

**Neuronale Zelladhäsionsmoleküle im Zebrafisch:  
Divergente Funktionen und Wechselwirkungen  
während der Entwicklung und Regeneration  
des posterioren Seitenlinienorgans**

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

**Ramona Dries**

aus Offenburg

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferentin: Prof. Dr. Véronique Orian-Rousseau

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2018



## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere gegenüber dem Karlsruher Institut für Technologie (KIT), dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Die Stellen, die dem Sinn nach anderen Werken entstammen, wurden durch Angabe der Quellen kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist frei von Plagiaten. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis am KIT habe ich gelesen und beachtet. Die Dissertation wurde in keiner Form einem anderen Prüfungsausschuss vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



## Zusammenfassung

Das neuronale Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1) ermöglicht Zell-Zell-Kontakte, die während der neuronalen Embryogenese für eine geordnete Zellmigration, das Auswachsen von Axonen und deren Faszikulation zuständig sind. Im Zebrafisch werden aufgrund einer Genom-Duplikation zwei *Ncam1*-Paraloge exprimiert: *Ncam1a* und *Ncam1b*. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Paraloge unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des Nervensystems ausüben. Neben Zell-Zell-Kontakten sind auch Chemokine und ihre Rezeptoren an der gerichteten Migration von Zellen und Axonen beteiligt. Das CXC-System, das im Zebrafisch durch die Rezeptoren *Cxcr4b* und *Cxcr7b* sowie den Liganden *Cxcl12a* vertreten wird, polarisiert migrierende Zellkollektive, wodurch diese entlang eines Chemokin-Gradienten zu ihrer Zielposition geführt werden.

Das differenzierte posteriore Seitenlinienorgan (pSLO) ist ein motosensorisches Sinnesorgan, das Umgebungsreize durch Auslenkung der Haarsinneszellen wahrnimmt und diese über den Seitenliniennerv (pSLN) auf den auditorischen Cortex projiziert. Die Entwicklung des pSLO erfordert die Migration eines Zellclusters (Primordium) sowie dessen Zellproliferation und die Fähigkeit zur Bildung von motosensorischen Sinnesorganen (Neuromasten), die schließlich innerviert werden. Ein *Knockdown* von *ncam1b* führt zu gravierenden phänotypischen Veränderungen während der Entwicklung des pSLO. Die Primordiengröße und die Neuromasten-Anzahl sind reduziert und die Migration ist verlangsamt. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung dieser phänotypischen Veränderungen auf molekularer Ebene sowie das Verständnis der *Ncam1b*-vermittelten Signaltransduktion. Des Weiteren wurde die Funktion der *Ncam1*-Paraloge im differenzierten und regenerierenden pSLO betrachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Zellteilungsrate im Primordium entscheidend durch *Ncam1b*, nicht aber durch *Ncam1a* beeinflusst wird. *in situ* Hybridisierungen von *fgfr1a* und dessen Zielgen *erm* demonstrieren, dass in *ncam1b*-Morphanten, im Gegensatz zu *ncam1a*-Morphanten, die Expression von *erm* trotz Vorhandenseins von *fgfr1a* ausbleibt, was auf eine fehlende Aktivierung des Rezeptors hindeutet. Um eine mögliche Interaktion von *Ncam1b* und *Fgfr1a* nachzuweisen, wurden zwei Splice-Varianten der C-terminalen Ig-3 Domäne von *Fgfr1a* isoliert: IIIb und IIIc. Zellkulturexperimente und Bead-Aggregations-Assays zeigen, dass *Ncam1b* eine starke Wechselwirkung mit *Fgfr1a*-IIIb und eine schwache Wechselwirkung mit IIIc eingeht. Demgegenüber zeigt *Ncam1a* lediglich eine schwache Bindung an IIIb. Eine Interaktion bleibt aus, wenn die C-terminale Ig-3 Domäne des *Fgfr1a* fehlt. In *ncam1b*-Morphanten ist die Expression des Chemokinrezeptors *Cxcr7b* reduziert. Dies wird als Ursache für das veränderte Migrationsverhalten der Primordien diskutiert.

In reifen Neuromasten wird in den Haarsinneszellen und in einigen wenigen Stützzellen *Ncam1b*, nicht aber *Ncam1a* exprimiert. Werden die Haarsinneszellen durch Toxinbehandlung abgetötet, so wird während der Regeneration *Ncam1b* verstärkt in Stützzellen exprimiert, bevor sich diese zu Haarsinneszellen differenzieren.

Damit konnte erstmals eine durch *Ncam1b* vermittelte *Fgfr1a*-Signaltransduktion und deren zelluläre Antwort in der Entwicklung des pSLO gezeigt werden. Weiterhin wurde mit *Erm* ein spezifisches *Fgfr1a*-Zielprotein für die Induktion der primordialen Zellproliferation vorgeschlagen. Im adulten pSLO wird *Ncam1b* für die Differenzierung und Funktion der sensorischen Haarsinneszellen benötigt.



# Inhaltsverzeichnis

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Das posteriore Seitenlinienorgan (pSLO) . . . . .   | 2         |
| 1.1.1    | Die Entwicklung des posterioren Seitenlinienorgans . . . . .  | 2         |
| 1.1.2    | Die Etablierung antagonistisch wirkender Signalwege im Primordium . . . . .                         | 4         |
| 1.1.3    | Vom Protoneuromasten zum Neuromasten . . . . .  | 5         |
| 1.1.4    | Die Migration des Primordiums entlang eines Chemokingradienten . . . . .                            | 8         |
| 1.2      | Neuronale Zelladhäsionsmoleküle . . . . .   | 9         |
| 1.2.1    | Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) . . . . .   | 9         |
| 1.3      | Das neuronale Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1) . . . . .  | 9         |
| 1.3.1    | Struktur und Aufbau . . . . .   | 9         |
| 1.3.2    | Glykosylierung von NCAM1 . . . . .  | 10        |
| 1.3.3    | Interaktionspartner von NCAM1 . . . . .   | 11        |
| 1.3.4    | Das neuronale Zelladhäsionsmolekül Ncam1 in <i>Danio rerio</i> . . . . .                            | 12        |
| 1.4      | Der Fibroblast Growth Factor-Signalweg . . . . .  | 13        |
| 1.4.1    | Struktur, Aufbau und Domänen des FGF-Rezeptors . . . . .  | 14        |
| 1.4.2    | Die Interaktion von NCAM1 und FGFR1 . . . . .   | 15        |
| 1.5      | Zielsetzung . . . . .   | 16        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>17</b> |
| 2.1      | Material . . . . .  | 17        |
| 2.1.1    | Chemikalien, Puffer, Lösungen, Kulturmedien und Antibiotika . . . . .                               | 17        |
| 2.1.2    | Kit-Systeme für molekularbiologische und mikrobiologische Arbeiten . . . . .                        | 23        |
| 2.1.3    | Antikörper, Farbstoffe und Proteine . . . . .   | 24        |
| 2.1.4    | Polymerasen, Restriktionsendonukleasen, weitere Enzyme, Längenstandards und Gelladepuffer . . . . . | 27        |
| 2.1.5    | Nukleinsäuren, Plasmide und Sonden . . . . .  | 28        |
| 2.1.6    | Geräte und Arbeitsmaterialien . . . . .   | 32        |
| 2.1.7    | Mikroskope und Objektive . . . . .  | 33        |
| 2.1.8    | Programme . . . . .   | 33        |
| 2.2      | Methoden . . . . .  | 34        |
| 2.2.1    | Der Zebrafisch: Linien, Haltung, Embryonengewinnung und Aufzucht . . . . .                          | 34        |
| 2.2.2    | Mikroinjektion von Zebrafischembryonen . . . . .  | 35        |
| 2.2.3    | <i>Wholemout</i> -immunhistochemische Färbung von Zebrafischembryonen . . . . .                     | 35        |
| 2.2.4    | <i>in situ</i> Hybridisierung (ISH) von Zebrafischembryonen . . . . .                               | 36        |
| 2.2.5    | Molekularbiologie: RNA-Isolation, PCR und Klonierung . . . . .                                      | 39        |
| 2.2.6    | Mikrobiologie: Transformation, Plasmid-Isolierung und Glycerinstocks . . . . .                      | 43        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 2.2.7    | Sequenzierungen . . . . .   | 43         |
| 2.2.8    | <i>in vitro</i> Transkription zur Sondensynthese und Synthese von Rescue-mRNA . . . . .                                   | 43         |
| 2.2.9    | Zellkultur: Transfektion von CHO-Zellen und Proteinbiosynthese . . . . .  | 44         |
| 2.2.10   | Aufreinigung löslicher Proteine aus Zellkulturüberstand . . . . .   | 45         |
| 2.2.11   | Protein-Protein-Interaktionsnachweis . . . . .  | 47         |
| 2.2.12   | BrdU-Assay . . . . .  | 48         |
| 2.2.13   | Haarsinneszellen-Toxizitätstest . . . . .   | 49         |
| 2.2.14   | Statistische Auswertung . . . . .   | 50         |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>51</b>  |
| 3.1      | Die Funktion und Interaktion von Ncam1 während der Entwicklung des pSLO . . . . .   | 52         |
| 3.1.1    | Ncam1b beeinflusst die Proliferation im migrierenden Primordium . . . . .   | 52         |
| 3.1.2    | Ncam1b nimmt Einfluss auf die Signalwege Wnt und Fgfr1a . . . . .   | 53         |
| 3.1.3    | Im Zebrafisch werden verschiedene Fgfr1a-Isoformen exprimiert . . . . .   | 59         |
| 3.1.4    | Ncam1-Paraloge interagieren unterschiedlich mit Fgfr1a-Isoformen . . . . .  | 63         |
| 3.1.5    | Ncam1b nimmt Einfluss auf die Migration des Primordiums . . . . .   | 70         |
| 3.2      | Die Funktion von Ncam1 im differenzierten pSLO . . . . .  | 72         |
| 3.2.1    | Otoferlin wird in frühen Vorläuferstadien von Haarsinneszellen exprimiert . . . . .                                       | 72         |
| 3.2.2    | Die Expression der Ncam1-Paraloge in reifen Neuromasten . . . . .   | 73         |
| 3.2.3    | Regenerierende Haarsinneszellen exprimieren Ncam1b . . . . .  | 78         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>87</b>  |
| 4.1      | Ncam1b nimmt Einfluss auf den Fgfr1a-Signalweg . . . . .  | 87         |
| 4.1.1    | Ncam1b beeinflusst die Zellproliferation primordialer Zellen . . . . .  | 88         |
| 4.1.2    | Das Primordium von <i>ncam1b</i> -Morphanten weist eine Musterung auf . . . . .   | 89         |
| 4.1.3    | Keine Fgfr1a-Signaltransduktion in <i>ncam1b</i> -Morphanten . . . . .  | 90         |
| 4.2      | Ncam1b-vermittelte Fgfr1a-Signaltransduktion . . . . .  | 91         |
| 4.2.1    | Die Erkennungs-, Binde- und Interaktionsstelle von NCAM1 und FGFR1 . . . . .  | 93         |
| 4.2.2    | Ncam1b reguliert die Expression des Chemokin-Rezeptors Cxcr7b . . . . .   | 95         |
| 4.2.3    | Modell zum Mechanismus und zur Funktion der Ncam1-vermittelten Fgfr1a-Signalkaskade in der Entwicklung des pSLO . . . . . | 97         |
| 4.3      | Ncam1b beeinflusst die Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen . . . . .                                    | 100        |
| 4.3.1    | Differenzierte Neuromasten exprimieren Ncam1b, aber kein Ncam1a . . . . .   | 100        |
| 4.3.2    | Ncam1b wird in regenerierenden Neuromasten exprimiert . . . . .   | 101        |
| 4.3.3    | Modell zur Funktion von Ncam1b während der Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen . . . . .                | 102        |
| 4.4      | Ausblick . . . . .  | 103        |
| <b>5</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>105</b> |
|          | <b>Danksagung</b>   | <b>119</b> |

