncam1b fördern das Wachstum von Motoneuronen in der Zellkultur. **A** Ncam1a, **B** Ncam1b, **?** Unbekannter Interaktionspartner.

Nach Morpholino-Knockdown von *ncam1a* werden auf Laminin weniger Neuriten gebildet als in Kontrollen; derselbe Phänotyp wird beobachtet, wenn die Ncam1a-defizienten Axone auf Ncam1a auswachsen. Das zeigt, dass Ncam1a auf den Neuronen innerhalb der Zellmembran in *cis* benötigt wird, um die Neuritenbildung zu ermöglichen. Exogen angebotenes Ncam1a fördert das Axonwachstum nicht. Ncam1b hingegen verhindert die Bildung von Axonen, sodass keine Zellen mehr auswachsen können (vgl. Abb. 48).

Dies könnte dafür sprechen, dass die Interaktionen der Ncam1-Paralogue unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle haben. Es könnte möglich sein, dass Ncam1b an freigewordene Interaktionspartner von Ncam1a bindet und damit anderweitige Effekte innerhalb der Zelle auslöst.

Ausbilden von Neuriten ist eines der mannigfaltigen Funktionen die für die NCAM1 Orthologe beschrieben sind (E. J. Williams et al., 1994). Auch das Zebrafisch Ortholog Ncam1a unterstützt die Zellen bei der Bildung von Neuriten. Um diese Funktion auszuführen, muss es innerhalb der Zellmembran in *cis* lokalisiert sein, da eine Ncam1a-Oberfläche den Ncam1a-Defizit nicht retten kann. Ncam1b hat eine negative Wirkung auf Ncam1a-defiziente Motoneurone, sodass keine Neuriten mehr gebildet werden (Abb. 61).

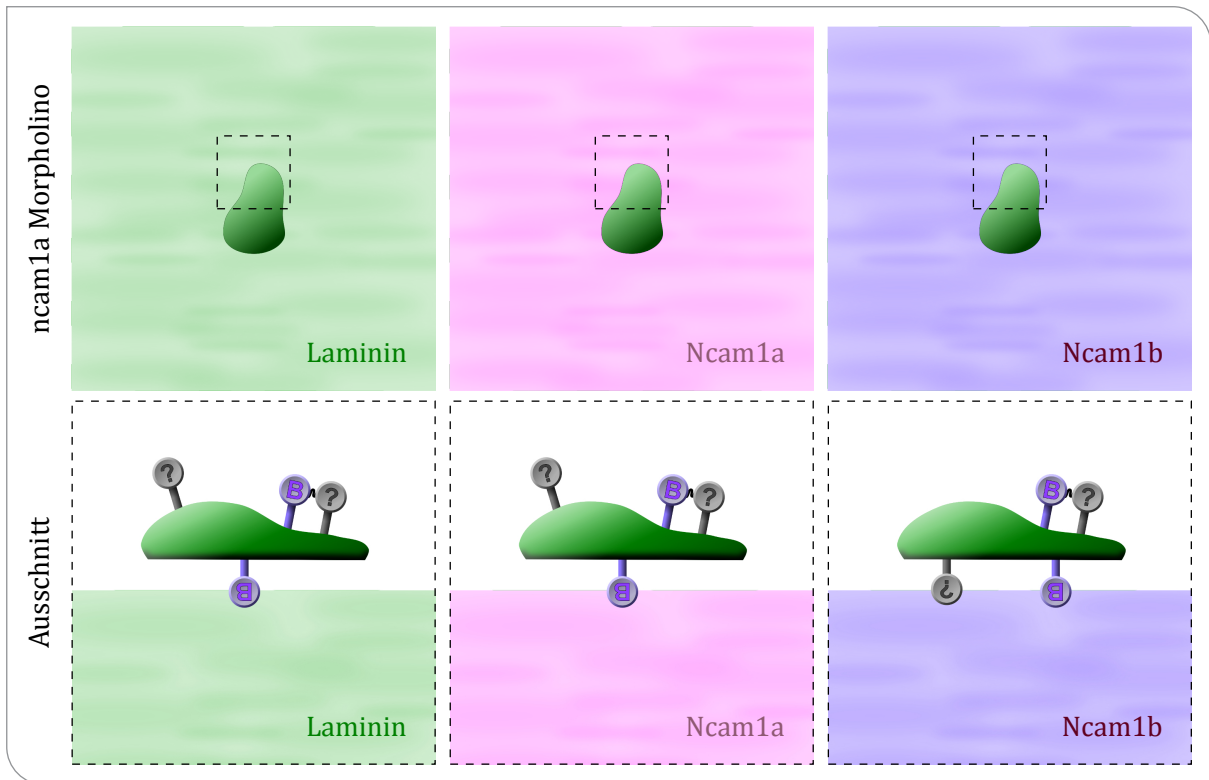


Abbildung 61: Modell zum Wachstum Ncam1a-defizienter Motoneuronenkulturen auf unterschiedlichen Oberflächensubstraten. Der *ncam1a*-Knockdown bewirkt, dass auf Laminin und Ncam1a weniger Axone ausgebildet werden. Ncam1b auf der Oberfläche verhindert das Wachstum Ncam1a-defizienter Motoneurone in der Zellkultur. (A) Ncam1a, (B) Ncam1b, (?) Unbekannter Interaktionspartner.

Der Knockdown von *ncam1b* bewirkt, dass die Zellen auf Laminin besonders stark verzweigt auswachsen. Wird Ncam1b-defizienten Zellen Ncam1b als Wachstumssubstrat angeboten, rettet das den Phänotyp und die Neurone bilden unverzweigte Axone wie in den Kontrollen aus. Ncam1a als Substrat kann das Auswachsen der Axone nicht induzieren (vgl. Abb. 50).

Mit Zeitrafferaufnahmen Ncam1b-defizienter Motoneurone auf Laminin ist es möglich, den auftretenden *Branched*-Phänotyp genauer zu betrachten. Die stark verzweigten Fortsätze der Neurone werden kurzzeitig aufgebaut und kollabieren unmittelbar daraufhin wieder. Die einzelnen Branches binden an sich selbst und projizieren aneinander, bis sie verschmelzen und kollabieren. Auch der Zellkörper wandert an den Neuriten auf und ab (vgl. Abb. 51).

Werden Ncam1b-defiziente Motoneurone auf Ncam1b-Oberflächen ausgesät, verhalten sie sich wie Kontrollneurone. Dieser *Rescue*-Effekt muss von einem heterophilen Interaktionspartner ausgelöst werden, da in der Membran von *ncam1b*-Knockdown Zellen kein Ncam1b vorhanden ist, mit dem exogenes Ncam1b interagieren könnte. Der heterophile Interaktionspartner löst durch Bindung der extrazellulären Domäne von Ncam1b eine Signalkaskade in der Zelle aus, die dazu führt, dass unverzweigte Neuriten gebildet werden. Ncam1b ist in nativen Situation der Kontrolle dafür in *cis* lokalisiert. Dies wird damit belegt, dass die Kontroll-Neuronen auf Laminin ohne Verzweigungen auswachsen. Hier liegt Ncam1b ausschließlich innerhalb der Zelle in *cis* vor und verhindert so das Branches der Axone. Wird die heterophile *cis* Interaktion durch einen *ncam1b*-Knockdown gestört, reicht eine heterophile *trans*-Interaktion aus, um darauf eine Reaktion in der Zelle auszulösen. Es ist folglich nur die extrazelluläre Domäne in Form eines Liganden und nicht Ncam1b-vermitteltes Signaling notwendig, um eine Signalkaskade zu aktivieren.

Aus Beobachtungen von Zeitrafferaufnahmen Ncam1b-defizienter Motoneuronen auf Streifen-substraten mit Ncam1b und Laminin können noch weitere Schlussfolgerungen gezogen werden. Ncam1b-defiziente Motoneurone haben eine Präferenz für die Ncam1b-Streifen. Befinden sich die



Zellen auf einem Laminin-Streifen, migrieren sie aktiv auf einen Ncam1b-Streifen (vgl. Abb. 52). Weiter noch vermeiden die Ncam1b-defizienten Motoneurone aktiv die Laminin-Streifen, wenn ein solches Motoneuron bereits auf Ncam1b positioniert ist (vgl. Abb. 53). Das legt nahe, dass der heterophile Interaktionspartner von Ncam1b auf den Wachstumskegeln exprimiert sein muss, in dem eine Interaktion der Beiden stattfindet und zu einer Reaktion in der Zelle führt.

Diese Daten lassen darauf schließen, dass Ncam1b neben der wachstumsfördernden Eigenschaft auch teilweise eine axonlenkende Wirkung auf Motoneurone hat. Zellkulturanalysen mit Neuronen aus dem Mittelhirn von Mäusen belegen eine solche Vermutung (García-Pena et al., 2014).

Ncam1b hat einen entscheidenden Einfluss auf die Axonlenkung von Motoneuronen. Der Knockdown von Ncam1b führt auf Laminin zur Bildung verzweigter Axone. Dieser Phänotyp kann durch exogenes Ncam1b gerettet werden, sodass die Axone wieder unverzweigt wachsen. Ncam1a als Substrat für Ncam1b-defiziente Motoneurone reduziert die Bildung von Neuriten (Abb. 62).