# Abbildungsverzeichnis

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.1  | Zerfall der sensorischen primären posterioren Seitenlinien-Plakode in <i>Danio rerio</i> .                                 | 2  |
| 1.2  | Entwicklung des primären posterioren Seitenlinienorgans in <i>Danio rerio</i> . . . .                                      | 2  |
| 1.3  | Entwicklung zum differenzierten posterioren Seitenlinienorgan in <i>Danio rerio</i> .                                      | 3  |
| 1.4  | Morphologische und funktionelle Unterreilung des primären posterioren Seitenlinien-Primordiums. . . . .                    | 4  |
| 1.5  | Schema eines reifen Neuromasten. . . . .   | 6  |
| 1.6  | Die Migration des Primordiums entlang eines Chemokingradienten. . . . .  | 8  |
| 1.7  | NCAM1-Isoformen. . . . .   | 10 |
| 1.8  | Posttranslationale Modifikation von NCAM1 durch Polysialinsäure. . . . .   | 11 |
| 1.9  | Die Ncam1-Paraloge des Zebrafisches: Ncam1a und Ncam1b. . . . .  | 13 |
| 1.10 | Struktureller Aufbau des FGF-Rezeptors. . . . .  | 14 |
| 2.1  | Synthese des Fgfr1a ohne Exon 7 mittels Fusion-PCR. . . . .  | 41 |
| 2.2  | Western Blot der aufgereinigten löslichen Proteine der Ncam1a-Paraloge und Fgfr1a-Isoformen. . . . .                       | 46 |
| 3.1  | Ncam1a und Ncam1b beeinflussen die Entwicklung des primären posterioren Seitenlinienorgans (pSLO). . . . .                 | 51 |
| 3.2  | <i>ncam1b</i> -Morphanten zeigen keine Proliferation primordialer Zellen bei 36 hpf.                                       | 52 |
| 3.3  | Quantifizierung BrdU-markierter Zellen im migrierenden Primordium zum Zeitpunkt 36 hpf. . . . .                            | 53 |
| 3.4  | Veränderte Lokalisation von <i>lef1</i> in <i>ncam1b</i> -Morphanten bei 36 hpf. . . . .                                   | 54 |
| 3.5  | <i>ncam1b</i> -Morphanten transkribieren <i>fgfr1a-CDS</i> in der <i>Trailing-Zone</i> des Primordiums bei 36 hpf. . . . . | 55 |
| 3.6  | Verringerte Transkription des Fgfr1a-Zielgens <i>erm</i> in <i>ncam1b</i> -Morphanten zum Zeitpunkt 36 hpf. . . . .        | 56 |
| 3.7  | Quantifizierung der Genexpression des Fgfr1a-Zielgens <i>erm</i> . . . . .   | 57 |
| 3.8  | Reduzierte Fgfr1a-Signaltransduktion und Proliferation in <i>ncam1b</i> -Morphanten.                                       | 58 |
| 3.9  | Expression verschiedener Fgfr1a-Isoformen im Zebrafisch. . . . .   | 60 |
| 3.10 | Expression der Ncam1-Paraloge und Fgfr1a-Isoformen in <i>CHO-K1</i> -Zellen. . .   | 62 |
| 3.11 | Ncam1b interagiert mit Fgfr1a-IIIb und schwach mit Fgfr1a-IIIc. . . . .  | 64 |
| 3.12 | Ncam1a bildet schwache Wechselwirkungen mit Fgfr1a-IIIb aus, aber nicht mit Fgfr1a-IIIc. . . . .                           | 65 |
| 3.13 | Der C-terminale Bereich der Ig-3 Domäne des Fgfr1a ist an der Bindung der Ncam1-Paraloge beteiligt. . . . .                | 66 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.14 Die statistische Auswertung der in Zellkultur durchgeführten Overlay-Assays zeigt verschieden starke Bindungsaffinitäten der Fgfr1a-Isoformen zu den Ncam1-Paralogen. . . . . | 67  |
| 3.15 Die Ncam1-Paraloge zeigen unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten zu Splice-Varianten von Fgfr1a. . . . .  | 68  |
| 3.16 Keine Interaktion der Fgfr1a-Isoformen IIIb und IIIc sowie Ncam1b und Ncam1a mit humanem Fc. . . . .  | 69  |
| 3.17 Ncam1b interagiert heterophil mit Fgfr1a-IIIb und -IIIc in Bead-Aggregations-Assays. Ncam1a tritt nur mit Fgfr1a-IIIb in Wechselwirkung. . . . .                              | 69  |
| 3.18 Ein <i>Knockdown</i> von <i>ncam1b</i> führt zu einer reduzierten Expression von <i>Cxcr7b</i> bei 48 hpf. . . . .  | 71  |
| 3.19 Expressionsmuster von <i>Atoh1a</i> und <i>Otoferlin</i> (HCS-1) in Haarsinneszellen nach 5 dpf. . . . .  | 72  |
| 3.20 Schwache Expression von <i>Ncam1a</i> in den Haarsinneszellen ab 5 dpf. . . . .   | 74  |
| 3.21 Quantifizierung von <i>Ncam1a</i> -exprimierenden Zellen während der Entwicklung von Haarsinneszellen. . . . .  | 75  |
| 3.22 Expression von <i>Ncam1b</i> in unreifen und differenzierten Haarsinneszellen zwischen 5 und 8 dpf. . . . .   | 76  |
| 3.23 Quantifizierung von <i>Ncam1b</i> -exprimierenden Zellen während der Entwicklung von Haarsinneszellen. . . . .  | 77  |
| 3.24 Keine Expression von <i>Ncam1a</i> während der Regeneration von Haarsinneszellen zwischen 0 und 72 hpt. . . . .   | 79  |
| 3.25 Quantifizierung von <i>Ncam1a</i> -positiven Zellen während der Regeneration von Haarsinneszellen. . . . .  | 80  |
| 3.26 Expression von <i>Ncam1b</i> während der Regeneration von Haarsinneszellen zwischen 0 und 72 hpt. . . . .   | 81  |
| 3.27 Quantifizierung von <i>Ncam1b</i> -exprimierenden Zellen während der Regeneration von Haarsinneszellen. . . . .   | 82  |
| 3.28 Die Inhibierung des Notch-Signalweges führt zu einer erhöhten Expression von <i>Ncam1b</i> in Stützzellen. . . . .  | 83  |
| 3.29 Statistische Auswertung von <i>Ncam1b</i> -exprimierenden Zellen während der Regeneration von Haarsinneszellen bei gleichzeitiger Hemmung der lateralen Inhibierung. . . . .  | 85  |
| 4.1 NCAM1 und FGFR1 codieren mehrere Interaktionsstellen. . . . .  | 93  |
| 4.2 Modell zur Interaktion von <i>Ncam1b</i> und <i>Fgfr1a-IIIb</i> . . . . .  | 94  |
| 4.3 Schema der <i>Ncam1-Fgfr1a</i> -Interaktion und deren Einfluss auf die Entwicklung des pSLO. . . . .   | 97  |
| 4.4 Modell zur Funktion der <i>Ncam1</i> -Paraloge in der Entwicklung des pSLO. . . . .  | 99  |
| 4.5 Modell zur Funktion von <i>Ncam1b</i> während der Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen. . . . .   | 102 |

---

## Tabellenverzeichnis

|      |   |    |
|------|---|----|
| 2.1  | Chemikalien und Reagenzien der Firmen Roche und Peqlab . . . . .                | 17 |
| 2.2  | Experimentspezifische Chemikalien . . . . .                                     | 17 |
| 2.3  | Puffer . . . . .  | 18 |
| 2.3  | Puffer - Fortsetzung . . . . .  | 19 |
| 2.4  | Lösungen . . . . .  | 19 |
| 2.4  | Lösungen - Fortsetzung . . . . .  | 20 |
| 2.4  | Lösungen - Fortsetzung . . . . .  | 21 |
| 2.5  | Kulturmedien . . . . .  | 21 |
| 2.5  | Kulturmedien - Fortsetzung . . . . .  | 22 |
| 2.6  | Antibiotika . . . . .   | 23 |
| 2.7  | Kit-Systeme für molekular- und mikrobiologische Arbeiten . . . . .              | 23 |
| 2.7  | Kit-Systeme für molekular- und mikrobiologische Arbeiten - Fortsetzung . . .    | 24 |
| 2.8  | Primärantikörper . . . . .  | 24 |
| 2.8  | Primärantikörper - Fortsetzung . . . . .  | 25 |
| 2.9  | Sekundärantikörper . . . . .  | 25 |
| 2.9  | Sekundärantikörper - Fortsetzung . . . . .                                      | 26 |
| 2.10 | Farbstoffe . . . . .  | 26 |
| 2.11 | Proteine . . . . .  | 26 |
| 2.11 | Proteine - Fortsetzung . . . . .  | 27 |
| 2.12 | Polymerasen . . . . .   | 27 |
| 2.13 | Restriktionsendonukleasen . . . . .   | 27 |
| 2.14 | Weitere Enzyme . . . . .  | 27 |
| 2.15 | Längenstandards und Gelladepuffer . . . . .                                     | 28 |
| 2.16 | Eingesetzte Morpholinos . . . . .   | 28 |
| 2.17 | Eingesetzte Primer . . . . .  | 29 |
| 2.18 | Plasmide als Leervektoren . . . . .   | 30 |
| 2.19 | Klonierte Plasmide . . . . .  | 30 |
| 2.19 | Klonierte Plasmide - Fortsetzung . . . . .                                      | 31 |
| 2.20 | Sonden . . . . .  | 31 |
| 2.20 | Sonden-Fortsetzung . . . . .  | 32 |
| 2.21 | Geräte und Arbeitsmaterialien . . . . .   | 32 |
| 2.22 | Injektionsansatz . . . . .  | 35 |
| 2.23 | <i>Wholemout</i> -immunhistochemische Färbung von Zebrafischembryonen . . . . . | 36 |
| 2.24 | <i>in situ</i> Hybridisierung von Zebrafischembryonen . . . . .                 | 37 |
| 2.24 | <i>in situ</i> Hybridisierung von Zebrafischembryonen - Fortsetzung . . . . .   | 38 |

---

|      |   |    |
|------|---|----|
| 2.25 | <i>Wholemout</i> -immunhistochemische Färbung nach ISH . . . . .  | 39 |
| 2.26 | Standard-PCR-Programm der Veraseq-DNA-Polymerase . . . . .        | 40 |
| 2.27 | 2-Schritt PCR-Programm der VeraSeq-DNA-Polymerase . . . . .       | 40 |
| 2.28 | Fusion-PCR . . . . .  | 41 |
| 2.29 | Standard-PCR-Programm der DreamTaq Green-DNA-Polymerase . . . . . | 42 |
| 2.30 | Protokoll für SDS-PAGE und Western Blot . . . . .                 | 45 |
| 2.30 | Protokoll für SDS-PAGE und Western Blot - Fortsetzung . . . . .   | 46 |
| 2.31 | Immunhistochemische Färbung von Zellen . . . . .                  | 47 |
| 2.32 | Bead-Aggregations-Assay . . . . .                                 | 48 |
| 2.33 | BrdU-Assay . . . . .  | 48 |
| 2.33 | BrdU-Assay - Fortsetzung . . . . .                                | 49 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>0.5x E2</b>   | 0.5x embryonales Kulturmedium 2                                      |
| <b>Atoh1a</b>    | Atonal homolog 1a  |
| <b>BrdU</b>      | Bromdesoxyuridin   |
| <b>CDS</b>       | Coding Sequence  |
| <b>CHD</b>       | CAM Homology Domain  |
| <b>Cxcl</b>      | Cxc-Ligand   |
| <b>Cxcr</b>      | Cxc-Rezeptor   |
| <b>DAPT</b>      | N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester |
| <b>Dkk</b>       | Dickkopf   |
| <b>dpf</b>       | days post fertilization  |
| <b>ECD</b>       | Extracellular Domain   |
| <b>Erm</b>       | Ets-related molecule (= Etv5)  |
| <b>Fgf</b>       | Fibroblast Growth Factor   |
| <b>FGL</b>       | FG Loop  |
| <b>FN-Domäne</b> | Fibronektin-TypIII-Domäne  |
| <b>FRM</b>       | FGF receptor activation motif  |
| <b>hpf</b>       | hours post fertilization   |
| <b>hpt</b>       | hours post treatment   |
| <b>HRP</b>       | Horseradish Peroxidase   |
| <b>HSPG</b>      | Heparansulfat-Proteoglykan   |
| <b>Ig-Domäne</b> | Immunglobulin-Domäne   |
| <b>IgSF</b>      | Immunglobulin-Superfamilie   |
| <b>L3</b>        | Dritter durch PrimI abgesetzter Neuromast                            |
| <b>Lef1</b>      | Lymphoid enhancer-binding factor 1                                   |
| <b>LZ</b>        | Leading-Zone   |
| <b>NBT/BCIP</b>  | Nitroblautetrazoliumchlorid/5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat         |
| <b>NCAM1</b>     | Neural Cell Adhesion Molecule 1                                      |
| <b>pnm</b>       | Protoneuromast   |
| <b>polySia</b>   | Polysialinsäure  |
| <b>PrimI</b>     | primäres posteriores Seitenlinienprimordium                          |
| <b>pSLG</b>      | posteriores Seitenlinienganglion                                     |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>pSLN</b>   | posteriorer Seitenliniennerv   |
| <b>pSLO</b>   | posteriores Seitenlinienorgan  |
| <b>pSLP</b>   | posteriore Seitenlinienplakode   |
| <b>Sef</b>    | Similar expression of FGF  |
| <b>Sox2</b>   | Sex determining region Y-box 2   |
| <b>SU5402</b> | 3-[4-Methyl-2-(2-oxo-1,2-dihydro-indol-3-ylidenemethyl)-1H-pyrrol-3-yl]-propionic acid |
| <b>TZ</b>     | Trailing-Zone  |
| <b>VASE</b>   | Variable Alternatively Spliced Exon  |
| <b>w/o</b>    | without  |

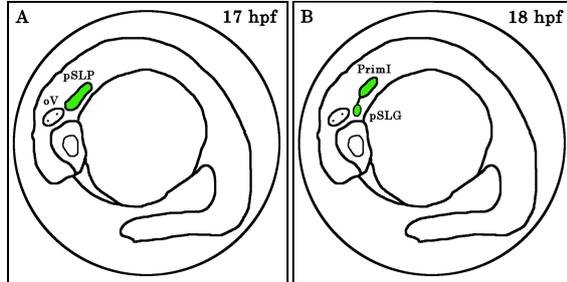
# 1 Einleitung

Mitte des 17. Jahrhunderts entdeckte der dänische Naturforscher Nicolaus Stenonis erstmals aneinandergereihte Poren entlang beider Fischseiten von Haien und Rochen (Stenonis 1664). Stenonis vermutete, dass es sich dabei um Schleimdrüsen handeln würde, welche die Haut des Fisches überziehen, um das Schwimmverhalten im Wasser zu optimieren. 1868 widersprach der deutsche Zoologe Franz von Leydig dieser Aussage mit dem Fund von "Nervenköpfen" im Kopfbereich von Barschen (Leydig 1868, Coombs et al. 2013). In den folgenden Jahren befassten sich viele Naturforscher und Anatomen mit dem durch Leydig beschriebenen 6. Sinn der Fische. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gelang es Bruno Hofer durch Versuche an Hechten, eine erste Funktion dieser Strukturen zu ermitteln (Hofer 1908). Er erkannte, dass Fische auf äußerliche Reize, wie z.B. Druckwellen, reagieren können, ohne diese optisch wahrzunehmen. Hofer führte eine Amputation der Seitenlinie durch, wodurch eine Reaktion der Fische auf einströmende Druckwellen ausblieb. 1933 gelang es dem Biologen Sven Dykgraaf erstmalig, die vollständige Anatomie der posterioren Seitenlinie darzustellen und die bis dahin bekannten Versuchsergebnisse richtig zu deuten. Er beschrieb die bis heute geltende Funktion der Seitenlinie als Ferntastsinn, welcher es den Fischen ermöglicht, sich durch Wahrnehmung von Strömungen und Druckwellen in ihrer Umgebung zu bewegen und beispielsweise ein Schwarmverhalten auszubilden (Dykgraaf 1933). Ein halbes Jahrhundert später haben zahlreiche Studien dazu beigetragen, die Anatomie und grundlegende Entwicklung des posterioren Seitenlinienorgans (pSLO) aufzuzeigen (Metcalf et al. 1985, Kimmel et al. 1995, Gilmour et al. 2002, Dambly-Chaudière et al. 2007, Aman und Piotrowski 2008, Lush und Piotrowski 2014, Romero-Carvajal et al. 2015). Das pSLO ist heute ein wichtiges Modellsystem für Untersuchungen zur kollektiven Migration von Zellclustern, zur Innervierung von sensorischen Zellen und zur Regeneration von human-homologen Haarsinneszellen.

Die Entwicklung und Funktion des pSLO erfordert die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Zellclustern. Diese Funktionen übernehmen Cadherine und neuronale Zelladhäsionsmoleküle, wie das neuronale Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1), welche Zell-Zell-Kontakte ausbilden und die Zelladhäsion fördern. NCAM1 wurde 1974 erstmals von Jørgensen und Bock beschrieben und gilt als eines der bestuntersuchten Zelladhäsionsmoleküle in der Entwicklung von Nervensystemen (Rutishauser et al. 1982). In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle Ncam1a und Ncam1b und des möglichen Interaktionspartners Fgfr1a in der Entwicklung und Funktion des pSLO im Zebraärbüchling untersucht.

## 1.1 Das posteriore Seitenlinienorgan (pSLO)

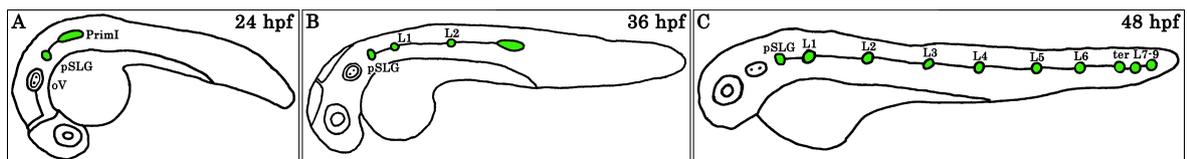
### 1.1.1 Die Entwicklung des posterioren Seitenlinienorgans



**Abbildung 1.1: Zerfall der sensorischen primären posterioren Seitenlinien-Plakode in *Danio rerio*.** **A)** Zu Ende der Gastrulation bilden sich in der präplakodalen Region sensorische Plakoden aus. Die sensorische primäre posteriore Seitenlinienplakode migriert bis 17 hpf zu ihrem Bestimmungsort caudal des otischen Vesikels (oV). **B)** Die sensorische primäre posteriore Seitenlinieplakode zerfällt 18 hpf in das primäre Seitenlinienganglion (pSLG) und das primäre posteriore Seitenlinienprimordium (PrimI).

Das primäre posteriore Seitenlinienorgan (pSLO) entwickelt sich ab 18 hpf (hours post fertilization) aus der primären sensorischen posterioren Seitenlinienplakode (pSLP) (Abb. 1.1, A). Diese wird zu Ende der Gastrulation in der präplakodalen Region, die sich zwischen Epithelschicht und Neuralplatte befindet, durch epitheliale Verdickung gebildet. Die Ausdifferenzierung der pSLP wird durch Retinsäure ausgelöst (Baker und Bronner-Fraser 2001, Grocott et al. 2012, Nikaido et al. 2017). Im 18-Somiten-Stadium (18 hpf) zerfällt die Plakode in zwei ungleiche Zellcluster (Abb. 1.1, B). Das kleinere Cluster (20 Zellen) entwickelt sich zum posterioren

Seitenlinienganglion (pSLG). Seine Zellen differenzieren sich zu bipolaren Nervenzellen, welche die sensorischen Zellen des pSLO innervieren und deren Reize auf die Mauthner-Zelle und den *Nucleus octavolateralis* im Hinterhirn projizieren (Alexandre und Ghysen 1999). Das größere, aus 100 Zellen bestehende Zellcluster formiert sich zum primären posterioren Seitenlinienprimordium (Primordium I (PrimI)) (Kimmel et al. 1995).

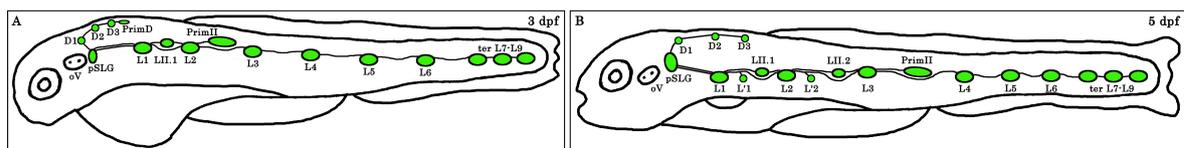


**Abbildung 1.2: Entwicklung des primären posterioren Seitenlinienorgans in *Danio rerio*.** **A)** Nach dem Zerfall der Plakode beginnt das Primordium (PrimI) 20 hpf mit der Migration entlang des horizontalen Myoseptums. **B)** Während der Migration werden im PrimI Protoneuromasten gebildet, die entlang des Migrationsweges abgesetzt werden und sich zu Neuromasten (L1-L6) differenzieren. **C)** 48 hpf erreicht PrimI die Schwanzspitze und zerfällt in drei terminale (Proto-)Neuromasten (ter L7-L9).

Wenige Stunden (20 hpf) nach der Entstehung des PrimI beginnt dieses als Zellkollektiv entlang des horizontalen Myoseptums zur Schwanzspitze zu migrieren (Abb. 1.2). Die umliegenden Muskelzellen sezernieren entlang des horizontalen Myoseptums homogen den Chemokinliganden Cxcl12a (Sdf1a), welcher von den Chemokinrezeptoren Cxcr4b und Cxcr7b des Primordiums erkannt wird und den Migrationsweg festlegt (Donà et al. 2013, siehe auch Kap. 1.1.4). Das PrimI bildet während der Migration bis zu 6 Protoneuromasten aus und entlässt diese periodisch entlang des horizontalen Myoseptums (Abb. 1.2, L1-L6, B und C). Diese aus etwa 30 Zellen bestehende Vorläuferstadien der motosensorischen Organe beginnen wenige Stunden nach dem Absetzen mit der Differenzierung zu reifen primären Neuromasten. Etwa

28 Stunden nach Beginn der Wanderung (48 hpf) erreicht das PrimI die Schwanzspitze und zerfällt in drei terminale Protoneuromasten (Abb. 1.2, C). Neben den Protoneuromasten entlässt das PrimI Interneuromastenzellen, die sich in der weiteren Entwicklung zu interkalären Neuromasten (L') entwickeln. Begleitet wird die Migration des PrimI durch eine zeitversetzte Migration der Axone bipolarer Nervenzellen des pSLG. Ein Neurit dieser Zellen wird zu der Mauthner-Zelle und dem *Nucleus octavolateralis* im Hinterhirn projiziert, wohingegen der andere Neurit mit dem Primordium migriert. Die Axone innervieren dabei die sensorischen Zellen der Neuromasten peripher und bilden auf diese Weise den posterioren Seitenliniennerv (pSLN) aus. Gliazellen der Neuralleiste begleiten die Migration und myelinisieren zu einem späteren Zeitpunkt den pSLN (Alexandre und Ghysen 1999, Gilmour et al. 2002, Ghysen und Dambly-Chaudière 2007, Sarrazin et al. 2010, Pujol-Martí und López-Schier 2013).

Das differenzierte pSLO besteht jedoch aus einer weitaus höheren Zahl an Neuromasten. 24 hpf zerfällt im Bereich der sensorischen primären posterioren Plakode eine sekundäre Plakode. Anders als die primäre, ist diese Plakode kleiner und zerfällt in ein sekundäres posteriores Primordium (PrimII), ein dorsales Primordium (PrimD), ein sekundäres posteriores Seitenlinienganglion, das mit dem primären verschmilzt, und einen an der Stelle der Plakode verbleibenden Neuromasten D1 (Abb. 1.3, A). PrimII folgt dem PrimI entlang des horizontalen Myoseptums und entlässt bis zu drei Protoneuromasten (LII.1-LII.3) und zahlreiche Interneuromastenzellen. Das dorsale Primordium migriert zur Dorsalseite des Embryos und entlässt bis zur dorsalen Flosse zwei Protoneuromasten (D2 und D3) und Interneuromastenzellen. Bipolare Nervenzellen des sekundären pSLG, wie auch Gliazellen der Neuralleiste, folgen dem PrimII und PrimD und innervieren sowohl die primären als auch sekundären und dorsalen Neuromasten (Ledent 2002, Pujol-Martí und López-Schier 2013).

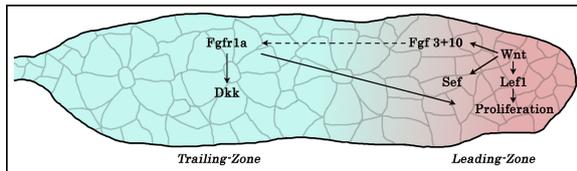


**Abbildung 1.3: Entwicklung zum differenzierten posterioren Seitenlinienorgan in *Danio rerio*.** **A)** Erreicht PrimI die Schwanzspitze, zerfällt im Bereich der primären Plakode eine zweite, sensorische sekundäre Plakode in ein sekundäres Primordium (PrimII), ein dorsales Primordium (PrimD), ein sekundäres Seitenlinienganglion, das mit dem Primären verschmilzt (pSLG) und einen dorsalen Neuromasten (D1). PrimD migriert zur Dorsalseite und entlässt weitere dorsale Protoneuromasten, PrimII folgt dem Migrationsweg des PrimI und setzt sekundäre Protoneuromasten (LII.1) ab. **B)** Das adulte posteriore Seitenlinienorgan besteht aus einer Vielzahl von Neuromasten. Diese entwickeln sich aus den primär und sekundär abgesetzten Protoneuromasten und aus interkalären Neuromasten (L'1).

Das pSLO entwickelt und differenziert sich in 21 Tagen nach der Befruchtung (dpf). Hierfür wandern die abgesetzten und differenzierten Neuromasten innerhalb von 14 Tagen vom horizontalen Myoseptum nach ventral. Diese Wanderung ermöglicht es den Interneuromastenzellen, sich zu interkalären Neuromasten zu entwickeln (Abb. 1.3, B). Die Migration der einzelnen Organe unterliegt einer hierarchischen Abfolge. Primäre Neuromasten und Interneuromastenzellen sowie deren Nervenzellen beginnen von anterior nach posterior mit der Migration. Sobald sie ihre Bestimmungsposition erreicht und sich zu interkalären Neuro-

masten differenziert haben, beginnt die Migration der sekundären Neuromasten und Interneuromastenzellen. 21 dpf ist die Entwicklung des pSLO vollständig abgeschlossen (Ghysen und Dambly-Chaudière 2007).

### 1.1.2 Die Etablierung antagonistisch wirkender Signalwege im Primordium



**Abbildung 1.4: Das primäre Primordium wird morphologisch und funktionell in die Bereiche *Leading-* und *Trailing-Zone* unterteilt.**

In der sich in migrationsrichtung befindlichen *Leading-Zone* induziert der aktive Wnt-Signalweg die Expression des Transkriptionsfaktors Lef1, der die Proliferation der pseudomesenchymalen Zellen stimuliert. Zeitgleich aktivieren Wnt-Signale die Expression der Fgf-Liganden 3 und 10 sowie des membrangebundenen Fgf-Inhibitors Sef. In der *Trailing-Zone* binden die diffusiblen Fgf-Liganden 3 und 10 an den Fgf-Rezeptor Fgfr1a, wodurch sich die pseudomesenchymalen Zellen zu epitheliale Zellen differenzieren und Protoneuromasten ausbilden. Wnt-Signale werden in diesem Bereich durch den Fgf-abhängigen Inhibitor Dickkopf (Dkk) gehemmt. Der aktive Fgf-Signalweg fördert zusätzlich, auf noch unbekannte Weise, die Zellproliferation.

Die Morphogenese des pSLO unterliegt einer komplexen Wechselwirkung zwischen den Signalwegen Wnt und Fgf. Das zu Beginn aus etwa 100 Zellen bestehende Primordium kann morphologisch und funktionell in zwei Bereiche unterteilt werden (Abb. 1.4). Die *Leading-Zone*, welche sich in Migrationsrichtung befindet, besteht aus pseudomesenchymalen Zellen, die etwa ein Drittel des Primordiums bilden und durch Signale des Wnt-Signalweges spezifiziert werden. Aktive Wnt-Signale führen zur Expression der diffusiblen Fgf-Liganden Fgf3 und Fgf10 bei gleichzeitiger Expression des membrangebundenen Fgf-Inhibitors Sef. Dadurch ist keine Bindung der Liganden an den schwach exprimierten Fibroblast Growth Factor-Receptor 1a (Fgfr1a) in der *Leading-Zone*

möglich. Den rostralen Bereich, auch *Trailing-Zone* genannt, bilden epitheliale Zellen, die eine erhöhte Expression von Fgfr1a aufweisen. Die diffusiblen Fgf-Liganden der *Leading-Zone* binden in diesem Bereich an den Fgf-Rezeptor und führen unter anderem zur Expression des Wnt-Inhibitors Dickkopf (Dkk) (Aman und Piotrowski 2008). Auf diese Weise etablieren sich im migrierenden Primordium zwei antagonistisch wirkende Signalzentren mit unterschiedlichen Funktionen.