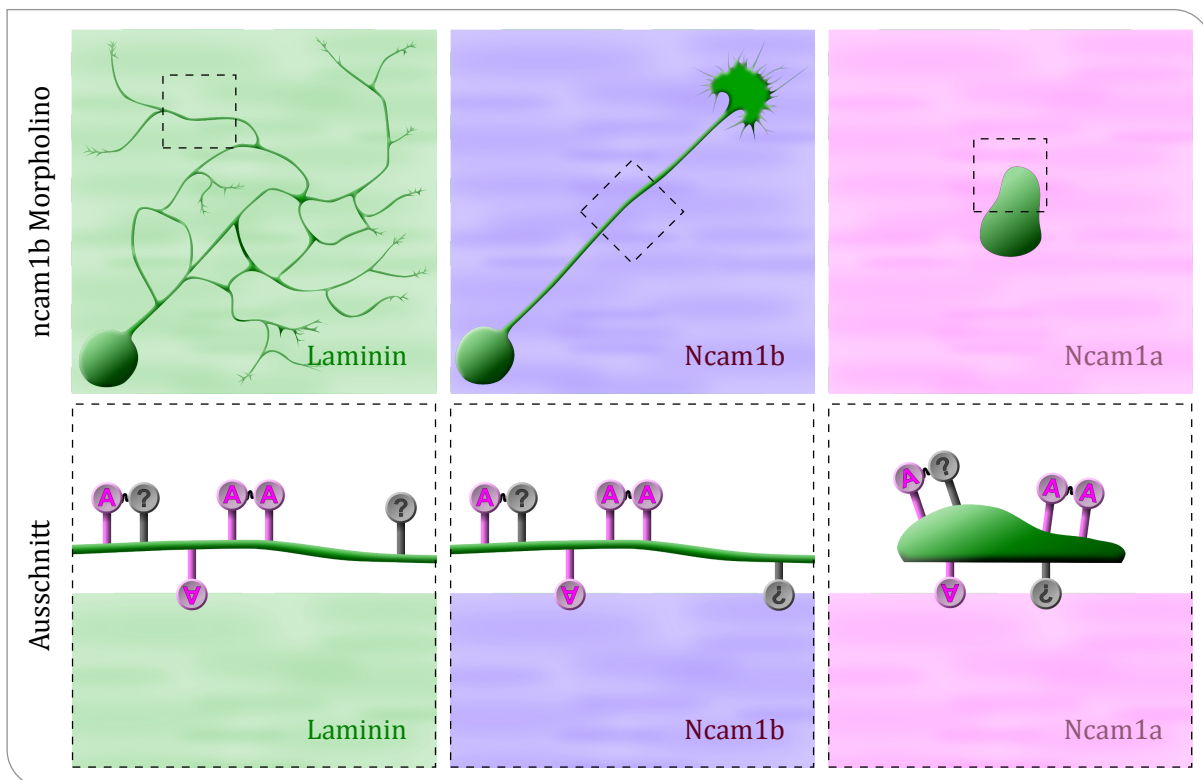


Abbildung 62: Modell zum Wachstum Ncam1b-defizienter Motoneuronenkulturen auf unterschiedlichen Oberflächensubstraten. der *ncam1b*-Knockdown führt zur Ausbildung stark verzweigter Axone. Ncam1b auf der Oberfläche kann die Kontrollsituation wieder herstellen. Dafür bindet das exogene Ncam1b an einen noch unbekannten Interaktionspartner: *ncam1b*-Knockdown Zellen auf exogenem Ncam1a bilden keine Neuriten aus. (A) Ncam1a, (B) Ncam1b, (?) Unbekannter Interaktionspartner.

Zusammengefasst ergibt sich folgendes Bild: Für ein korrektes Auswachsen benötigen die Motoraxone *in vitro* sowohl Ncam1a als auch Ncam1b. Ncam1a muss auf den Motoraxonen selbst exprimiert sein. Ob diese Interaktion von homophiler oder heterophiler Natur ist, bleibt spekulativ. Es zeigt aber, dass Ncam1a als Rezeptor für einen Liganden fungiert, der durch diesen Assay nicht identifiziert werden kann.

Ncam1b ist für ein Auswachsen der Axone sowohl auf den Axonen selbst hinreichend als auch, wenn es exogen präsentiert wird. Das lässt vermuten, dass Ncam1b hier Ligand für einen heterophilen Interaktionspartner ist, der sowohl durch *cis*- als auch durch *trans*-Wechselwirkungen aktiviert werden kann.

Diese Daten untermauern also, dass Ncam1a und Ncam1b in der Evolution eine funktionelle Diver-

sifizierung erfahren haben.

Deterministische Faktoren, wie Axonlenkung entlang eines vorgegebenen Weges, sind nicht die einzigen Mechanismen, die zu der Ausbildung einer hoch komplexen Struktur wie die des Nervensystems führen. Indem sich die Schwesterneuriten einer Zelle gegenseitig erkennen und sich selbst vermeiden haben sie eine repulsive Wirkung aufeinander, das dazu führt, dass sich Neuriten der gleichen Zelle normalerweise nicht überlappen. Diese Prozesse werden isoneuronale Selbsterkennung und Selbstvermeidung bzw. *self-recognition* / *self-avoidance* genannt (Kise & Schmucker, 2013).

Erstmals wurde diese Beobachtung an mechanosensorischen Neuronen von Blutegeln gemacht (Kramer & Kuwada, 1983). Inzwischen sind viele molekularen Aspekte der *self-recognition* / *self-avoidance* aufgedeckt worden. Der wohl prominenteste Effektor in diesem Prozess ist der Zelloberflächenrezeptor *down syndrome cell adhesion molecule* (DSCAM). Es ist mit 220 kDa eines der größten Proteine der Ig-Superfamilie. Es enthält zehn Ig-Domänen und sechs FN-III-Domänen. Es können etwa 38000 verschiedene Spleißisoformen von DSCAM gebildet werden, die den einzelnen Zellen eine Identität zuweisen und so als molekularer Code für eine Zelle dienen (Schmucker et al., 2000). DSCAM spielt sowohl eine entscheidende Rolle in der zellautonomen *self-recognition* als auch in der *self-avoidance* von Neuriten von Invertebraten und Vertebraten (Matthews et al., 2007; Fuerst et al., 2008, Übersichtsartikel: Schmucker & B. Chen, 2009; Montesinos, 2014). Auch im Zebrafisch konnte ein Ortholog von DSCAM identifiziert werden. Der Knockdown von Zebrafisch Dscam führt in unterschiedlichen Neuronenpopulationen zu einer Reduktion der Neuronenzellzahl sowie missgeleiteter Axone die nicht mehr den stereotypen Wegen folgen (Yimlamai et al., 2005). Neben DSCAM sind bereits auch weitere Zelloberflächenmoleküle wie Protocadherine identifiziert worden, die für zellautonomes *self-avoidance* retinaler Neuriten verantwortlich sind (Lefebvre et al., 2012). Auch Slit2 und dessen Rezeptor Robo2 nehmen eine Rolle in *self-avoidance* ein, sodass ein Knockout zu ausgeprägtem branching zerebraler Purkinjezellen führt und mit veränderter Motorik in Verbindung steht (Gibson et al., 2014). Ein siRNA-Knockdown von DSCAM in Hühnern und Mäusen führt zu einer reduzierten Interaktion zwischen DSCAM und Netrin-1 und bewirkt ein verändertes Wachstum kommissuraler Axone (Palmesino et al., 2012). So können einzelne Moleküle ein solch komplexes und zellautonomes System modular beeinflussen.

Der Effekt, der durch den *ncam1b*-Knockdown verursacht wird, erinnert an Defekte in DSCAM-Knockout Mäusen (Fuerst et al., 2009; Hutchinson et al., 2014) und *dscam*-Knockdown in Zebrafischen (Yimlamai et al., 2005). Dscam könnte ein potentieller Interaktionspartner von Ncam1b sein. Auch Tag-1 könnte an einem Ncam1b-abhängigen Signalweg beteiligt sein, der die *self-avoidance* vermittelt und synergetisch steuert. Die molekularen Grundlagen dafür, dass sie miteinander interagieren können ist sowohl in Ratten beschrieben (Milev et al., 1996) als auch in der vorliegenden Arbeit für Zebrafisch Tag-1/Ncam1b-Interaktion gezeigt worden.

Die Teleostei haben vor etwa 320 – 350 Millionen Jahren eine zusätzliche Genomduplikation in ihrer Entwicklung erfahren (Glasauer & Neuhauss, 2014). Es ist sicher, dass die Genomduplikation dazu beigetragen hat, dass sich die Teleostei zu einer sehr komplexen Klasse entwickelt haben (Übersichtsartikel: Glasauer & Neuhauss, 2014). Welche Vorteile sich den Fischen bietet, beide Ncam1-Paraloge zu behalten, kann nicht abschließend geklärt werden. Ncam1a und Ncam1b haben neben einem nur teilweise überlappenden Expressionsmuster sehr große funktionelle Unterschiede in der Entwicklung des Nervensystems und im Speziellen der Ausbildung motoneuronaler Verbindungen.