Während der Entwicklung des pSLO wandert das Primordium von rostral nach caudal. Dabei bildet es die Vorläuferstadien der motosensorischen Organe, die Protoneuromasten, in der *Trailing-Zone* und setzt diese in periodischen Abständen entlang des horizontalen Myoseptums ab. Zum Ende der Migration zerfällt das Primordium in 3 terminale Protoneuromasten. Insgesamt können durch PrimI bis zu 6 Protoneuromasten abgesetzt werden (Lecaudey et al. 2008, Aman et al. 2011, Dries 2014, Durdu et al. 2014). Jeder dieser abgesetzten Protoneuromasten setzt sich aus etwa 30 Zellen zusammen. Das Primordium selbst besteht anfangs jedoch nur aus 100 Zellen, weshalb die Zellzyklusrate in periodischen Zyklen (in Korrelation mit der Absetzung der Protoneuromasten) erhöht wird (Aman und Piotrowski 2011). Der aktive Wnt-Signalweg in der *Leading-Zone* führt zur Expression des Transkriptionsfaktors Lef1, welcher die Proliferation der pseudomesenchymalen Zellen stimuliert. Lange Zeit wurde angenommen, dass ausschließlich Signale des Wnt-Signalweges die Proliferation im migrierenden Primordium regulieren.

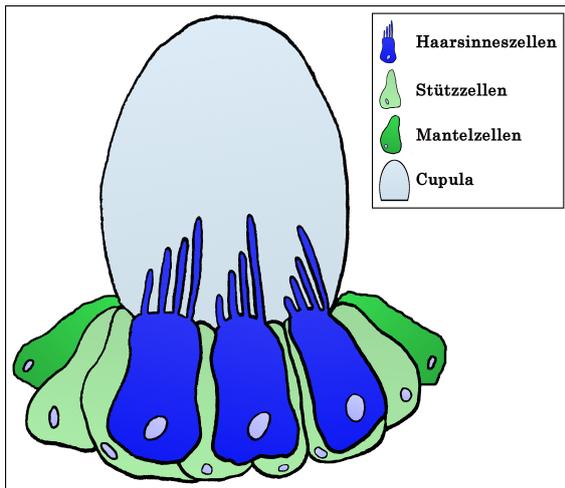
Aman et al. (2011) konnten jedoch zeigen, dass eine Inhibierung des Fgf-Signalweges zu einem nahezu vollständigen Verlust der Proliferation führt, während die Hemmung des Wnt-Signalweges lediglich zu einer verringerten Zellteilungsrate führt. In welcher Art und Weise der Fgf-Signalweg die Proliferation beeinflusst, konnte noch nicht gezeigt werden.

Gelangen die pseudomesenchymalen Zellen in die *Trailing-Zone*, nimmt die Aktivität des Wnt-Signalweges stetig ab und auf die pseudomesenchymalen Zellen wirken verstärkt Signale des Fgf-Signalweges. Diese Signaländerung führt zur Differenzierung der pseudomesenchymalen zu epithelialen Zellen. Differenziert sich eine Zelle, so induziert sie in den umliegenden pseudomesenchymalen Zellen die Differenzierung. In regelmäßigen Abständen unterbleibt jedoch in einer pseudomesenchymalen Zelle die Differenzierung, wodurch die apikale Konstriktion der umliegenden Zellen ausgelöst wird. Epithelialzellen, welche verstärkt Tight-Junction-Proteine, Adherens Junctions und Desmosomen exprimieren, ordnen sich dabei rosettenförmig um die im mesenchymalen Charakter verbleibende Zelle an und führen damit zur Ausbildung der Protoneuromasten in der *Trailing-Zone* (Lecaudey et al. 2008). Befinden sich drei Protoneuromasten in der *Trailing-Zone*, so wird der reifste, am weitesten rostral gelegene Protoneuromast abgesetzt. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Hypothesen dazu aufgestellt, welche Signale das Absetzen der Protoneuromasten regulieren. Aman et al. (2011) gehen zu einem von einer möglichen Regulation durch den Chemokinrezeptor *Cxcr7b* aus, welcher in der *Trailing-Zone* und dort verstärkt im abzusetzenden Protoneuromasten exprimiert wird. Zum anderen beschreiben sie, dass die Zellzahl des Primordiums entscheidend für die Absetzung eines Protoneuromasten ist. Demnach nimmt die Zellproliferation im Primordium ab, wenn sich drei Protoneuromasten in der *Trailing-Zone* befinden. Infolgedessen wird die Absetzung des reifsten Protoneuromasten induziert und die Proliferation wieder erhöht. Durdu et al. (2014) beschreiben eine weitere Möglichkeit, bei der Signale des Fgf-Signalweges die Absetzung der Protoneuromasten regulieren.

### 1.1.3 Vom Protoneuromasten zum Neuromasten

Die in der *Trailing-Zone* gebildeten Protoneuromasten bestehen aus etwa 30 undifferenzierten Epithelzellen, die sich während der Reifung zum Neuromasten in drei Zelltypen differenzieren: die im Zentrum liegenden Haarsinneszellen, die umliegenden Stützzellen und die außenliegenden Mantelzellen (Abb. 1.5).

Durch die einwirkenden Fgf-Liganden aus der *Leading-Zone* wird in der im Zentrum des reifsten Protoneuromastens liegenden Zelle die Expression des membrangebunden Notch-Liganden DeltaA und des Transkriptionsfaktors Atonal homolog 1a (*Atoh1a*) induziert. Daraufhin differenziert sich diese zur sensorischen Haarsinneszelle aus (Nechiporuk und Raible 2008). *Atoh1* ist ein hoch konserviertes Schlüsselprotein in der Differenzierung von Haarsinneszellen und wird in Fischen zeitlebens exprimiert, wohingegen in Säugern die Expression nach der Entwicklung und Reifung der Gehörschnecke stillgelegt wird (Atkinson et al. 2015). Die differenzierte Haarsinneszelle im Protoneuromasten induziert aufgrund des aktiven *Atoh1a* die Expression der Fgf-Liganden *Fgf3* und *Fgf10* sowie eines weiteren membrangebunden Notch-Liganden *DeltaD*. Die umliegenden Zellen exprimieren die



**Abbildung 1.5: Schema eines reifen Neuro-masten.** Ausdifferenzierte Neuro-masten bestehen aus drei Zelltypen. Den im Zentrum liegenden sensorischen Haarsinneszellen (blau), den umliegenden nicht-sensorischen Stützzellen (hellgrün) und den außenliegenden Mantelzellen (dunkelgrün). Die Haarsinneszellen bilden größen-variierende aktin-haltige Stereocilien und ein Kinocilium aus Mikrotubuli aus. Die umliegenden Stützzellen fungieren als Stammzell-Reservoir für die Haarsinneszellen. Eine Monoschicht aus Mantelzellen bildet eine gallertartige Cupula.

### Wahrnehmung von Umgebungsreizen durch die Haarsinneszellen

Die Haarsinneszellen der Neuro-masten bilden zwei Arten von Cilien aus, welche die Epidermis des Embryos und adulten Fisches durchdringen. Diese Cilien bestehen aus mehreren in der Größe variierenden, aktin-haltigen Stereocilien und einem Kinocilium aus Mikrotubuli, dem längsten Cilium. Die Cilien sind der Größe nach angeordnet und stehen über eine Tip-Link-Verbindung miteinander in Kontakt, wodurch sie zu einem Haarbündel zusammengefasst werden (Pickles und Corey 1992). Die Richtung der Auslenkung des Haarbündels entscheidet darüber, ob es zu einer Erregung (Depolarisation) oder einer Hemmung (Hyperpolarisation) der Zelle kommt. Erfolgt die Auslenkung in Richtung des Kinociliums, werden Kalium- und Calcium-Kanäle geöffnet und Neurotransmitter ausgeschüttet. Eine Hyperpolarisation tritt auf, wenn Wasserströmungen oder Druckwellen das Haarbündel in die vom Kinocilium abgewandte Seite auslenken; dabei werden Kalium- und Calciumkanäle geschlossen (Hudspeth 1989, Lecaudey et al. 2008). Die sensorischen Haarsinneszellen werden von dem myelinisierten posterioren Seitenliniennerv (pSLN) innerviert. Die bipolaren Nervenzellen des pSLN projizieren auf Neuronen des *Nucleus octavolateralis* im Hinterhirn, von wo aus die Signalweiterleitung zum *Torus semicircularis*, dem Zentrum des auditorischen Systems, führt (Alexandre und Ghysen 1999, Pujol-Martí und López-Schier 2013). Alexandre und Ghysen (1999) zeigen, dass es sich bei der Projektion der lateralen afferenten Axone um eine somatotopie Projektion handelt, die die Anordnung der Neuro-masten entlang der Körperachse widerspiegelt. Axone des primären pSLN projizieren zusätzlich auf die im Hinterhirn liegenden neuronalen Mauthner-Zellen, deren Stimulation einen Flucht-Reflex auslöst (Pujol-Martí und López-Schier 2013).

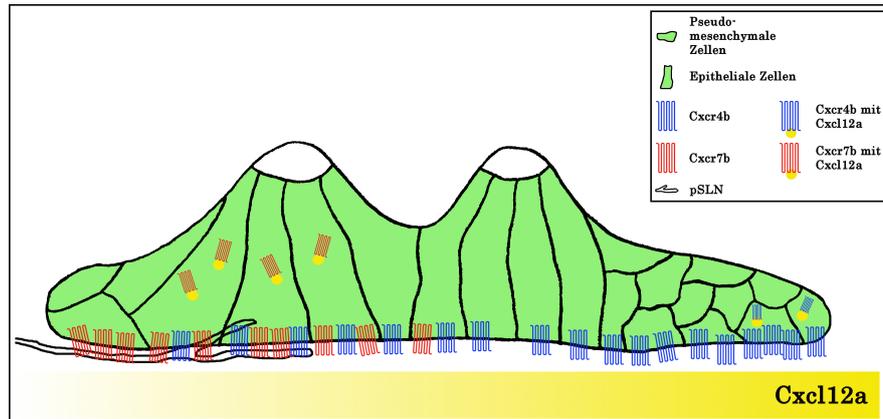
entsprechenden Rezeptoren *Fgfr1a* und *Notch3*. Durch die Bindung der Liganden an die jeweiligen Rezeptoren wird eine laterale Inhibierung der *Atoh1a*-Expression in den umliegenden Zellen aktiviert, wodurch sich diese zu nicht-sensorischen Stützzellen differenzieren (Matsuda und Chitnis 2010). Im Falle einer Verletzung der Haarsinneszellen dienen die Stützzellen als Stammzell-Reservoir. Sie sind in der Lage sich zu Haarsinneszellen zu differenzieren. Die abschließende Zellschicht eines Neuro-masten bildet eine Monoschicht nicht-sensorischer Mantelzellen. Die wichtigste Funktion dieser Zellen ist die Ausbildung einer gallertartigen Cupula, welche die Haarsinneszellen umschließt und sie vor mechanischen Einflüssen schützt (Romero-Carvajal et al. 2015).

## Die Regeneration von Haarsinneszellen

Die sensorischen Haarsinneszellen können durch mechanische Einflüsse, aber auch durch Giftstoffe wie Kupfer oder Aminoglykoside im Wasser angegriffen und verletzt werden. Aminoglykoside, wie Streptomycin oder Neomycin, greifen bereits in geringen Konzentrationen die empfindlichen Sinneszellen an und führen zu deren Zelltod (Harris et al. 2003, Hernández et al. 2007). Die Struktur und Funktion der Haarsinneszellen ist zwischen Fischen, Vögeln und Säugern hoch konserviert. Vögel und insbesondere Fische sind jedoch, im Gegensatz zu Säugern, in der Lage, durch Hochregulierung bestimmter Signalwege, Stützzellen zur Differenzierung in Haarsinneszellen anzuregen (Stone und Cotanche 2007, Jiang et al. 2014).

Die Regeneration der Haarsinneszellen durch Stützzellen kann in Vögeln auf zwei Wege erfolgen. Eine Möglichkeit besteht in der direkten Transdifferenzierung der Stützzellen zur Haarsinneszelle, unter stetigem Verlust der Anzahl an Stützzellen. Die zweite Möglichkeit, wie sie auch bei Fischen auftritt, ist die mitotische Teilung einer Stützzelle in zwei Tochterzellen. Diese können sich entweder zu zwei Haarsinnes- oder je zu einer Haarsinnes- und einer Stützzelle differenzieren (Stone und Cotanche 2007). Zahlreiche Studien fokussierten sich in den vergangenen Jahren verstärkt auf die Regeneration der Haarsinneszellen im pSLO des Zebrafisches um einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Humanmedizin aufzuzeigen (Harris et al. 2003, Wibowo et al. 2011, Jiang et al. 2014, Pinto-Teixeira et al. 2015, Romero-Carvajal et al. 2015, Carrillo et al. 2016, Goo-Lee et al. 2016). Jiang et al. (2014) analysieren die Expressionsmuster wichtiger Signalwege wie Wnt, Notch, Fgf, Jak1/Stat3 und Bmp. Es kann gezeigt werden, dass nach Herbeiführen des Zelltodes die laterale Hemmung für bis zu 5 Stunden vollständig aufgehoben wird, die ruhenden Stützzellen erneut in den Zellzyklus übergehen und durch Mitose proliferieren. In den neu gebildeten Zellen wird die Expression von *Atoh1a* induziert, wodurch die Differenzierung in Haarsinneszellen erfolgt. Nach der Bildung einiger Haarsinneszellen beginnt die laterale Inhibierung wieder zu greifen, indem die Degradierung des Notch- und *Fgfr1a*-Rezeptors aufgehoben wird. Dies ist entscheidend für die kontrollierte Bildung und Differenzierung von Haar- und Stützzellen. Studien an Mäusen zeigen, dass es nach Einleitung des Zelltodes der Haarsinneszellen weder zu einer Hemmung des Notch-, Fgf-Signalweges oder der Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen kommt, noch zu einer Aktivierung des essentiellen Transkriptionsfaktors *Atoh1* (Löwenheim et al. 1999, Chen et al. 2003).