Ncam1a unterstützt die Faszikulation der Motoraxone. Dies stellt eine strukturelle Fortsetzung der Neuritogenese dar. Faszikulation ist durch das Auftreten auswachsender Neuriten bedingt. Ncam1b ist an der Wegfindung beteiligt. Eine Funktion bei der *self-avoidance*, wie sie für Ncam1b im Zebrafisch hier diskutiert wird, ist bisher für NCAM1 im Säuger noch nicht beschrieben worden. Es

könnte sein, dass Ncam1b diese Rolle als Neofunktionalisierung nach der Genomduplikation erworben hat. Alternativ könnte es sich um eine Funktion handeln, die schon das singuläre Ncam1 des Vorfahren der Teleostier und der Tetrapoden hatte, die nur bisher für das NCAM1 der Tetrapoden noch nicht nachgewiesen werden konnte. Ncam1a hätte diese Funktion nach der Genomduplikation dann verloren. Die Aufteilung von wichtigen Funktionen, die ein NCAM1-Vorläufer hatte, auf zwei Paraloge in den Teleostiern würde erklären, warum beide, Ncam1a und Ncam1b, in der Evolution erhalten geblieben sind.

#### 5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Subfunktionalisierung der Ncam1-Paraloge in der motoneuronalen Entwicklung des Zebrafischs. Es wurden dafür die Expression rekombinanter Proteine und die Primärzellkultur von Motoneuronen aus Zebrafischembryonen etabliert. Außerdem konnten eine Reihe von Assays entwickelt werden, die es ermöglichten Protein-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. Es konnten phänotypische Kategorien erstellt werden, um die Funktionen der Paraloge *in situ* und *in vitro* beschreiben zu können. Es wurde gezeigt, dass beide Paraloge homophil und heterophil miteinander interagieren können. Gemeinsam ist beiden Paralogen auch, dass sie mit polySia modifiziert werden können. Diese Modifikation beeinträchtigt aber nur die Ncam1a Bindung. polySia-Ncam1b kann homophil in Wechselwirkung treten. Als Interaktionspartner konnte Neurolin für Ncam1a und Ncam1b identifiziert werden. Tag-1 ist ausschließlich ein Interaktionspartner von Ncam1b. Funktionelle Unterschiede zeigten sich deutlich im Bilden und Auswachsen von Axonen sowie in der Wegfindung. Neuritogenese und axonale Faszikulation sind Prozesse, denen Ncam1a zuteil wird. Ncam1b steuert Prozesse wie axonale Wegfindung und die damit verbundene *self-avoidance*.

Es war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich einen Interaktionspartner für Ncam1b zu identifizieren, der an axonaler Wegfindung und *self-avoidance* beteiligt ist. In diesem Zusammenhang sollten Dscam und Protocadherine näher betrachtet werden.

## Literatur

- Acheson, A., J. L. Sunshine & U. Rutishauser (1991). „NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions“. In: *J. Cell Biol.* 114.1, S. 143–153. [PubMed:2050739]
- Alenius, M. & S. Bohm (1997). „Identification of a novel neural cell adhesion molecule-related gene with a potential role in selective axonal projection“. In: *J. Biol. Chem.* 272.42, S. 26083–26086. [PubMed:9334170]
- Aman, A. & T. Piotrowski (2008). „Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression“. In: *Dev. Cell* 15.5, S. 749–761. [PubMed:19000839]
- Andersen, S. S. (2001). „Preparation of dissociated zebrafish spinal neuron cultures“. In: *Methods Cell Sci* 23.4, S. 205–209. [PubMed:12486331]
- Angata, K. & M. Fukuda (2003). „Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule“. In: *Biochimie* 85.1-2, S. 195–206. [PubMed:12765789]
- Angata, K., J. Nakayama, B. Fredette, K. Chong, B. Ranscht & M. Fukuda (1997). „Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST“. In: *J. Biol. Chem.* 272.11, S. 7182–7190. [PubMed:9054414]
- Aonurm-Helm, A., V. Berezin, E. Bock & A. Zharkovsky (2010). „NCAM-mimetic, FGL peptide, restores disrupted fibroblast growth factor receptor (FGFR) phosphorylation and FGFR mediated signaling in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice“. In: *Brain Res.* 1309, S. 1–8. [PubMed:19909731]
- Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari & R. L. Juliano (1998). „Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins“. In: *Pharmacol. Rev.* 50.2, S. 197–263. [PubMed:9647866]
- Baeriswyl, T. & E. T. Stoeckli (2008). „Axonin-1/TAG-1 is required for pathfinding of granule cell axons in the developing cerebellum“. In: *Neural Dev* 3, S. 7. [PubMed:18346270]
- Balak, K., M. Jacobson, J. Sunshine & U. Rutishauser (1987). „Neural cell adhesion molecule expression in *Xenopus* embryos“. In: *Dev. Biol.* 119.2, S. 540–550. [PubMed:3542639]
- Barbeau, D., J. J. Liang, Y. Robitaille, R. Quirion & L. K. Srivastava (1995). „Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92.7, S. 2785–2789. [PubMed:7708724]
- Barclay, A. N. (2003). „Membrane proteins with immunoglobulin-like domains—a master superfamily of interaction molecules“. In: *Semin. Immunol.* 15.4, S. 215–223. [PubMed:14690046]
- Barthels, D., M. J. Santoni, W. Wille, C. Ruppert, J. C. Chaix, M. R. Hirsch, J. C. Fontecilla-Camps & C. Goridis (1987). „Isolation and nucleotide sequence of mouse NCAM cDNA that codes for a Mr 79,000 polypeptide without a membrane-spanning region“. In: *EMBO J.* 6.4, S. 907–914. [PubMed:3595563]
- Barthels, D., G. Vopper & W. Wille (1988). „NCAM-180, the large isoform of the neural cell adhesion molecule of the mouse, is encoded by an alternatively spliced transcript“. In: *Nucleic Acids Res.* 16.10, S. 4217–4225. [PubMed:2454455]
- Bashaw, G. J. & R. Klein (2010). „Signaling from axon guidance receptors“. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.5, a001941. [PubMed:20452961]
- Bate, C. M. (1976). „Pioneer neurons in an insect embryo“. In: *Nature* 260.5546, S. 54–56. [PubMed:1264194]
- Beattie, C. E. (2000). „Control of motor axon guidance in the zebrafish embryo“. In: *Brain Res. Bull.* 53.5, S. 489–500. [PubMed:11165784]

- Becker, C. G., A. Artola, R. Gerardy-Schahn, T. Becker, H. Welzl & M. Schachner (1996). „The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation“. In: *J. Neurosci. Res.* 45.2, S. 143–152. [PubMed:8843031]
- Bonner, J. & T. P. O'Connor (2001). „The permissive cue laminin is essential for growth cone turning in vivo“. In: *J. Neurosci.* 21.24, S. 9782–9791
- Bowen, M. A., D. D. Patel, X. Li, B. Modrell, A. R. Malacko, W. C. Wang, H. Marquardt, M. Neubauer, J. M. Pesando & U. Francke (1995). „Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand“. In: *J. Exp. Med.* 181.6, S. 2213–2220. [PubMed:7760007]
- Brummendorf, T. & F. G. Rathjen (1996). „Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily“. In: *Curr. Opin. Neurobiol.* 6.5, S. 584–593. [PubMed:8937821]
- Buchstaller, A., S. Kunz, P. Berger, B. Kunz, U. Ziegler, C. Rader & P. Sonderegger (1996). „Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion“. In: *J. Cell Biol.* 135.6 Pt 1, S. 1593–1607. [PubMed:8978825]
- Bull, C., M. A. Stoel, M. H. den Brok & G. J. Adema (2014). „Sialic acids sweeten a tumor's life“. In: *Cancer Res.* 74.12, S. 3199–3204. [PubMed:24830719]
- Burns, F. R., S. von Kannen, L. Guy, J. A. Raper, J. Kamholz & S. Chang (1991). „DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension“. In: *Neuron* 7.2, S. 209–220. [PubMed:1873027]
- Büttner, B., C. Kannicht, W. Reutter & R. Horstkorte (2003). „The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton“. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310.3, S. 967–971. [PubMed:14550299]
- Cavallaro, U., J. Niedermeyer, M. Fuxa & G. Christofori (2001). „N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling“. In: *Nat. Cell Biol.* 3.7, S. 650–657. [PubMed:11433297]
- Chen, Z., H. Lee, S. J. Henle, T. R. Cheever, S. C. Ekker & J. R. Henley (2013). „Primary neuron culture for nerve growth and axon guidance studies in zebrafish (*Danio rerio*)“. In: *PLoS ONE* 8.3, e57539. [PubMed:23469201]
- Chitnis, A. B. & J. Y. Kuwada (1990). „Axonogenesis in the brain of zebrafish embryos“. In: *J. Neurosci.* 10.6, S. 1892–1905. [PubMed:2355256]
- Chitnis, A. B., D. D. Nogare & M. Matsuda (2012). „Building the posterior lateral line system in zebrafish“. In: *Dev Neurobiol* 72.3, S. 234–255. [PubMed:21818862]
- Chitnis, A. B., C. K. Patel, S. Kim & J. Y. Kuwada (1992). „A specific brain tract guides follower growth cones in two regions of the zebrafish brain“. In: *J. Neurobiol.* 23.7, S. 845–854. [PubMed:1431848]
- Chuong, C. M., D. A. McClain, P. Streit & G. M. Edelman (1982). „Neural cell adhesion molecules in rodent brains isolated by monoclonal antibodies with cross-species reactivity“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79.13, S. 4234–4238. [PubMed:7051008]
- Clark, P., S. Britland & P. Connolly (1993). „Growth cone guidance and neuron morphology on micropatterned laminin surfaces“. In: *J. Cell. Sci.* 105 ( Pt 1), S. 203–212. [PubMed:8360274]
- Close, B. E. & K. J. Colley (1998). „In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX“. In: *J. Biol. Chem.* 273.51, S. 34586–34593. [PubMed:9852130]
- Cole, G. J. & M. Schachner (1987). „Localization of the L2 monoclonal antibody binding site on chicken neural cell adhesion molecule (NCAM) and evidence for its role in NCAM-mediated cell adhesion“. In: *Neurosci. Lett.* 78.2, S. 227–232. [PubMed:2442678]
- Colley, K. J., K. Kitajima & C. Sato (2014). „Polysialic acid: biosynthesis, novel functions and applications“. In: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49.6, S. 498–532. [PubMed:25373518]

- Cox, E. T., L. H. Brenneman, K. L. Gable, R. M. Hamer, L. A. Glantz, A. S. Lamantia, J. A. Lieberman, J. H. Gilmore, P. F. Maness & L. F. Jarskog (2009). „Developmental regulation of neural cell adhesion molecule in human prefrontal cortex“. In: *Neuroscience* 162.1, S. 96–105. [PubMed:19393299]
- Cremer, H., G. Chazal, C. Goridis & A. Represa (1997). „NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus“. In: *Mol. Cell. Neurosci.* 8.5, S. 323–335. [PubMed:9073395]
- Cremer, H., R. Lange, A. Christoph, M. Plomann, G. Vopper, J. Roes, R. Brown, S. Baldwin, P. Kraemer & S. Scheff (1994). „Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning“. In: *Nature* 367.6462, S. 455–459
- Crossin, K. L. & L. A. Krushel (2000). „Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily“. In: *Dev. Dyn.* 218.2, S. 260–279. [PubMed:10842356]
- Curreli, S., Z. Arany, R. Gerardy-Schahn, D. Mann & N. M. Stamatatos (2007). „Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions“. In: *J. Biol. Chem.* 282.42, S. 30346–30356. [PubMed:17699524]
- DeBernardo, A. P. & S. Chang (1995). „Native and recombinant DM-GRASP selectively support neurite extension from neurons that express GRASP“. In: *Dev. Biol.* 169.1, S. 65–75. [PubMed:7750658]
- (1996). „Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension“. In: *J. Cell Biol.* 133.3, S. 657–666
- El-Deeb, S., S. C. Thompson & J. Covault (1992). „Characterization of a cell surface adhesion molecule expressed by a subset of developing chick neurons“. In: *Dev. Biol.* 149.1, S. 213–227. [PubMed:1728591]
- Denaxa, M., C. H. Chan, M. Schachner, J. G. Parnavelas & D. Karagogeos (2001). „The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system“. In: *Development* 128.22, S. 4635–4644. [PubMed:11714688]
- Denzinger, T., H. Diekmann, K. Bruns, U. Laessing, C. A. Stuermer & M. Przybylski (1999). „Isolation, primary structure characterization and identification of the glycosylation pattern of recombinant goldfish neurolin, a neuronal cell adhesion protein“. In: *J Mass Spectrom* 34.4, S. 435–446. [PubMed:10226368]
- Dickson, B. J. (2002). „Molecular mechanisms of axon guidance“. In: *Science* 298.5600, S. 1959–1964. [PubMed:12471249]
- Diekmann, H. & C. A. Stuermer (2009). „neurolin-a and -b, orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding“. In: *J. Comp. Neurol.* 513.1, S. 38–50. [PubMed:19107846]
- Dodd, J., S. B. Morton, D. Karagogeos, M. Yamamoto & T. M. Jessell (1988). „Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons“. In: *Neuron* 1.2, S. 105–116. [PubMed:3272160]
- Doherty, P., C. H. Barton, G. Dickson, P. Seaton, L. H. Rowett, S. E. Moore, H. J. Gower & F. S. Walsh (1989). „Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms“. In: *J. Cell Biol.* 109.2, S. 789–798. [PubMed:2760112]
- Dona, E., J. D. Barry, G. Valentin, C. Quirin, A. Khmelinskii, A. Kunze, S. Durdu, L. R. Newton, A. Fernandez-Minan, W. Huber, M. Knop & D. Gilmour (2013). „Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient“. In: *Nature* 503.7475, S. 285–289. [PubMed:24067609]
- Eckhardt, M., O. Bukalo, G. Chazal, L. Wang, C. Goridis, M. Schachner, R. Gerardy-Schahn, H. Cremer & A. Dityatev (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“. In: *J. Neurosci.* 20.14, S. 5234–5244. [PubMed:10884307]



- Eckhardt, M., M. Mühlenhoff, A. Bethe, J. Koopman, M. Frosch & R. Gerardy-Schahn (1995). „Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1“. In: *Nature* 373.6516, S. 715–718. [PubMed:7854457]
- Edelman, G. M. (1983). „Cell adhesion molecules“. In: *Science* 219.4584, S. 450–457. [PubMed:6823544]
- Edelman, G. M. & C. M. Chuong (1982). „Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79.22, S. 7036–7040. [PubMed:6960362]
- Edgar, D., R. Timpl & H. Thoenen (1984). „The heparin-binding domain of laminin is responsible for its effects on neurite outgrowth and neuronal survival“. In: *EMBO J.* 3.7, S. 1463–1468. [PubMed:6745238]
- Eisen, J. S. (1991). „Determination of primary motoneuron identity in developing zebrafish embryos“. In: *Science* 252.5005, S. 569–572. [PubMed:1708527]
- (1994). „Development of motoneuronal phenotype“. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 17, S. 1–30. [PubMed:8210171]
- (1998). „Genetic and molecular analyses of motoneuron development“. In: *Curr. Opin. Neurobiol.* 8.6, S. 697–704. [PubMed:9914246]
- Eisen, J. S., P. Z. Myers & M. Westerfield (1986). „Pathway selection by growth cones of identified motoneurons in live zebra fish embryos“. In: *Nature* 320.6059, S. 269–271. [PubMed:3960108]
- Eisen, J. S., S. H. Pike & B. Debu (1989). „The growth cones of identified motoneurons in embryonic zebrafish select appropriate pathways in the absence of specific cellular interactions“. In: *Neuron* 2.1, S. 1097–1104. [PubMed:2624743]
- Eisen, J. S., S. H. Pike & B. Romancier (1990). „An identified motoneuron with variable fates in embryonic zebrafish“. In: *J. Neurosci.* 10.1, S. 34–43. [PubMed:2299397]
- Fashena, D. & M. Westerfield (1999). „Secondary motoneuron axons localize DM-GRASP on their fasciculated segments“. In: *J. Comp. Neurol.* 406.3, S. 415–424. [PubMed:10102505]
- Felsenfeld, D. P., M. A. Hynes, K. M. Skoler, A. J. Furley & T. M. Jessell (1994). „TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins“. In: *Neuron* 12.3, S. 675–690. [PubMed:7512353]
- Ferrier, D. E., N. M. Brooke, G. Panopoulou & P. W. Holland (2001). „The Mnx homeobox gene class defined by HB9, MNR2 and amphioxus *AmphiMnx*“. In: *Dev. Genes Evol.* 211.2, S. 103–107. [PubMed:11455421]
- Flanagan-Steet, H., M. A. Fox, D. Meyer & J. R. Sanes (2005). „Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations“. In: *Development* 132.20, S. 4471–4481. [PubMed:16162647]
- Frosch, M., I. Gorgen, G. J. Boulnois, K. N. Timmis & D. Bitter-Suermann (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“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82.4, S. 1194–1198. [PubMed:3919387]
- Fuerst, P. G., F. Bruce, M. Tian, W. Wei, J. Elstrott, M. B. Feller, L. Erskine, J. H. Singer & R. W. Burgess (2009). „DSCAM and DSCAML1 function in self-avoidance in multiple cell types in the developing mouse retina“. In: *Neuron* 64.4, S. 484–497. [PubMed:19945391]
- Fuerst, P. G., A. Koizumi, R. H. Masland & R. W. Burgess (2008). „Neurite arborization and mosaic spacing in the mouse retina require DSCAM“. In: *Nature* 451.7177, S. 470–474. [PubMed:18216855]
- Furley, A. J., S. B. Morton, D. Manalo, D. Karagogeos, J. Dodd & T. M. Jessell (1990). „The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity“. In: *Cell* 61.1, S. 157–170. [PubMed:2317872]