### 1.1.4 Die Migration des Primordiums entlang eines Chemokingradienten



**Abbildung 1.6: Die Migration des Primordiums entlang eines Chemokingradienten.** Die homogene Sekretion des Chemokinliganden Cxcl12a beginnt gegen 18 hpf entlang des horizontalen Myoseptums. Das Primordium kann gegen 24 hpf durch Expression des Chemokinrezeptors Cxcr4b den Liganden wahrnehmen und in Richtung des Cxcl12a migrieren. Cxcr4b bindet diesen, wodurch eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade aktiviert wird und der gebundene Rezeptor internalisiert und recycelt wird. 26 hpf beginnt das Primordium in der *Trailing-Zone* mit der Expression eines zweiten Chemokinrezeptors Cxcr7b. Dieser bindet und internalisiert den Liganden. Infolgedessen wird ein Gradient von Cxcl12a innerhalb des Primordiums generiert. (angelehnt an Bussmann und Raz 2015)

Die kollektive Zellmigration des multizellulären Primordiums erfolgt entlang des horizontalen Myoseptums. Die umliegenden Muskelzellen sezernieren homogen einen Chemokinliganden des Typs CXC: Cxcl12a (auch Sdf1a (Stromal derived factor 1a)). Dieses Chemokin kann an zwei verschiedene Rezeptoren binden: Cxcr4b und Cxcr7b. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um heptahelikale G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die an der Oberfläche des migrierenden PrimI exprimiert werden und bei Bindung von Cxcl12a unterschiedliche Funktionen ausüben (Boldajipour et al. 2008, Donà et al. 2013).

Cxcr4b wird im gesamten Primordium exprimiert, wobei das Expressionslevel nach rostral abnimmt (Donà et al. 2013, Dalle Nogare et al. 2014). Cxcl12a bindet an das N-Terminale Ende von Cxcr4b, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt und das N-terminale Ende des Liganden an die Bindungstasche innerhalb der Membran binden kann (Gupta et al. 2001). Der aktivierte G-Protein-gekoppelte Signalweg führt über Aktivierung der Phospholipase C zu einem Anstieg des Calciumspiegels, was zur Aktivierung weiterer Signalwege führt (Blaser et al. 2006). Über die genaue Funktionsweise des Gegenspielers Cxcr7b ist nur wenig bekannt; ihm wird eine Abbaufunktion des Chemokinligandens zugesprochen (Burns et al. 2006, Boldajipour et al. 2008, Naumann et al. 2010, Donà et al. 2013, Dalle Nogare et al. 2014). Für die Migration in Richtung Schwanzspitze muss eine Polarisation des Primordiums vorliegen. Cxcr7b, welcher in der *Trailing-Zone* von PrimI exprimiert wird, bindet Cxcl12a und internalisiert den Liganden; infolgedessen nimmt die Verfügbarkeit für den schwach exprimierten Cxcr4b im Bereich der *Trailing-Zone* ab. Auf diese Weise wird ein Gradient des Chemokins im Bereich des Primordiums generiert, wonach das Zellcluster in Richtung der erhöhten Konzentration von Cxcl12a migriert (Abb. 1.6) (Donà et al. 2013).

Die Expression der Chemokinrezeptoren wird durch Signale des Wnt- und Fgf-Signalweges reguliert. Aman und Piotrowski (2008) konnten zeigen, dass eine Inhibierung des Fgf-Signalweges (Ausdehnung des Wnt-Signalzentrums) zu einer fehlenden Expression von Cxcr7b und dies zu einem Abbruch der Migration aufgrund des Polarisationsverlustes führt.

## 1.2 Neuronale Zelladhäsionsmoleküle

Die Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten sind grundlegende Prozesse in der Entwicklung von Geweben und Organen. Hauptbestandteil der Bindungen zwischen Zellen sind Cadherine und neuronale Zelladhäsionsmoleküle (*engl.: neural cell adhesion molecules (NCAMs)*) der Immunglobulin-Superfamilie. Letzere sind auch in der Lage, Zell-Matrix-Kontakte auszubilden (Walmod et al. 2004). NCAMs können durch homophile (gleicher NCAM-Typ) und heterophile (anderer NCAM-Typ oder anderes Protein) Bindungen Zellkontakte vermitteln. Neben ihrer Funktion als Adhäsionsmolekül spielen NCAMs auch eine Rolle bei der Zellproliferation und -migration, insbesondere bei der Entstehung und Metastasierung von Krebszellen, aber auch bei der Entwicklung, Wegfindung und Faszikulation von Nervenzellen sowie der Synapsenbildung (Rutishauser et al. 1982, Wong et al. 2011).

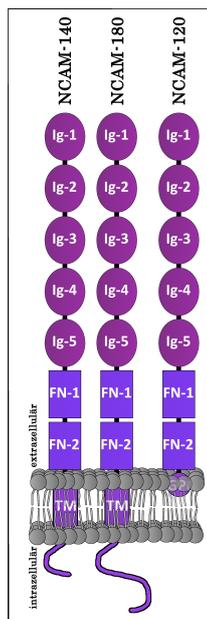
### 1.2.1 Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) besteht aus über 700 Mitgliedern, die sich alle durch einen ähnlichen strukturellen Aufbau auszeichnen. Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig-Domäne), die einzeln oder zu mehreren vorliegen können, bilden den extrazellulären Teil der Proteine. Die 55-75 Aminosäuren großen Ig-Domänen bestehen aus zwei anti-parallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Einige Mitglieder der IgSF verfügen außerdem über Fibronectin-TypIII-Domänen in der extrazellulären Domäne. Ein Großteil der Proteine der Superfamilie weist eine *single-pass*-Transmembrandomäne und eine stark variierende cytoplasmatische Domäne auf (Bork et al. 1994, Harpaz und Chothia 1994, Wong et al. 2011). In der Entwicklung des Nervensystems übernehmen Mitglieder der IgSF, wie das neuronale Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1), Tag-1 (Denaxa et al. 2001), Neurolin (Paschke et al. 1992) oder L1 (Kadmon et al. 1990), wichtige Funktionen in der Ausbildung von Axonen.

## 1.3 Das neuronale Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1)

### 1.3.1 Struktur und Aufbau

Jørgensen und Bock beschrieben 1974 ein synaptisches Membranprotein D2 aus dem Gehirn von Ratten, welches 1977 durch Thiery et al. als neuronales Zelladhäsionsmolekül 1 (NCAM1) entschlüsselt und als erstes Mitglied der IgSF zugeordnet werden konnte. Die Aminosäuresequenz, der strukturelle Aufbau und die hohe Anzahl an Splice-Isoformen von NCAM1 sind hoch konserviert (Walmod et al. 2004). Grundlegend werden drei Hauptisoformen von NCAM1



**Abbildung 1.7:** NCAM-140, Ncam-180 und NCAM-120 bilden die Hauptisoformen des neuronalen Zelladhäsionsmolekül 1.

unterschieden, deren Benennung auf ihr Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) zurückgeführt wird: NCAM-140, NCAM-180 und NCAM-120 (Abb. 1.7) (Edelman und Chuong 1982, Hemperly et al. 1986, Small et al. 1987). Allen gemein ist der strukturelle Aufbau des extrazellulären Bereichs. Das N-terminale Ende bilden 5 Ig-ähnliche Domänen, an die sich zwei Fibronectin-TypIII-Domänen anschließen. NCAM-140 und NCAM-180 weisen eine *single-pass*-Transmembrandomäne auf und variieren lediglich in der Länge der cytoplasmatischen Domäne (Cunningham et al. 1987). NCAM-120 hingegen verfügt über keinen cytoplasmatischen Bereich und ist mit einem Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Membran verankert (Gennarini et al. 1984, Hemperly et al. 1986). Neben den membranengebundenen Isoformen sind auch lösliche Isoformen von NCAM1 bekannt (He et al. 1986, Gower et al. 1988). Die genetische Variabilität kann weiter durch

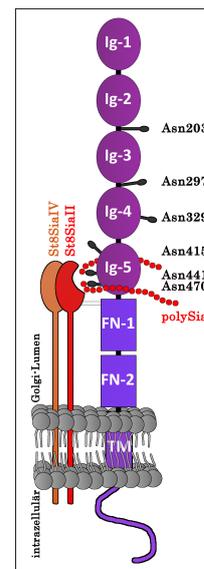
die in der vierten Ig-Domäne liegende VASE-Sequenz (*variable alternatively spliced exon*) erhöht werden, welche durch alternatives Splicen in NCAM1 auftreten und Einfluss auf Interaktionspartner nehmen kann. NCAM1 mit und ohne VASE-Sequenz liegen etwa zu gleichen Verhältnissen im Organismus vor (Small et al. 1988, Chen et al. 1994, Williams et al. 1994a).

### 1.3.2 Glykosylierung von NCAM1

Posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Funktionalität eines Proteins auf vielfältige Weise. NCAM1 kann auf unterschiedlichste Art posttranslational modifiziert werden (Mackie et al. 1989, Little et al. 1998, Albach et al. 2004, Bonfanti 2006).

Die wichtigste posttranslationale Modifikation von NCAM1 stellt die N-Glykosylierung durch das Anheften des Zuckers Sialinsäure dar. Die Anheftung mehrerer Sialinsäuren führt zur Bildung von Polysialinsäure (polySia), welche NCAM1 negativ auflädt und seine Funktion als Zelladhäsionsmolekül maßgeblich beeinflusst (Bonfanti 2006). NCAM1 verfügt über 6 Asparagin-N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne: Asn203 (zwischen Ig-2 und Ig-3), Asn297 (zwischen Ig-3 und Ig-4), Asn329 (Ig-4), Asn415, Asn441 und Asn470 (Ig-5) (Albach et al. 2004). Die Anheftung der einzelnen Sialinsäurebausteine an NCAM1 findet im Golgi-Apparat durch die in Vertebraten exprimierten Sialyltransferasen St8SiaII und St8SiaIV statt (Abb. 1.8). Diese binden an die erste Fibronectin-TypIII-Domäne von NCAM1 und heften bis zu 100 einzelne Sialinsäurebausteine an die N-Glykosylierungsstellen von Ig-5. Die Verbindung der einzelnen Bausteine erfolgt durch eine  $\alpha$ -2,8-glykosidische Bindung (Hinderlich et al. 1997). Die Sialyltransferasen bevorzugen die Glykosylierung des Asn470, welches die am meist C-terminal gelegene Glykosylierungsstelle darstellt. Glykosylierungen

des Asn441 und Asn415 sind jedoch auch möglich (Walmod et al. 2004, Gascon et al. 2007). Die Expression der Sialyltransferasen St8SiaII und St8SiaIV unterliegt einer strengen zeitlichen Regulierung während der Entwicklung und Aufrechterhaltung des Nervensystems. Die Expression von St8SiaII erfolgt verstärkt während der embryonalen Entwicklung, wohingegen St8SiaIV vermehrt im adulten Organismus zu finden ist (Marx et al. 2007). PolySia ionisiert das NCAM1-Protein, wodurch sich voluminöse Hydrathüllen ausbilden, die die Funktion von NCAM1 beeinflussen (Rutishauser 2008). Die Reduktion der zelladhäsiven Eigenschaften von NCAM1 durch Anheftung von polySia ermöglicht die neuronale Zelldifferenzierung und -migration, das Auswachsen von Neuriten, die synaptische Plastizität sowie die Faszikulation und Regeneration von Axonen. Desweiteren können Interaktionen mit möglichen Interaktionspartnern beeinflusst werden (Bonfanti 2006, Schober 2016).



**Abbildung 1.8: Posttranslationale Modifikation von NCAM1 durch Polysialinsäure.** Die Golgi-assoziierten Sialyltransferasen St8SiaII und St8SiaIV binden an die erste Fibronektin-Domäne (FN-1) von NCAM1 und katalysieren die Anheftung einzelner N-Acetylneuraminsäuren an die N-Glykosylierungsstellen Asparagin 441 und 470 (Asn) der 5. Ig-Domäne (Ig-5). Bis zu 100  $\alpha$ -2,8-glykosidisch verbundene N-Acetylneuraminsäuren können gebunden werden und bilden Polysialinsäure (polySia). (angelehnt an Schnaar et al. 2014)

### 1.3.3 Interaktionspartner von NCAM1

Das Auswachsen von Neuriten und deren Wegfindung sowie die Migration von Zellclustern erfordern eine dynamische und rasche Wechselwirkung zwischen einzelnen Proteinen. NCAM1, das an diesen Prozessen beteiligt ist, kann sowohl homophile als auch heterophile Interaktionen ausbilden und auf diese Weise verschiedene Signalwege regulieren.