- Galuska, S. P., M. Rollenhagen, M. Kaup, K. Eggers, I. Oltmann-Norden, M. Schiff, M. Hartmann, B. Weinhold, H. Hildebrandt, R. Geyer, M. Mühlenhoff & H. Geyer (2010). „Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107.22, S. 10250–10255. [PubMed:20479255]
- Galve-Roperh, I., V. Chiurciu, J. Diaz-Alonso, M. Bari, M. Guzman & M. Maccarrone (2013). „Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation“. In: *Prog. Lipid Res.* 52.4, S. 633–650. [PubMed:24076098]
- Garcia-Alonso, L., M. F. VanBerkum, G. Grenningloh, C. Schuster & C. S. Goodman (1995). „Fasciclin II controls proneural gene expression in *Drosophila*“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92.23, S. 10501–10505. [PubMed:7479828]
- García-Pena, C. M., M. Kim, D. Frade-Pérez, D. Ávila-González, E. Téllez, G. S. Mastick, E. Tamariz & A. Varela-Echavarría (2014). „Ascending midbrain dopaminergic axons require descending GAD65 axon fascicles for normal pathfinding“. In: *Front Neuroanat* 8, S. 43. [PubMed:24926237]
- Gibson, D. A., S. Tymanskyj, R. C. Yuan, H. C. Leung, J. L. Lefebvre, J. R. Sanes, A. Chedotal & L. Ma (2014). „Dendrite self-avoidance requires cell-autonomous slit/robo signaling in cerebellar purkinje cells“. In: *Neuron* 81.5, S. 1040–1056. [PubMed:24607227]
- Glasauer, S. M. & S. C. Neuhauss (2014). „Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences“. In: *Mol. Genet. Genomics* 289.6, S. 1045–1060. [PubMed:25092473]
- Grumet, M., U. Rutishauser & G. M. Edelman (1982). „Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells in vitro“. In: *Nature* 295.5851, S. 693–695. [PubMed:6173773]
- Haffter, P., M. Granato, M. Brand, M. C. Mullins, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, J. Odenthal, F. J. van Eeden, Y. J. Jiang, C. P. Heisenberg, R. N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian & C. Nusslein-Volhard (1996). „The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*“. In: *Development* 123, S. 1–36. [PubMed:9007226]
- Harduin-Lepers, A., R. Mollicone, P. Delannoy & R. Oriol (2005). „The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach“. In: *Glycobiology* 15.8, S. 805–817. [PubMed:15843597]
- Heiland, P. C., L. S. Griffith, R. Lange, M. Schachner, B. Hertlein, O. Traub & B. Schmitz (1998). „Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth“. In: *Eur. J. Cell Biol.* 75.2, S. 97–106. [PubMed:9548367]
- Heiny, Sebastian (2012). „Untersuchungen zur Funktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM während der Entwicklung des Seitenlinienorgans in *Danio rerio*“. Masterarbeit. Karlsruher Institut für Technologie
- Hemperly, J. J., J. K. DeGuglielmo & R. A. Reid (1990). „Characterization of cDNA clones defining variant forms of human neural cell adhesion molecule N-CAM“. In: *J. Mol. Neurosci.* 2.2, S. 71–78. [PubMed:2078478]
- Hemperly, J. J., G. M. Edelman & B. A. Cunningham (1986). „cDNA clones of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83.24, S. 9822–9826. [PubMed:3467341]
- Hildebrandt, H. & A. Dityatev (2015). „Polysialic Acid in Brain Development and Synaptic Plasticity“. In: *Top Curr Chem* 366, S. 55–96. [PubMed:23715636]
- Hildebrandt, H., M. Mühlenhoff, B. Weinhold & R. Gerardy-Schahn (2007). „Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development“. In: *J. Neurochem.* 103 Suppl 1, S. 56–64. [PubMed:17986140]

- Hinkle, C. L., S. Diestel, J. Lieberman & P. F. Maness (2006). „Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM)“. In: *J. Neurobiol.* 66.12, S. 1378–1395. [PubMed:16967505]
- Homrich, M., I. Gotthard, H. Wobst & S. Diestel (2016). „Cell Adhesion Molecules and Ubiquitination-Functions and Significance“. In: *Biology (Basel)* 5.1, [PubMed:26703751]
- Horstkorte, R., M. Schachner, J. P. Magyar, T. Vorherr & B. Schmitz (1993). „The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth“. In: *J. Cell Biol.* 121.6, S. 1409–1421. [PubMed:8509458]
- Hu, W., R. N. Rosenberg & O. Stuve (2007). „Prion proteins: a biological role beyond prion diseases“. In: *Acta Neurol. Scand.* 116.2, S. 75–82. [PubMed:17661791]
- Hutchinson, K. M., F. Vonhoff & C. Duch (2014). „Dscam1 is required for normal dendrite growth and branching but not for dendritic spacing in *Drosophila* motoneurons“. In: *J. Neurosci.* 34.5, S. 1924–1931. [PubMed:24478371]
- Hynes, R. O. (2002). „Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines“. In: *Cell* 110.6, S. 673–687. [PubMed:12297042]
- Jessell, T. M. (2000). „Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes“. In: *Nat. Rev. Genet.* 1.1, S. 20–29. [PubMed:11262869]
- Johnson, C. P., I. Fujimoto, U. Rutishauser & D. E. Leckband (2005). „Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion“. In: *J. Biol. Chem.* 280.1, S. 137–145. [PubMed:15504723]
- Jorgensen, O. S. & E. Bock (1974). „Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis“. In: *J. Neurochem.* 23.4, S. 879–880. [PubMed:4430927]
- Juliano, R. L. (2002). „Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members“. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, S. 283–323. [PubMed:11807174]
- Kadmon, G., A. Kowitz, P. Altevogt & M. Schachner (1990). „The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions“. In: *J. Cell Biol.* 110.1, S. 193–208. [PubMed:2295682]
- Kambara, Y., K. Shiba, M. Yoshida, C. Sato, K. Kitajima & C. Shingyoji (2011). „Mechanism regulating Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanosensory behaviour in sea urchin spermatozoa“. In: *Cell Struct. Funct.* 36.1, S. 69–82. [PubMed:21358125]
- Kanato, Y., K. Kitajima & C. Sato (2008). „Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization“. In: *Glycobiology* 18.12, S. 1044–1053. [PubMed:18796648]
- Karagogeos, D., S. B. Morton, F. Casano, J. Dodd & T. M. Jessell (1991). „Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro“. In: *Development* 112.1, S. 51–67. [PubMed:1769341]
- Kasper, C., H. Rasmussen, J. S. Kastrup, S. Ikemizu, E. Y. Jones, V. Berezin, E. Bock & I. K. Larsen (2000). „Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM“. In: *Nat. Struct. Biol.* 7.5, S. 389–393. [PubMed:10802736]
- Kempen, L. C. van, J. M. Nelissen, W. G. Degen, R. Torensma, U. H. Weidle, H. P. Bloemers, C. G. Figdor & G. W. Swart (2001). „Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction“. In: *J. Biol. Chem.* 276.28, S. 25783–25790. [PubMed:11306570]
- Kimmel, C. B., R. M. Warga & D. A. Kane (1994). „Cell cycles and clonal strings during formation of the zebrafish central nervous system“. In: *Development* 120.2, S. 265–276. [PubMed:8149908]

- Kise, Y. & D. Schmucker (2013). „Role of self-avoidance in neuronal wiring“. In: *Curr. Opin. Neurobiol.* 23.6, S. 983–989. [PubMed:24161734]
- Kiselyov, V. V., V. Berezin, T. E. Maar, V. Soroka, K. Edvardsen, A. Schousboe & E. Bock (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“. In: *J. Biol. Chem.* 272.15, S. 10125–10134. [PubMed:9092558]
- Kiselyov, V. V., V. Soroka, V. Berezin & E. Bock (2005). „Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR“. In: *J. Neurochem.* 94.5, S. 1169–1179. [PubMed:16045455]
- Kolkova, K. (2010). „Biosynthesis of NCAM“. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 663, S. 213–225. [PubMed:20017025]
- Kolkova, K., V. Novitskaya, N. Pedersen, V. Berezin & E. Bock (2000). „Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway“. In: *J. Neurosci.* 20.6, S. 2238–2246. [PubMed:10704499]
- Kramer, A. P. & J. Y. Kuwada (1983). „Formation of the receptive fields of leech mechanosensory neurons during embryonic development“. In: *J. Neurosci.* 3.12, S. 2474–2486. [PubMed:6317810]
- Kuhn, T. B., E. T. Stoeckli, M. A. Condrau, F. G. Rathjen & P. Sonderegger (1991). „Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4)“. In: *J. Cell Biol.* 115.4, S. 1113–1126. [PubMed:1720120]
- Kunz, B., R. Lierheimer, C. Rader, M. Spirig, U. Ziegler & P. Sonderegger (2002). „Axonin-1/TAG-1 mediates cell-cell adhesion by a cis-assisted trans-interaction“. In: *J. Biol. Chem.* 277.6, S. 4551–4557. [PubMed:11733523]
- Kuwada, J. Y. (1986). „Cell recognition by neuronal growth cones in a simple vertebrate embryo“. In: *Science* 233.4765, S. 740–746. [PubMed:3738507]
- Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. In: *Nature* 227.5259, S. 680–685. [PubMed:5432063]
- Laessing, U., S. Giordano, B. Stecher, F. Lottspeich & C. A. Stuermer (1994). „Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN“. In: *Differentiation* 56.1-2, S. 21–29. [PubMed:8026643]
- Landmesser, L., L. Dahm, J. C. Tang & U. Rutishauser (1990). „Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development“. In: *Neuron* 4.5, S. 655–667. [PubMed:2344405]
- Lang, D. M., J. T. Warren, C. Klisa & C. A. Stuermer (2001). „Topographic restriction of TAG-1 expression in the developing retinotectal pathway and target dependent reexpression during axon regeneration“. In: *Mol. Cell. Neurosci.* 17.2, S. 398–414. [PubMed:11178876]
- Langhauser, M. (2012). „Expressionsregulation, Glykosylierung und Funktion von Zelladhäsionsmolekülen der NCAM-Familie im Zebrafischembryo“. Dissertation. Karlsruhe Institut für Technologie
- Langhauser, M., J. Ustinova, E. Rivera-Milla, D. Ivannikov, C. Seidl, C. Slomka, J. Finne, Y. Yoshihara, M. Bastmeyer & J. Bontrop (2012). „Ncam1a and Ncam1b: two carriers of polysialic acid with different functions in the developing zebrafish nervous system“. In: *Glycobiology* 22.2, S. 196–209. [PubMed:21890892]
- Lasky, L. A. (1995). „Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response“. In: *Annu. Rev. Biochem.* 64, S. 113–139. [PubMed:7574477]
- Lefebvre, J. L., D. Kostadinov, W. V. Chen, T. Maniatis & J. R. Sanes (2012). „Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system“. In: *Nature* 488.7412, S. 517–521. [PubMed:22842903]