#### Homophile Interaktionen

Homophile Interaktionen von NCAM1 sind Gegenstand zahlreicher kontrovers diskutierter Studien (Rao et al. 1992, Ranheim et al. 1996, Kiselyov et al. 1997, Atkins et al. 1999, Soroka et al. 2003, Kiselyov et al. 2003 und 2005). Gegenwärtig wird von einem 3-Schritt-Interaktionsprozess ausgegangen, welcher es ermöglicht, dass NCAM1 sowohl in *cis* (gleiche Zellmembran) als auch in *trans* (benachbarte Zellmembran) homophil interagieren kann. In einem ersten Schritt kommt es zur Dimerisierung in *cis* durch Interaktion aromatischer Aminosäuren der Ig-Domänen 1 und 2 (Soroka et al. 2003). Dieser Schritt ist für eine Bindung in *trans* essentiell. Die Interaktion in *trans* erfolgt nach einem Reißverschlussmechanismus bei dem, je nach den beteiligten Ig-Domänen, zwischen einem *Compact-Zipper* und einem *Flat-Zipper* unterschieden wird (Soroka et al. 2003, Kiselyov et al. 2005). Bei einem *Compact-Zipper* inter-

agiert ein *cis*-Dimer über die Domänen Ig-1-3 reziprok mit den Domänen Ig-1-3 eines *cis*-Dimer in *trans*. Bei einem *Flat-Zipper* interagieren in wechselseitiger Weise die Domänen Ig-2 und -3 miteinander. In einem dritten Schritt ist es nun möglich, einen so genannten *Compact-Flat-Doppel-Zipper* auszubilden, an dem zahlreiche NCAM1-Moleküle beteiligt sind (Soroka et al. 2003, Kiselyov et al. 2005). Weiterhin ist es möglich, dass eine Interaktion in *trans* auch durch reziproke Bindung aller Ig-Domänen erfolgen kann (Ranheim et al. 1996).

## Heterophile Interaktionen

Aufgrund ihrer hoch konservierten Struktur gehen viele Mitglieder der IgSF Interaktionen mit NCAM1 ein. Nah verwandte neuronale Proteine wie L1 oder Tag-1 sind in der Lage mit NCAM1 in *trans* zu interagieren. Eine *cis*-Dimerisierung von NCAM1 wird bei dieser Interaktion ebenfalls vorausgesetzt. L1 bindet an die in der vierten Ig-Domäne befindliche Kohlenhydrat-Erkennungssequenz des NCAM1-Dimers; infolgedessen wird L1 phosphoryliert und der Neuritenauswuchs stimuliert (Horstkorte et al. 1993, Heiland et al. 1998). Tag-1 kann sowohl Interaktionen mit *trans*-NCAM1-Dimeren, als auch in *cis* mit L1 eingehen (Milev et al. 1996, Malhotra et al. 1998), was in der Theorie einen NCAM1-Tag-1-L1-Komplex ermöglicht.

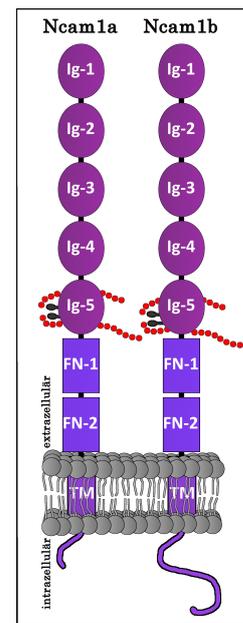
NCAM1 vermittelt nicht nur Zell-Zell-Kontakte, sondern kann auch mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie z.B. Heparin oder Heparansulfaten interagieren. Diese binden nicht nur an die Erkennungssequenz zwischen der ersten und zweiten Ig-Domäne, sondern sind auch in der Lage, mit Polysialinsäure zu interagieren (Storms et al. 1996, Storms und Rutishauser 1998).

Im Fokus dieser Arbeit steht die Interaktion der Ncam1-Paraloge Ncam1a und Ncam1b mit dem Fibroblast Growth Factor Receptor 1a (Fgfr1a) des Zebrafisches.

### 1.3.4 Das neuronale Zelladhäsionsmolekül Ncam1 in *Danio rerio*

In der Evolution der Knochenfische kam es zu einer Genom-Duplikation, wodurch nahezu alle Gene in doppelter Ausführung vorliegen (Vandepoele et al. 2003). Der Zebrafisch exprimiert daher auch zwei Paraloge des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls Ncam1: Ncam1a und Ncam1b (Abb. 1.9). Der allgemeine Aufbau dieser Proteine unterscheidet sich nicht, jedoch weisen sie Unterschiede im extrazellulären und im cytoplasmatischen Bereich auf (Mizuno et al. 2001, Dietzsch 2008, Langhauser et al. 2012). Nach der Genduplikation ist es zu einer Subfunktionalisierung von Ncam1a und Ncam1b gekommen, wobei sich die ursprüngliche Funktion auf die Paraloge verteilt, sodass sich diese in ihrer Funktion während der Ausbildung und Faszikulation von Axonen, deren Wegfindung und der Entwicklung des pSLO unterscheiden (Heiny 2012, Langhauser et al. 2012, Dries 2014, Schober 2016). Ncam1a und Ncam1b, welche eine Homologie von 65 % aufzeigen, können nach Mizuno et al. (2001) beide die VASE-Sequenz (10 Aminosäuren) enthalten, wobei Ncam1b über eine weitere, alternative VASE-Sequenz von 18 Aminosäuren verfügt.

Bereits 11 hpf können die Ncam1-Paraloge im sich bildenden Neuralrohr detektiert werden, wobei Ncam1a verstärkt im rostralen Bereich und Ncam1b im caudalen Bereich auftritt. In der weiteren Entwicklung werden Ncam1a und Ncam1b auf nahezu allen neuronalen Zellkörpern des zentralen Nervensystems exprimiert, unterscheiden sich jedoch in der Expression auf Axonen, in Bereichen des Gehirns und des pSLO (Dietzsch 2008, Heiny 2012, Langhauser et al. 2012, Dries 2014, Schober 2016). Eine durch Morpholino-*Knockdown* reduzierte Expression von *ncam1a* führt zur Defaszikulation der auswachsenden Motoraxonen und der am Diencephalon befindlichen posterioren Kommissur. Der Morpholino-*Knockdown* von *ncam1b* führt hingegen zu Fehlleitungen in der Wegfindung der Motoraxone (Langhauser et al. 2012, Schober 2016). Heiny (2012) und Dries (2014) konnten in ersten Versuchen zeigen, dass Ncam1a und Ncam1b wichtige Funktionen in der Entwicklung des pSLO übernehmen und dass insbesondere eine Reduktion der Expression von Ncam1b zu einem stark veränderten Phänotypen des pSLO führt. Die in den Studien beobachteten Phänotypen stimmen mit dem Expressionsmuster der Paraloge überein. Langhauser et al. (2012) konnten außerdem zeigen, dass beide Paraloge durch die Sialyltransferase St8SiaII polysialyliert werden können. Diese posttranslationale Modifikation beeinflusst homophile und heterophile Wechselwirkungen von Ncam1a, nicht aber von Ncam1b (Schober 2016).



**Abbildung 1.9: Die Ncam1-Paraloge des Zebrafisches: Ncam1a und Ncam1b.** Durch eine Genduplikation des Ncam1-Genes werden im Zebrafisch zwei Paraloge, Ncam1a und Ncam1b, exprimiert. Die extrazelluläre Domäne besteht je aus 5 Ig-ähnlichen Domänen (Ig-1-5) und zwei Fibronektin-TypIII-Domänen (FN-1 und 2). Bei der Transmembrandomäne (TM) handelt es sich um eine einzelgängige Domäne. Im Bereich des zytoplasmatischen Teils variieren die Paraloge stark. Ncam1b zeigt eine größere zytoplasmatische Domäne auf. Ncam1a und Ncam1b können posttranslational durch die Anheftung von Polysialinsäure modifiziert werden.

## 1.4 Der Fibroblast Growth Factor-Signalweg

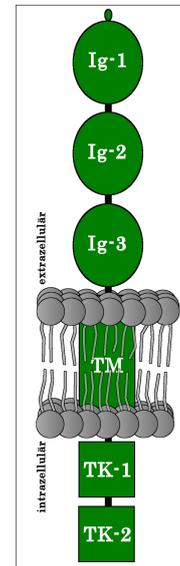
1973 wurde erstmals aus der Hypophyse von Rindern ein Protein isoliert, welches das Wachstum von 3T3 Fibroblasten in Kultur stimulierte und später als Fibroblast Growth Factor (FGF) beschrieben wurde (Armelin 1973). In den folgenden Jahrzehnten wurden in Säugern 22 verschiedene FGFs isoliert, welche aufgrund von biochemischen Eigenschaften in 5 Unterfamilien gegliedert werden können (Ornitz und Itoh 2015). Ein Großteil dieser Liganden bindet an FGF-Rezeptoren, was zur Autophosphorylierung des Rezeptors führt und den FGF-Signalweg aktiviert. Dieser übt während der Embryonalentwicklung von Vertebraten essentielle Funktionen aus, die die Proliferation, Differenzierung und Migration von Zellen und deren Zusammenschluss zu Geweben und Organen ermöglichen (Ornitz und Itoh 2015). Im adulten Zustand spielt der FGF-Signalweg eine grundlegende Rolle in der Wundheilung ins-

besondere des cardiovascularen Systems (Yu et al. 2017). Mutationen der FGF-Rezeptoren können zu einer Vielzahl von Tumorbildungen führen (Babina und Turner 2017).

### 1.4.1 Struktur, Aufbau und Domänen des FGF-Rezeptors

Lee et al. (1989) beschrieben erstmals einen Tyrosinkinase-Rezeptor in der IgSF, der in Membran-Fractionen von Hühnerembryonen den bereits bekannten Liganden FGF2 bindet und infolgedessen phosphoryliert wird und zunächst als FLG-Rezeptor (*Fms-like gene*) bezeichnet wurde. Spätere Sequenzanalysen und die spezifische Bindung verschiedener FGF-Liganden zeigten, dass es sich hierbei um den spezifischen Rezeptor Fibroblast Growth Factor-Receptor (FGFR) handelt. In der Zwischenzeit sind 5 FGF-Rezeptoren (FGFR1-5) in Säugern bekannt, deren Aufbau sehr ähnlich ist (Abb. 1.10) (Ornitz und Itoh 2015). Am N-terminalen Ende der extrazellulären Domäne befindet sich eine hydrophobe Signalsequenz. Darauf folgen drei Ig-ähnliche Domänen und eine *single pass*-Transmembrandomäne. Der cytoplasmatische Bereich besteht aus zwei Tyrosinkinase-Domänen (Johnson und Willimas 1992, Ornitz und Itoh 2015). Eine Besonderheit stellt der kürzlich isolierte FGFR5 dar, da er keine Tyrosinkinase-Domäne besitzt, dennoch aber in der Lage ist FGF-Liganden zu binden (Wiedemann und Trueb 2000). Die Rolle dieses Rezeptors ist noch nicht vollständig verstanden, so dass ihm zum einen eine Funktion als nicht aktivierbarer FGF-Liganden-Fänger zugesprochen wird. Zum anderen deuten neuere Forschungsergebnisse auf eine Funktion in der Zelladhäsion hin (Yang et al. 2016).

Der extrazelluläre Bereich der FGF-Rezeptoren verfügt über eine Vielzahl von Erkennungs- und Interaktionssequenzen. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Erkennungs- und Bindedomäne für Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) zwischen der ersten und zweiten Ig-Domäne des FGFR1 (Ornitz und Itoh 2015). Yayon et al. (1991) konnten zeigen, dass die Bindung von HSPGs-FGF an den FGFR1 die Bindung von FGF und FGFR1 stabilisiert. Die Aktivierung des FGF-Signalweges setzt eine Dimerisierung des FGF-Rezeptors voraus. Ein einzeln vorliegender Rezeptor mit gebundenem Liganden zeigt eine erhöhte Präferenz zur Dimerisierung, wenn kovalent HSPGs gebunden sind. Dadurch wird die Aktivierung des Signalweges stimuliert (Wu et al. 2003). Desweiteren treten im extrazellulären Bereich CAM-Homologie-Domänen (Cell Adhesion Molecule) auf, welche eine Interaktion von NCAM1 mit dem FGF-Rezeptor stimulieren (siehe 1.4.2). Der extrazelluläre Bereich unterliegt einer hohen Variabilität durch alternatives Spleißen, weshalb aus Mäusen und Ratten bis zu 12 Splice-Isoformen des FGFR1 isoliert wurden (zusammengefasst in Groth und Lardelli 2002). Für



**Abbildung 1.10: Struktureller Aufbau des FGF-Rezeptors.** Der extrazelluläre Bereich des FGF-Rezeptors bilden drei Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig-1-3). Bei der Transmembran-Domäne (TM) handelt es sich um eine einseitig durchgehende (*single pass*) Domäne. Der cytoplasmatische Teil wird von zwei Tyrosinkinase-Domänen (TK-1-2) gebildet. Am N-terminalen Ende des extrazellulären Bereichs befindet sich eine Signalsequenz.

die vorliegende Arbeit, die sich mit einer möglichen Interaktion der Ncam1-Paraloge mit dem FGFR1a des Zebrafischs befasst, sind die Isoformen FGFR1-IIIb und FGFR1-IIIc von großer Bedeutung. Durch alternatives Spleißen liegt der C-terminale Bereich der dritten Ig-Domäne des FGFR1 in zwei unterschiedlichen Formen vor (Johnson et al. 1991). Kiselyov et al. (2003) und Christensen et al. (2011) konnten in Mäusen und Ratten zeigen, dass dieser Bereich die Bindung von NCAM1 reguliert und dass die Isoformen IIIb und IIIc eine unterschiedliche Affinität zu NCAM1 aufweisen. Durch die Expression zweier Ncam1-Paraloge im Zebrafisch, bei welchen eine Subfunktionalisierung vermutet wird, ist es von besonderem Interesse den Einfluss von Ncam1a und Ncam1b auf den Fgf-Signalweg zu untersuchen.