- Leshchyns'ka, I., V. Sytnyk, J. S. Morrow & M. Schachner (2003). „Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC $\beta$ 2 via  $\beta$ 2 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth“. In: *J. Cell Biol.* 161.3, S. 625–639. [PubMed:12743109]
- Li, Q., K. Shirabe & J. Y. Kuwada (2004). „Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish“. In: *Dev. Biol.* 269.1, S. 123–136. [PubMed:15081362]
- Lin, J. F., H. C. Pan, L. P. Ma, Y. Q. Shen & M. Schachner (2012). „The cell neural adhesion molecule contactin-2 (TAG-1) is beneficial for functional recovery after spinal cord injury in adult zebrafish“. In: *PLoS ONE* 7.12, e52376. [PubMed:23285014]
- Liu, Y. & M. C. Halloran (2005). „Central and peripheral axon branches from one neuron are guided differentially by Semaphorin3D and transient axonal glycoprotein-1“. In: *J. Neurosci.* 25.45, S. 10556–10563. [PubMed:16280593]
- Lowery, L. A. & D. Van Vactor (2009). „The trip of the tip: understanding the growth cone machinery“. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10.5, S. 332–343. [PubMed:19373241]
- Luckenbill-Edds, L. (1997). „Laminin and the mechanism of neuronal outgrowth“. In: *Brain Res. Brain Res. Rev.* 23.1-2, S. 1–27. [PubMed:9063584]
- Main, A. L., T. S. Harvey, M. Baron, J. Boyd & I. D. Campbell (1992). „The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions“. In: *Cell* 71.4, S. 671–678. [PubMed:1423622]
- Maness, P. F. & M. Schachner (2007). „Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration“. In: *Nat. Neurosci.* 10.1, S. 19–26. [PubMed:17189949]
- Manthorpe, M., E. Engvall, E. Ruoslahti, F. M. Longo, G. E. Davis & S. Varon (1983). „Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons“. In: *J. Cell Biol.* 97.6, S. 1882–1890. [PubMed:6643580]
- Marx, M. (2002). „Synthese, Expressionsmuster und Funktion von Polysialinsäure (PSA) während der Entwicklung des Nervensystems im Zebrafischembryo“. Dissertation. Universität Konstanz
- Marx, M., E. Rivera-Milla, K. Stummeyer, R. Gerardy-Schahn & M. Bastmeyer (2007). „Divergent evolution of the vertebrate polysialyltransferase Stx and Pst genes revealed by fish-to-mammal comparison“. In: *Dev. Biol.* 306.2, S. 560–571. [PubMed:17462622]
- Marx, M., U. Rutishauser & M. Bastmeyer (2001). „Dual function of polysialic acid during zebrafish central nervous system development“. In: *Development* 128.24, S. 4949–4958. [PubMed:11748132]
- Matthews, B. J., M. E. Kim, J. J. Flanagan, D. Hattori, J. C. Clemens, S. L. Zipursky & W. B. Grueber (2007). „Dendrite self-avoidance is controlled by Dscam“. In: *Cell* 129.3, S. 593–604. [PubMed:17482551]
- Maurer, M. F., U. Garrigues, S. R. Jaspers, B. Meengs, M. W. Rixon, B. L. Stevens, K. B. Lewis, S. H. Julien, T. R. Bukowski, A. C. Wolf, N. B. Hamacher, M. Snively & S. R. Dillon (2012). „Generation and characterization of human anti-human IL-21 neutralizing monoclonal antibodies“. In: *MAbs* 4.1, S. 69–83. [PubMed:22327431]
- McWhorter, M. L., U. R. Monani, A. H. Burghes & C. E. Beattie (2003). „Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding“. In: *J. Cell Biol.* 162.5, S. 919–931. [PubMed:12952942]
- Milev, P., P. Maurel, M. Haring, R. K. Margolis & R. U. Margolis (1996). „TAG-1/axonin-1 is a high-affinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/ $\beta$ , and N-CAM“. In: *J. Biol. Chem.* 271.26, S. 15716–15723. [PubMed:8663515]
- Miyasaka, N., Y. Sato, S. Y. Yeo, L. D. Hutson, C. B. Chien, H. Okamoto & Y. Yoshihara (2005). „Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system“. In: *Development* 132.6, S. 1283–1293. [PubMed:15716341]



- Mizuno, T., M. Kawasaki, M. Nakahira, H. Kagamiyama, Y. Kikuchi, H. Okamoto, K. Mori & Y. Yoshihara (2001). „Molecular diversity in zebrafish NCAM family: three members with different VASE usage and distinct localization“. In: *Mol. Cell. Neurosci.* 18.1, S. 119–130. [PubMed:11461158]
- Montesinos, M. L. (2014). „Roles for DSCAM and DSCAML1 in central nervous system development and disease“. In: *Adv Neurobiol* 8, S. 249–270. [PubMed:25300140]
- Moreno, R. L. & A. B. Ribera (2009). „Zebrafish motor neuron subtypes differ electrically prior to axonal outgrowth“. In: *J. Neurophysiol.* 102.4, S. 2477–2484. [PubMed:19692510]
- Mortl, M., P. Sonderegger, K. Diederichs & W. Welte (2007). „The crystal structure of the ligand-binding module of human TAG-1 suggests a new mode of homophilic interaction“. In: *Protein Sci.* 16.10, S. 2174–2183. [PubMed:17766378]
- Mühlenhoff, M., M. Eckhardt, A. Bethe, M. Frosch & R. Gerardy-Schahn (1996). „Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1“. In: *EMBO J.* 15.24, S. 6943–6950. [PubMed:9003770]
- Myers, J. P., M. Santiago-Medina & T. M. Gomez (2011). „Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions“. In: *Dev Neurobiol* 71.11, S. 901–923. [PubMed:21714101]
- Myers, P. Z. (1985). „Spinal motoneurons of the larval zebrafish“. In: *J. Comp. Neurol.* 236.4, S. 555–561. [PubMed:4056102]
- Myers, P. Z., J. S. Eisen & M. Westerfield (1986). „Development and axonal outgrowth of identified motoneurons in the zebrafish“. In: *J. Neurosci.* 6.8, S. 2278–2289. [PubMed:3746410]
- Nagaraj, K. & M. Hortsch (2006). „Phosphorylation of L1-type cell-adhesion molecules–ankyrins away!“ In: *Trends Biochem. Sci.* 31.10, S. 544–546. [PubMed:16904324]
- Nakata, D. & F. A. Troy (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“. In: *J. Biol. Chem.* 280.46, S. 38305–38316. [PubMed:16172115]
- Nelson, R. W., P. A. Bates & U. Rutishauser (1995). „Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule“. In: *J. Biol. Chem.* 270.29, S. 17171–17179. [PubMed:7615513]
- Nguyen, C., M. G. Mattei, J. F. Mattei, M. J. Santoni, C. Goridis & B. R. Jordan (1986). „Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11“. In: *J. Cell Biol.* 102.3, S. 711–715. [PubMed:2869046]
- Nielsen, J., N. Kulahin & P. S. Walmod (2010). „Extracellular protein interactions mediated by the neural cell adhesion molecule, NCAM: heterophilic interactions between NCAM and cell adhesion molecules, extracellular matrix proteins, and viruses“. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 663, S. 23–53. [PubMed:20017013]
- Niethammer, P., M. Delling, V. Sytnyk, A. Dityatev, K. Fukami & M. Schachner (2002). „Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis“. In: *J. Cell Biol.* 157.3, S. 521–532. [PubMed:11980923]
- Noble, M., M. Albrechtsen, C. Møller, J. Lyles, E. Bock, C. Goridis, M. Watanabe & U. Rutishauser (1985). „Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro“. In: *Nature* 316.6030, S. 725–728. [PubMed:2412126]
- Ott, H. (2000). „Die Funktion von Neurolin und E587-Antigen bei der axonalen Wegfindung im Nervensystem des Gold- und Zebrafisches“. Dissertation. Universität Konstanz
- Ott, H., M. Bastmeyer & C. A. Stuermer (1998). „Neurolin, the goldfish homolog of DM-GRASP, is involved in retinal axon pathfinding to the optic disk“. In: *J. Neurosci.* 18.9, S. 3363–3372. [PubMed:9547244]