### 1.4.2 Die Interaktion von NCAM1 und FGFR1

Die Entwicklung von Nervensystemen benötigt ein komplexes und feinreguliertes Zusammenspiel von Proteinen auf den Wachstumskegeln und Axonen von Neuronen mit Proteinen auf benachbarten Axonen oder Zellen in ihrer Umgebung. Während des Auswachsens und der Wegfindung von Axonen werden auf dem Wachstumskegel bei Mäusen und Ratten verstärkt NCAM1 und FGFR1 und 2 exprimiert (Williams et al. 1994a). Williams et al. (1994a) konnten zeigen, dass die FGF-Rezeptoren 1 und 2 eine CAM-Homologie Domäne zwischen der ersten und zweiten Ig-Domäne aufweisen. Diese spezifische Basenabfolge findet sich ebenso in der VASE-Sequenz von NCAM1 wieder. Eine Antikörper-Blockierung dieser Sequenz führt zum Stopp des Neuritenauswuchses, weshalb Williams et al. (1994a) davon ausgingen, dass NCAM1 und FGFR1 in diesem Bereich interagieren und Einfluss auf die Ausbildung des Nervensystems nehmen. Durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie konnten Kiselyov et al. (2003) jedoch zeigen, dass die Bindung und Interaktion von NCAM1 und FGFR1 nicht ausschließlich in der CAM-Domäne stattfindet. Die Interaktion wird zusätzlich durch Bindestellen zwischen den FN-TypIII-Domänen von NCAM1 mit der 2. und 3. Ig-Domäne des FGF-Rezeptors 1 stimuliert. Kochoyan et al. (2008) beschreiben eine zusätzliche Bindung der Ig-2 Domäne zusammen mit der Ig-3 Domäne des FGFR1 an beide FN-TypIII-Domänen von NCAM1, wenn dieses als *Compact-Flat-Doppel-Zipper* vorliegt. Folglich könnte die CAM-Domäne eher als Erkennungssequenz dienen, die eine Interaktion beider Proteine initiiert.

Seit den ersten Hinweisen über eine Interaktion von NCAM1 und dem FGFR1 wird über den Signalweg spekuliert, den diese Interaktion auslöst. Es wird vermutet, dass der ausgelöste Signalweg zu einem erhöhten Calcium-Spiegel in Neuronen führt, was die Differenzierung, Migration und Neuritenwachstum der Zellen stimulieren könnte (Williams et al. 1992). Die Bindung von NCAM1 führt zu einer Phosphorylierung der Thyrosinkinasen des FGFR1, wodurch dieser aktiviert wird. Adapter-Proteine werden phosphoryliert, welche die PhospholipaseC $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) aktivieren und dadurch einen Calcium-Einstrom in die Neuronen auslösen. Dadurch werden das Neuritenwachstum und die Zelladhäsion stimuliert (Williams et al. 1994b, Francavilla et al. 2009). Eine zweite Signalkaskade, die durch die Interaktion von NCAM1 und FGFR1 ausgelöst wird, ist die Rekrutierung des Adaptorproteins Src und die nachstehende Phosphorylierung und Aktivierung von Erk1/2, was zur Förderung der Zellmigration führt (Francavilla et al. 2009).

## 1.5 Zielsetzung

Im Modellorganismus *Danio rerio* werden die zwei Ncam1-Paraloge Ncam1a und Ncam1b exprimiert, die unterschiedliche Funktionen in der Entwicklung des ZNS, insbesondere in der Ausbildung von Motoraxonen, ausüben (Mizuno et al. 2001, Dietzsch 2008, Langhauser et al. 2012, Schober 2016). Neben seinen Funktionen in der Entwicklung neuronaler Strukturen und Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität, wird NCAM1 in Säugern verstärkt in karzino-genen Zellclustern nachgewiesen (Amoureux et al. 2010). Sowohl die (neuronal) Embryonal-entwicklung sowie die Tumorbildung setzen die Etablierung migrierender Zellverbände voraus. Das posteriore Seitenlinienorgan (pSLO) des Zebrafischs stellt ein zugängliches Modell für die Bildung migrierender Zellverbände und die Entwicklung neuronaler Strukturen dar.

Die vorliegende Arbeit baut auf institutsinternen Studien auf, aus welchen hervorgeht, dass sowohl Ncam1a als auch Ncam1b in den Strukturen des pSLO exprimiert werden (Heiny 2012, Dries 2014). Ein durch Morpholino-Injektion herbeigeführter *Knockdown* von *ncam1b* führt zu einer stark veränderten Entwicklung des pSLO. Die Bildung von Neuromasten, die zur neuronalen Reizweiterleitung von Umwelteinflüssen unabdingbar sind, bleibt in Morphanten aus. Zusätzlich wird die Migration und Größe des Primordiums negativ beeinflusst. Diese Effekte treten in einem weitaus geringeren Maß auch bei einem *Knockdown* von *ncam1a* auf, was auf eine Subfunktionalisierung der Ncam1-Paraloge im Zebrafisch hindeutet. Die Entwicklung des pSLO beruht auf einem komplexen, antagonistisch wirkenden *Feedback Loop* zwischen den Signalwegen Wnt und Fgf. Eine Inhibierung des Fgf-Signalwegs führt, wie bei *ncam1b*-Morphanten, zu einer reduzierten Migrationsgeschwindigkeit des Primordiums und zu einem Verlust von Neuromasten (Lecaudey et al. 2008). Es stellt sich die Frage, ob Ncam1b mit Fgfr1a interagiert und dadurch die Entwicklung des pSLO im Zebrafisch beeinflusst. Hierfür wird zunächst die Proliferationsrate im pSLO untersucht. In einem weiteren Schritt werden *in situ* Hybridisierungen des Fgf-Zielgens *erm* in *ncam1b*-Morphanten durchgeführt, um die Fgfr1a-Aktivität zu überprüfen. Außerdem werden verschiedene Isoformen des Fgfr1a aus dem Zebrafisch isoliert. Zellkulturexperimente und Bead-Aggregations-Assays werden eingesetzt, um mögliche Interaktionen der Ncam1-Paraloge mit den Isoformen des Fgfr1a nachzuweisen. Ein weiteres Teilprojekt dieser Arbeit befasst sich mit der Regeneration von human-homologen Haarsinneszellen im Zentrum der Neuromasten. Sensorische Haarsinneszellen entwickeln sich durch Differenzierung von nicht-sensorischen Stützzellen unter der Expression neuronaler Proteine und spezifischer Haarsinneszell-Marker wie *Atoh1a* und *Otoferlin*. Expressionsstudien in unreifen und differenzierten Haarsinneszellen werden durchgeführt, um die Rolle der Ncam1-Paraloge in den motosensorischen Organen aufzuzeigen. Toxinbehandlungen mit Neomycin sollen zeigen, ob Ncam1a und Ncam1b eine Funktion in der Regeneration von Haarsinneszellen übernehmen. Als möglicher Interaktionspartner von Fgfr1a und als neuronales Zelladhäsionsmolekül könnte Ncam1 eine doppelte Rolle bei der Differenzierung einer nicht-sensorischen in eine sensorische Zelle spielen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Kulturmedien und Antibiotika

##### Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, in höchster analytischer Reinheit (*p.a.*) von den Firmen Carl Roth GmbH und Co KG (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Für Arbeiten mit RNA wurden Chemikalien der Firmen Roche und Peqlab gewählt (Tab. 2.1). Experimentspezifische Chemikalien sind gesondert in Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tabelle 2.1:** Chemikalien und Reagenzien der Firmen Roche und Peqlab

| Name                    | Anwendung   | Bezugsquelle            |
|-------------------------|---|-------------------------|
| Blocking Reagent        | Blockierlösung in der <i>in situ</i> Hybridisierung | Roche<br>(#11096176001) |
| NBT/BCIP Stock Solution | Färbereagenz in der <i>in situ</i> Hybridisierung   | Roche<br>(#1168145100)  |
| peqGold Trifast         | RNA-Extraktion aus Embryonen                        | Peqlab<br>(#30-2010)    |

**Tabelle 2.2:** Experimentspezifische Chemikalien

| Name                        | Anwendung  | Bezugsquelle              |
|-----------------------------|--|---------------------------|
| BrdU                        | Proliferationsassay                                  | Sigma-Aldrich<br>(#B5002) |
| DAPT                        | Inhibierung des Notch-Signalwegs                     | Sigma-Aldrich<br>(#D5942) |
| Phenolrot                   | Injektionsfarbstoff                                  | Sigma-Aldrich<br>(#PO290) |
| RNase-freies Wasser         | Lösen von RNA  | Qiagen<br>(#129112)       |
| Roti-Blue,<br>5x Konzentrat | Coomassie-Färbung                                    | Carl Roth<br>(#A152.1)    |
| Roti-Gel Stain              | Nicht-toxische Fluoreszenz-Färbung von Nukleinsäuren | Carl Roth<br>(#3865.1)    |

## Puffer und Lösungen

Alle Puffer (Tab. 2.3) und Lösungen (Tab. 2.4) wurden autoklaviert oder aus sterilen Stammlösungen hergestellt. Nicht autoklavierbare Puffer oder Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen filtriert.

Doppeldestilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) wurde aus einem Reinstwassersystem der Firma Elga Veolia gewonnen und anschließend autoklaviert.

Lösungen für Arbeiten mit RNA wurden zuvor mit Diethyldicarbonat (DEPC) (1:100) behandelt, autoklaviert und werden im Folgenden mit <sup>DT</sup> angegeben.

**Tabelle 2.3:** Puffer

| Name   | Zusammensetzung  | Anwendung  |
|--|--|--|
| Hybridisierungspuffer - (Hyb-)   | 50 % Formamid<br>5x SSCT (20x)<br>0,1 % Tween-20 (20 %)<br>9 mM Zitronensäure (1 M)  | <i>in situ</i> Hybridisierung                                      |
| Laemmli (10x)  | 0,25 M Tris<br>1,92 M Glycin<br>1 % SDS<br>pH 8,2  | Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE                                 |
| MAB  | 100 mM Maleinsäure<br>150 mM NaCl<br>pH 7,5  | <i>in situ</i> Hybridisierung                                      |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (10x)<br><i>analog: PBS<sup>DT</sup> (10x)</i> | 1,37 M NaCl<br>27 mM KCl<br>100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>pH 7,4                   | Waschpuffer  |
| Phosphatpuffer (4x)  | 77 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1x H <sub>2</sub> O<br>291 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12x H <sub>2</sub> O<br>pH 7,4 | Waschpuffer für <i>Wholemout</i> -immunhistochemische Färbung      |
| ProteinG HP HiTrap Bindepuffer   | 20 mM PBS<br>pH 7  | Gewinnung löslicher rekombinanter Proteine aus Zellkulturüberstand |
| ProteinG HP HiTrap Elutionspuffer  | 0,1 M Glycin-HCl<br>pH 2,7   |  |
| ProteinG HP HiTrap Neutralisationspuffer   | 1 M Tris-HCl<br>pH 9   |  |
| Sammelgelpuffer (4x)   | 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8<br>0,4 % SDS  | Herstellung von Acrylamidgelen                                     |

**Tabelle 2.3:** Puffer - Fortsetzung

| Name                    | Zusammensetzung   | Anwendung                                |
|-------------------------|---|--|
| SDS-Probenpuffer (3x)   | 187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8<br>6 % SDS<br>30 % Saccharose<br>Bromphenolblau       | SDS-PAGE                                 |
| SSC <sup>DT</sup> (20x) | 3 M NaCl<br>300 mM C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> | <i>in situ</i> Hybridisierung            |
| TAE (10x)               | 400 mM Tris<br>200 mM Essigsäure<br>10 mM EDTA<br>pH 8                          | Elektrophorese-Puffer<br>für Agarosegele |
| TBS                     | 20 mM Tris-HCl, pH 7,5<br>150 mM NaCl   | Western Blot                             |
| Trenngelpuffer (4x)     | 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8<br>0,4 % SDS   | Herstellung von<br>Acrylamidgelen        |
| Western Blot-Puffer     | 146,5 mM Glycin<br>19,8 mM Tris<br>75 % ddH <sub>2</sub> O<br>25 % MeOH         | Blot-Puffer für SDS-PAGE                 |

**Tabelle 2.4:** Lösungen

| Name  | Zusammensetzung   | Anwendung                                    |
|---|---|--|
| Acrylamid-Sammelgel                                   | 17 % Acrylamid-Rotiphorese<br>Gel (30 %)<br>13,8 % Trenngelpuffer (4x)<br>1 % APS (10 %)<br>0,2 % TEMED | Gelelektrophorese von<br>Proteinen           |
| Acrylamid-Trenngel<br>(10 %)                          | 33 % Acrylamid-Rotiphorese<br>Gel (30 %)<br>26 % Sammelgelpuffer (4x)<br>1 % APS (10 %)<br>0,06 % TEMED | Gelelektrophorese von<br>Proteinen           |
| Agarose-Gel   | x % (w/v) in 1x TAE   | Gelelektrophorese von DNA<br>und RNA         |
| Blockierlösung <i>in situ</i><br>Hybridisierung (2 %) | 2 % Blocking Reagent<br>in MABT (w/v)   | Blockierung<br><i>in situ</i> Hybridisierung |
| BrdU (10 mM)  | 10 mM BrdU<br>15 % DMSO<br>85 % ddH <sub>2</sub> O  | Überprüfung der<br>Proliferation             |