- Ott, H., H. Diekmann, C. A. Stuermer & M. Bastmeyer (2001). „Function of Neurolin (DM-GRASP/SC-1) in guidance of motor axons during zebrafish development“. In: *Dev. Biol.* 235.1, S. 86–97. [PubMed:11412029]
- Palmesino, E., P. C. Haddick, M. Tessier-Lavigne & A. Kania (2012). „Genetic analysis of DSCAM's role as a Netrin-1 receptor in vertebrates“. In: *J. Neurosci.* 32.2, S. 411–416. [PubMed:22238077]
- Panicker, A. K., M. Buhusi, K. Thelen & P. F. Maness (2003). „Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules“. In: *Front. Biosci.* 8, S. d900–911. [PubMed:12700044]
- Panter, M. S., A. Jain, R. M. Leonhardt, T. Ha & P. Cresswell (2012). „Dynamics of major histocompatibility complex class I association with the human peptide-loading complex“. In: *J. Biol. Chem.* 287.37, S. 31172–31184. [PubMed:22829594]
- Paratcha, G., F. Ledda & C. F. Ibanez (2003). „The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands“. In: *Cell* 113.7, S. 867–879. [PubMed:12837245]
- Paschke, K. A., F. Lottspeich & C. A. Stuermer (1992). „Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration“. In: *J. Cell Biol.* 117.4, S. 863–875. [PubMed:1577862]
- Pavlou, O., K. Theodorakis, J. Falk, M. Kutsche, M. Schachner, C. Faivre-Sarrailh & D. Karagozeos (2002). „Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members“. In: *Mol. Cell. Neurosci.* 20.3, S. 367–381. [PubMed:12139915]
- Pike, S. H. & J. S. Eisen (1990). „Identified primary motoneurons in embryonic zebrafish select appropriate pathways in the absence of other primary motoneurons“. In: *J. Neurosci.* 10.1, S. 44–49. [PubMed:2299400]
- Pike, S. H., E. F. Melancon & J. S. Eisen (1992). „Pathfinding by zebrafish motoneurons in the absence of normal pioneer axons“. In: *Development* 114.4, S. 825–831. [PubMed:1618146]
- Pollerberg, G. E., K. Burridge, K. E. Krebs, S. R. Goodman & M. Schachner (1987). „The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions“. In: *Cell Tissue Res.* 250.1, S. 227–236. [PubMed:3308110]
- Pollerberg, G. E. & T. G. Mack (1994). „Cell adhesion molecule SC1/DMGRASP is expressed on growing axons of retina ganglion cells and is involved in mediating their extension on axons“. In: *Dev. Biol.* 165.2, S. 670–687. [PubMed:7958430]
- Pollerberg, G. E., K. Thelen, M. O. Theiss & B. C. Hochlehnert (2013). „The role of cell adhesion molecules for navigating axons: density matters“. In: *Mech. Dev.* 130.6-8, S. 359–372. [PubMed:23183391]
- Polo-Parada, L., C. M. Bose, F. Plattner & L. T. Landmesser (2004). „Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice“. In: *J. Neurosci.* 24.8, S. 1852–1864. [PubMed:14985425]
- Polo-Parada, L., F. Plattner, C. Bose & L. T. Landmesser (2005). „NCAM 180 acting via a conserved C-terminal domain and MLCK is essential for effective transmission with repetitive stimulation“. In: *Neuron* 46.6, S. 917–931. [PubMed:15953420]
- Rader, C., E. T. Stoeckli, U. Ziegler, T. Osterwalder, B. Kunz & P. Sonderegger (1993). „Cell-cell adhesion by homophilic interaction of the neuronal recognition molecule axonin-1“. In: *Eur. J. Biochem.* 215.1, S. 133–141. [PubMed:8344273]
- Ranheim, T. S., G. M. Edelman & B. A. Cunningham (1996). „Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93.9, S. 4071–4075. [PubMed:8633018]
- Rao, Y., X. Zhao & C. H. Siu (1994). „Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. Evidence for isologous interaction“. In: *J. Biol. Chem.* 269.44, S. 27540–27548. [PubMed:7961669]

- Raper, J. A., M. Bastiani & C. S. Goodman (1983). „Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos. II. Selective fasciculation onto specific axonal pathways“. In: *J. Neurosci.* 3.1, S. 31–41. [PubMed:6822859]
- Reichardt, L. F. & K. J. Tomaselli (1991). „Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development“. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 14, S. 531–570. [PubMed:1851608]
- Reyes, A. A., S. J. Small & R. Akeson (1991). „At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development“. In: *Mol. Cell. Biol.* 11.3, S. 1654–1661. [PubMed:1996115]
- Rolf, B., M. Bastmeyer, M. Schachner & U. Bartsch (2002). „Pathfinding errors of corticospinal axons in neural cell adhesion molecule-deficient mice“. In: *J. Neurosci.* 22.19, S. 8357–8362. [PubMed:12351709]
- Rothbard, J. B., R. Brackenbury, B. A. Cunningham & G. M. Edelman (1982). „Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains“. In: *J. Biol. Chem.* 257.18, S. 11064–11069. [PubMed:6809766]
- Rougon, G. & O. Hobert (2003). „New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules“. In: *Annu. Rev. Neurosci.* 26, S. 207–238. [PubMed:12598678]
- Rutishauser, U. (1985). „Influences of the neural cell adhesion molecule on axon growth and guidance“. In: *J. Neurosci. Res.* 13.1-2, S. 123–131. [PubMed:3882971]
- (1996). „Polysialic acid and the regulation of cell interactions“. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 8.5, S. 679–684. [PubMed:8939657]
- Rutishauser, U., S. Hoffman & G. M. Edelman (1982). „Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79.2, S. 685–689. [PubMed:6952220]
- Rutishauser, U. & T. M. Jessell (1988). „Cell adhesion molecules in vertebrate neural development“. In: *Physiol. Rev.* 68.3, S. 819–857. [PubMed:3293093]
- Rutishauser, U. & L. Landmesser (1996). „Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions“. In: *Trends Neurosci.* 19.10, S. 422–427. [PubMed:8888519]
- Santoni, M. J., D. Barthels, G. Vopper, A. Boned, C. Goridis & W. Wille (1989). „Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain“. In: *EMBO J.* 8.2, S. 385–392. [PubMed:2721486]
- Santuccione, A., V. Sytnyk, I. Leshchyn's'ka & M. Schachner (2005). „Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth“. In: *J. Cell Biol.* 169.2, S. 341–354. [PubMed:15851519]
- Sato, C. & K. Kitajima (2013). „Disialic, oligosialic and polysialic acids: distribution, functions and related disease“. In: *J. Biochem.* 154.2, S. 115–136. [PubMed:23788662]
- Sato, C., K. Kitajima, I. Tazawa, Y. Inoue, S. Inoue & F. A. Troy (1993). „Structural diversity in the alpha 2->8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms“. In: *J. Biol. Chem.* 268.31, S. 23675–23684. [PubMed:8226894]
- Sauer, M. (2013). „Entwicklung eines Modells zur funktionellen Analyse von neuronalen Zell-erkennungs-molekülen mit Hilfe primärer Motoneuronen aus dem Rückenmark von Zebrafisch-embryonen“. Magisterarb. Karlsruher Institut für Technologie/Fachhochschule Kaiserslautern
- Schmucker, D. & B. Chen (2009). „Dscam and DSCAM: complex genes in simple animals, complex animals yet simple genes“. In: *Genes Dev.* 23.2, S. 147–156. [PubMed:19171779]
- Schmucker, D., J. C. Clemens, H. Shu, C. A. Worby, J. Xiao, M. Muda, J. E. Dixon & S. L. Zipursky (2000). „Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity“. In: *Cell* 101.6, S. 671–684. [PubMed:10892653]



- Schnaar, R. L., R. Gerardy-Schahn & H. Hildebrandt (2014). „Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration“. In: *Physiol. Rev.* 94.2, S. 461–518. [PubMed:24692354]
- SeGall, G. K. & W. J. Lennarz (1979). „Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction“. In: *Dev. Biol.* 71.1, S. 33–48. [PubMed:467790]
- Seidenfaden, R., A. Krauter & H. Hildebrandt (2006). „The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neuritogenesis by multiple mechanisms of interaction“. In: *Neurochem. Int.* 49.1, S. 1–11. [PubMed:16469417]
- Shin, M. H., E. G. Lee, S. H. Lee, Y. S. Lee & H. Son (2002). „Neural cell adhesion molecule (NCAM) promotes the differentiation of hippocampal precursor cells to a neuronal lineage, especially to a glutamatergic neural cell type“. In: *Exp. Mol. Med.* 34.6, S. 401–410. [PubMed:12526081]
- Singer, M., R. H. Nordlander & M. Egar (1979). „Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: the blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning“. In: *J. Comp. Neurol.* 185.1, S. 1–21. [PubMed:429610]
- Small, S. J., S. L. Haines & R. A. Akeson (1988). „Polypeptide variation in an N-CAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally regulated through alternative splicing“. In: *Neuron* 1.10, S. 1007–1017. [PubMed:2483093]
- Small, S. J., G. E. Shull, M. J. Santoni & R. Akeson (1987). „Identification of a cDNA clone that contains the complete coding sequence for a 140-kD rat NCAM polypeptide“. In: *J. Cell Biol.* 105.5, S. 2335–2345. [PubMed:3680385]
- Soroka, V., C. Kasper & F. M. Poulsen (2010). „Structural biology of NCAM“. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 663, S. 3–22. [PubMed:20017012]
- Soroka, V., K. Kolkova, J. S. Kastrup, K. Diederichs, J. Breed, V. V. Kiselyov, F. M. Poulsen, I. K. Larsen, W. Welte, V. Berezin, E. Bock & C. Kasper (2003). „Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion“. In: *Structure* 11.10, S. 1291–1301. [PubMed:14527396]
- Takeichi, M. (1990). „Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion“. In: *Annu. Rev. Biochem.* 59, S. 237–252. [PubMed:2197976]
- Tanaka, H., T. Matsui, A. Agata, M. Tomura, I. Kubota, K. C. McFarland, B. Kohr, A. Lee, H. S. Phillips & D. L. Shelton (1991). „Molecular cloning and expression of a novel adhesion molecule, SC1“. In: *Neuron* 7.4, S. 535–545. [PubMed:1931049]
- Tang, J., U. Rutishauser & L. Landmesser (1994). „Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region“. In: *Neuron* 13.2, S. 405–414. [PubMed:8060618]
- Tessier-Lavigne, M. & C. S. Goodman (1996). „The molecular biology of axon guidance“. In: *Science* 274.5290, S. 1123–1133. [PubMed:8895455]
- Thiery, J. P., R. Brackenbury, U. Rutishauser & G. M. Edelman (1977). „Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina“. In: *J. Biol. Chem.* 252.19, S. 6841–6845. [PubMed:893446]
- Thompson, C., C. H. Lin & P. Forscher (1996). „An Aplysia cell adhesion molecule associated with site-directed actin filament assembly in neuronal growth cones“. In: *J. Cell. Sci.* 109 ( Pt 12), S. 2843–2854. [PubMed:9013332]
- Traka, M., J. L. Dupree, B. Popko & D. Karagogeos (2002). „The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers“. In: *J. Neurosci.* 22.8, S. 3016–3024. [PubMed:11943804]
- Tsiotra, P. C., K. Theodorakis, J. Papamatheakis & D. Karagogeos (1996). „The fibronectin domains of the neural adhesion molecule TAX-1 are necessary and sufficient for homophilic binding“. In: *J. Biol. Chem.* 271.46, S. 29216–29222. [PubMed:8910580]

- Tsuchida, T., M. Ensini, S. B. Morton, M. Baldassare, T. Edlund, T. M. Jessell & S. L. Pfaff (1994). „Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes“. In: *Cell* 79.6, S. 957–970. [PubMed:7528105]
- Varki, A. (2008). „Sialic acids in human health and disease“. In: *Trends Mol Med* 14.8, S. 351–360. [PubMed:18606570]
- Vaughn, D. E. & P. J. Bjorkman (1996). „The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules“. In: *Neuron* 16.2, S. 261–273. [PubMed:8789942]
- Vimr, E. R., K. A. Kalivoda, E. L. Deszo & S. M. Steenbergen (2004). „Diversity of microbial sialic acid metabolism“. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68.1, S. 132–153. [PubMed:15007099]
- Vimr, E. & C. Lichtensteiger (2002). „To sialylate, or not to sialylate: that is the question“. In: *Trends Microbiol.* 10.6, S. 254–257. [PubMed:12088651]
- Vutskits, L., Z. Djebbara-Hannas, H. Zhang, J. P. Paccaud, P. Durbec, G. Rougon, D. Muller & J. Z. Kiss (2001). „PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons“. In: *Eur. J. Neurosci.* 13.7, S. 1391–1402. [PubMed:11298800]
- Walmod, P. S., K. Kolkova, V. Berezin & E. Bock (2004). „Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction“. In: *Neurochem. Res.* 29.11, S. 2015–2035. [PubMed:15662836]
- Walsh, F. S., K. Meiri & P. Doherty (1997). „Cell signalling and CAM-mediated neurite outgrowth“. In: *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 52, S. 221–226. [PubMed:9210232]
- Walter, R. (2014). „Das neuronale Zellerkennungsmolekül Ncam1b in der Entwicklung von Motoneuronen im Zebrafisch: Funktionsanalyse im Zellkultursystem“. Masterarbeit. Karlsruhe Institut für Technologie
- Warren, J. T., A. Chandrasekhar, J. P. Kanki, R. Rangarajan, A. J. Furley & J. Y. Kuwada (1999). „Molecular cloning and developmental expression of a zebrafish axonal glycoprotein similar to TAG-1“. In: *Mech. Dev.* 80.2, S. 197–201. [PubMed:10072788]
- Weiland, U. M., H. Ott, M. Bastmeyer, H. Schaden, S. Giordano & C. A. Stuermer (1997). „Expression of an L1-related cell adhesion molecule on developing CNS fiber tracts in zebrafish and its functional contribution to axon fasciculation“. In: *Mol. Cell. Neurosci.* 9.1, S. 77–89. [PubMed:9204481]
- Weschenfelder, M., F. Weth, B. Knoll & M. Bastmeyer (2013). „The stripe assay: studying growth preference and axon guidance on binary choice substrates in vitro“. In: *Methods Mol. Biol.* 1018, S. 229–246. [PubMed:23681633]
- Westerfield, M., J. V. McMurray & J. S. Eisen (1986). „Identified motoneurons and their innervation of axial muscles in the zebrafish“. In: *J. Neurosci.* 6.8, S. 2267–2277. [PubMed:3746409]
- Williams, A. F. & A. N. Barclay (1988). „The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition“. In: *Annu. Rev. Immunol.* 6, S. 381–405. [PubMed:3289571]
- Williams, E. J., J. Furness, F. S. Walsh & P. Doherty (1994). „Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin“. In: *Neuron* 13.3, S. 583–594. [PubMed:7917292]
- Wolman, M. A., V. K. Sittaramane, J. J. Essner, H. J. Yost, A. Chandrasekhar & M. C. Halloran (2008). „Transient axonal glycoprotein-1 (TAG-1) and laminin- $\alpha$ 1 regulate dynamic growth cone behaviors and initial axon direction in vivo“. In: *Neural Dev* 3, S. 6. [PubMed:18289389]
- Yabe, U., C. Sato, T. Matsuda & K. Kitajima (2003). „Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein“. In: *J. Biol. Chem.* 278.16, S. 13875–13880. [PubMed:12576469]
- Yimlamai, D., L. Konnikova, L. G. Moss & D. G. Jay (2005). „The zebrafish down syndrome cell adhesion molecule is involved in cell movement during embryogenesis“. In: *Dev. Biol.* 279.1, S. 44–57. [DOI:10.1016/j.ydbio.2004.12.001] [PubMed:15708557]

- Zhang, H., L. Vutskits, V. Calaora, P. Durbec & J. Z. Kiss (2004). „A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells“. In: *J. Cell. Sci.* 117.Pt 1, S. 93–103. [PubMed:14627627]
- Zhang, Y., J. Yeh, P. M. Richardson & X. Bo (2008). „Cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily in axonal regeneration and neural repair“. In: *Restor. Neurol. Neurosci.* 26.2-3, S. 81–96. [PubMed:18820404]
- Ziak, M., B. Qu, X. Zuo, C. Zuber, A. Kanamori, K. Kitajima, S. Inoue, Y. Inoue & J. Roth (1996). „Occurrence of poly(alpha2,8-deaminoneuraminic acid) in mammalian tissues: widespread and developmentally regulated but highly selective expression on glycoproteins“. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93.7, S. 2759–2763. [PubMed:8610115]
- Zuber, C., P. M. Lackie, W. A. Catterall & J. Roth (1992). „Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain“. In: *J. Biol. Chem.* 267.14, S. 9965–9971. [PubMed:1315775]
- Zuellig, R. A., C. Rader, A. Schroeder, M. B. Kalousek, F. Von Bohlen und Halbach, T. Osterwalder, C. Inan, E. T. Stoeckli, H. U. Affolter & A. Fritz (1992). „The axonally secreted cell adhesion molecule, axonin-1. Primary structure, immunoglobulin-like and fibronectin-type-III-like domains and glycosyl-phosphatidylinositol anchorage“. In: *Eur. J. Biochem.* 204.2, S. 453–463. [PubMed:1311675]

---

# Anhang

## Danksagung

Prof. Dr. Martin Bastmeyer danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen. Auch möchte ich mich für die konstruktiven Gespräche und das entgegengesetzte Vertrauen bedanken, das es mir ermöglichte, selbstständig und mit großen Freiräumen meine Ideen und Vorstellungen zu realisieren und mich dabei weiterentwickeln zu können.

Dr. habil Dietmar Gradl danke ich für die bereitwillige Übernahme der Korrektur.

Dem Evangelischen Studienwerk Villigst danke ich für die Mitfinanzierung meiner Arbeit, die ideelle Förderung und den interdisziplinären Austausch.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Joachim Bentrop für die zahlreichen fachkundigen Ratschläge, die ständige Diskussionsbereitschaft und vor allem für die gegenseitige Wertschätzung. Außerdem danke ich Ramona Dries für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Kerstin Weber für die langjährige Hilfsbereitschaft.

Meinen wissenschaftlichen Kollegen am Institut danke ich für die Zusammenarbeit und Unterstützung im Laboralltag; im speziellen gilt mein Dank Sarah Baur die mein Forschungsprojekt durch ihre Anregungen und vielen zielführenden Diskussionen bereichert hat.

Für die großzügige Bereitstellung...

... des Fc-Vektors und der CHO-2A10 Zellen danke ich der Arbeitsgruppe Gerardy-Schahn der Medizinischen Hochschule Hannover.

... des Myc/His-Vektors danke ich Dr. Daniela Vallone (AG Foulkes, KIT).

... der CHO-K1 Zellen danke ich Dr. Clemens Franz.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen:

Yuya Hayashi für die Fluoreszenzsortierung der Motoneurone.

Michael Schwan für die Entwicklung des Matlab Programms und die Analyse der Daten.

Mein ganz persönlicher Dank geht an die zwei wichtigsten Menschen in meinem Leben, ohne deren Zuversicht und Rückhalt ich nicht so weit gekommen wäre. Ich liebe euch.