Tabelle 2.4: Lösungen - Fortsetzung

| Name   | Zusammensetzung  | Anwendung   |
|--|--|---|
| BSA (1 %)                                    | 1 % BSA in 1x PBS (w/v)  | Blockierung immunhistochemische Färbung ZK                            |
| BSA-Blockierlösung (5 %)                     | 5 % BSA in 1x TBST   | Blockierung Western Blot  |
| DAPT (50 $\mu$ M)                            | 50 $\mu$ M DAPT<br>1 % DMSO<br>in 0.5x E2  | Inhibierung des Notch-Signalweges                                     |
| Färbelösung<br><i>in situ</i> Hybridisierung | 0,1 M Tris-HCl (1 M) pH 9,5<br>50 mM MgCl <sub>2</sub> (1 M)<br>0,1 M NaCl (2 M)<br>0,1 % Tween-20 (20 %)<br>1 mM Levamisol (100 mM)<br>1:250 NBT/BCIP | Färbelösung<br><i>in situ</i> Hybridisierung                          |
| Glycin in PBST                               | 2 mg/ml Glycin in PBST   | Inhibierung der ProteinaseK   |
| HCl (2 N)                                    | 13 % HCl (25 %) in ddH <sub>2</sub> O  | Denaturierung BrdU-Epitop   |
| Hybridisierungslösung + (Hyb+)               | 98 % Hyb- (siehe 2.3)<br>1 mg/ml T-RNA (50 mg/ml)<br>50 $\mu$ g/ml Heparin (100 mg/ml)   | <i>in situ</i> Hybridisierung   |
| ISH-Waschlösung 2                            | 75 % Hyb- : 25 % 2x SSCT   | Fixierung der Sonde während<br><i>in situ</i> Hybridisierung          |
| ISH-Waschlösung 3                            | 50 % Hyb- : 50 % 2x SSCT   |   |
| ISH-Waschlösung 4                            | 25 % Hyb- : 75 % 2x SSCT   |   |
| ISH-Waschlösung 5                            | 2x SSCT  |   |
| ISH-Waschlösung 6                            | 0,2x SSCT  |   |
| LiCl (4M)                                    | 4 M LiCl gelöst in ddH <sub>2</sub> O <sup>DT</sup>  | Fällung von RNA   |
| MABT   | 0,1 % Tween-20 (20 %) in MAB   | <i>in situ</i> Hybridisierung   |
| Mowiol (20 %)                                | 60 g Mowiol-488<br>100 ml Glycerin<br>pH 8<br>0,3 ml Thimerosal (0,2 %)  | Mounting  |
| Natriumborhydrid in PBS                      | 1 $\mu$ g/ml in 1x PBS   | Reduktion von Doppelbindungen   |
| Neomycin (300 $\mu$ M)                       | 300 $\mu$ M in 0.5x E2   | Haarsinneszellen-Toxizitätstest                                       |
| ProteinaseK in PBST <sup>DT</sup>            | 10 $\mu$ g/ml in 1x PBST <sup>DT</sup>   | Permeabilisierung <i>in situ</i> Hybridisierung                       |
| PBS/BSA/DMSO                                 | 1 % BSA (w/v)<br>1 % DMSO (v/v)<br>1x PBS  | Antikörperinkubation<br><i>Wholemout</i> -Immunhistochemische Färbung |

Tabelle 2.4: Lösungen - Fortsetzung

| Name                  | Zusammensetzung  | Anwendung  |
|-----------------------|--|--|
| PBST (Tween-20)       | 0,1 % Tween-20 (20 %) in<br>1x PBS <sup>DT</sup>                                       | <i>in situ</i> Hybridisierung                            |
| PBST (Triton)         | 0,1 % Triton X-100 in 1x PBS   | Permeabilisierung von Zellen                             |
| PBST (Triton)         | 0,5 % Triton X-100 in 1x PBS   | Permeabilisierung<br>BrdU-Assay                          |
| PFA in PBS            | 4 % PFA (w/v)<br>10 % 10x PBS <sup>DT</sup><br>0,5 % 1 M NaOH<br>in ddH <sub>2</sub> O | Fixierung<br><i>in situ</i> Hybridisierung<br>und Zellen |
| PFA in Phosphatpuffer | 4 % PFA (w/v)<br>25 % Phosphatpuffer (4x)<br>0,5 % 1 M NaOH<br>in ddH <sub>2</sub> O   | Fixierung Wholemout-<br>immunhistochemische<br>Färbung   |
| PTU                   | 0,003 % PTU in ddH <sub>2</sub> O  | Störung der Pigmentierung                                |
| Roti-Blue             | 60 % ddH <sub>2</sub> O<br>20 % MeOH<br>20 % Roti-Blue                                 | Coomassie-Färbung<br>SDS-PAGE                            |
| SSCT                  | 0,1 % Tween-20 (20 %)<br>in SSC <sup>DT</sup>  | <i>in situ</i> Hybridisierung                            |
| Stopp-Lösung          | 10 % 10x PBS<br>0,2 % 500 mM EDTA<br>0,5 % Tween-20 (20 %)                             | Abstoppen der<br>alkalischen Phosphatase                 |
| TBST (Tween-20)       | 0,05 % Tween-20 (20 %) in<br>1x TBS  | Waschen Western Blot                                     |
| Thimerosal            | 2 % Thimerosal in ddH <sub>2</sub> O   | Verhinderung von Bakterien-<br>kontaminationen           |

### Kulturmedien

Medien zur Kultivierung von Embryonen, Bakterien und Zellen sind Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.5: Kulturmedien

| Name                | Zusammensetzung   | Anwendung                                   |
|---------------------|---|---|
| Danieau-Medium (1x) | 58 mM NaCl<br>0,7 mM KCl<br>0,4 mM MgSO <sub>4</sub> x 7x H <sub>2</sub> O<br>0,6 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub><br>5 mM HEPES<br>0,5 mg/L Methylenblau<br>pH 7,6 | Haltung von Embryonen<br>vor Mikroinjektion |

**Tabelle 2.5:** Kulturmedien - Fortsetzung

| Name   | Zusammensetzung  | Anwendung  |
|--|--|--|
| Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) | PAN-Biotech<br>(#P04-03590)  | Kulturmedium ohne Serum  |
| DMEM + 10% FCS                               | 10% FCS (v/v) in DMEM  | Serumhaltiges Kulturmedium zur Kultivierung und Selektion von Zellen |
| DPBS   | PAN-Biotech<br>(#P04-36500)  | Waschlösung für Zellen   |
| Embryonenmedium E2 (0.5x)                    | 7,5 mM NaCl<br>0,25 mM KCl<br>0,5 mM MgSO <sub>4</sub> x 7x H <sub>2</sub> O<br>75 µM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>0,5 mM CaCl <sub>2</sub><br>0,35 mM NaHCO <sub>3</sub><br>0,5 mg/L Methylenblau | Haltung der Embryonen für Haarsinneszellen Toxizitätstest            |
| Embryonenmedium E3 (1x)                      | 5 mM NaCl<br>0,17 mM KCl<br>0,33 mM MgSO <sub>4</sub><br>0,33 mM CaCl <sub>2</sub>   | Standardmedium zur Haltung von Embryonen                             |
| LB-Miller-Medium                             | 10 g/L NaCl<br>5 g/L Hefeextrakt<br>10 g/L NaCl<br><i>optional:</i> 13 g/L Agar-<br>Agar   | Kultivierung von Bakterienzellen                                     |
| OPTI-CHO<br>+ L-Glutamin (4 mM)              | CD OPTI-CHO-Medium<br>Thermo Fisher Scientific<br>(#12681-011)<br>200 mM L-Glutamin,<br>Thermo Fisher Scientific<br>(#25030-024)   | Serumfreies Expressionsmedium für Zellkultur                         |
| OPTI-MEM ohne Phenolrot                      | Life Technologies<br>(#11058021)   | Transfektionsmedium für Zellen                                       |

## Antibiotika

Alle Antibiotikallösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt oder bereits in löslicher, steriler Form erworben und sind Tabelle 2.6 zu entnehmen.

**Tabelle 2.6:** Antibiotika

| Name       | Endkonzentration | Anwendung                       | Bezugsquelle                      |
|------------|------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Ampicillin | 100 mg/ml        | Bakterienselektion              | Sigma-Aldrich<br>(#A8351)         |
| Geneticin  | 750 µg/ml        | Selektion transfizierter Zellen | Life Technologies<br>(#11811-031) |
| Kanamycin  | 50 mg/ml         | Bakterienselektion              | Carl Roth<br>(#T832-1)            |
| Neomycin   | 300 µM           | Abtöten der Haarsinneszellen    | Sigma-Aldrich<br>(#N1876)         |
| Zeocin     | 750 µg/ml        | Selektion transfizierter Zellen | Invivo Gen<br>(#16D20-MM)         |

### 2.1.2 Kit-Systeme für molekularbiologische und mikrobiologische Arbeiten

Alle genutzten Kit-Systeme wurden in höchster analytischer Reinheit erworben und nach Herstellerangaben gelagert und verwendet. Eine Zusammenstellung der verwendeten Kits ist in Tabelle 2.7 aufgeführt.

**Tabelle 2.7:** Kit-Systeme für molekular- und mikrobiologische Arbeiten

| Name                                    | Anwendung   | Bezugsquelle                      |
|---|---|-----------------------------------|
| Amicon Ultra-0.5 ml 50K                 | Konzentrierung und Umpufferung löslicher Proteine         | Merck<br>(#UFC505008)             |
| Amicon Ultra-15 ml                      | Adapter für große Volumina                                | Merck<br>(#UFC905096)             |
| Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit  | Bradford-Assay  | Thermo Fisher Scientific (#23200) |
| EndoFree Plasmid Maxi Kit               | Maxipreparation von Plasmiden aus Bakterienkulturen       | Qiagen<br>(#12362)                |
| HiTrap ProteinG HP                      | Affinitätschromatographie-Säulen zur Protein-Aufreinigung | GE Healthcare<br>(#17-0404-01)    |
| Lipofectamine 2000 Transfection Reagent | Transfektion von Zellen                                   | Invitrogen<br>(#11668019)         |
| mMessage mMachine Sp6 Kit               | <i>in vitro</i> Transkription <i>ncam1b</i> -mRNA         | Ambion<br>(#AM1340)               |

**Tabelle 2.7:** Kit-Systeme für molekular- und mikrobiologische Arbeiten - Fortsetzung

| Name   | Anwendung   | Bezugsquelle                      |
|--|---|-----------------------------------|
| NEB Stable Competent <i>E.coli</i> (High Efficiency)   | Bakterienzellen mit SOC-Medium                      | NEB (#C3040H)                     |
| ProteinA Purple Fluorescent Particles                  | Bead-Aggregations-Assay                             | Kisker Biotech (#PC-PAFP-0.5)     |
| ProteinA Yellow Fluorescent Particles                  | Bead-Aggregations-Assay                             | Kisker Biotech (#PC-PAFY-0.5)     |
| RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit      | Reverse Transkription                               | Thermo Fisher Scientific (#K1631) |
| SigmaSpin Sequencing Reaction CleanUp                  | Aufreinigung Nukleinsäuren                          | Sigma-Aldrich (#S5059-70EA)       |
| Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate | Detektion von HRP-gekoppelten Antikörpern           | Thermo Fisher Scientific (#34577) |
| QIAprep Spin Miniprep Kit                              | Minipreparation von Plasmiden aus Bakterienkulturen | Qiagen (#27106)                   |
| QIAquick Gel Extraction Kit                            | Gelextraktion von Nukleinsäuren                     | Qiagen (#28706)                   |
| Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit                        | TOPO-Klonierung                                     | Invitrogen (#45-0245)             |

### 2.1.3 Antikörper, Farbstoffe und Proteine

Alle Antikörper wurden nach Herstellerangaben gelöst, mit 50 % sterilem Glycerin versetzt und aliquotiert. Die Kurzzeitlagerung erfolgte bei 4 °C, die Langzeitlagerung bei -80 °C. Das beigemischte Glycerin verhindert ein Einfrieren der empfindlichen Antikörper. Primärantikörper sind der Tabelle 2.8, Sekundärantikörper der Tabelle 2.9 und Farbstoffe der Tabelle 2.10 zu entnehmen.

#### Primärantikörper

**Tabelle 2.8:** Primärantikörper

| Antigen     | Name                     | Organismus Typ | Stammlösung Verdünnung | Bezugsquelle         | Referenz              |
|-------------|--------------------------|----------------|------------------------|----------------------|-----------------------|
| 6x His-Tag  | His.H8                   | Maus IgG, mkl  | 1 mg/ml<br>1:400       | abcam (#ab18184)     | Hobbs et al. 2004     |
| BrdU        | BrdU                     | Maus IgG, mkl  | 1 mg/ml<br>1:100       | abcam (#ab8039)      | Yuan et al. 2011      |
| Digoxigenin | $\alpha$ -Digoxigenin-AP | Maus IgG, pkl  | 150 U<br>1:4000        | Roche (#11093274910) | Kauppinen et al. 1999 |

**Tabelle 2.8:** Primärantikörper - Fortsetzung

| Antigen                   | Name        | Organismus<br>Typ     | Stammlösung<br>Verdünnung | Bezugsquelle                                | Referenz                  |
|---------------------------|-------------|-----------------------|---------------------------|---|---------------------------|
| Fc $\gamma$ -<br>Fragment | Fc $\gamma$ | Ziege<br>IgG, pkl     | 2 mg/ml<br>1:4000         | Jackson<br>ImmunoResearch<br>(#109-005-008) | Maurer<br>et al. 2012     |
| FGFR1<br>(pY654)          | FGFR1a      | Kaninchen<br>IgG, pkl | 1 mg/ml<br>1:400          | Cohesion<br>(#CPA1420)                      | Zhang<br>et al. 2009      |
| GFP                       | GFP         | Kaninchen<br>IgG, pkl | 0,5 mg/ml<br>1:1000       | abcam<br>(#ab6556)                          | Wong<br>et al. 2002       |
| HCS-1                     | Otoferlin   | Maus<br>IgG, mkl      | 30 $\mu$ g/ml<br>1:100    | DSHB  | Goodyear<br>et al. 2010   |
| Ncam1a                    | NCAM        | Kaninchen<br>IgG, pkl | 10 $\mu$ g/ml<br>1:1000   | Y. Yoshihara                                | Langhauser<br>et al. 2012 |
| Ncam1b                    | PCAM        | Kaninchen<br>IgG, pkl | 10 $\mu$ g/ml<br>1:1000   | Y. Yoshihara                                |                           |
| TdTomato<br>[16D7]        | TdTomato    | Ratte,<br>IgG, mkl    | 1,2 mg/ml<br>1:500        | KeraFAST<br>(#EST203)                       | Hernández<br>et al. 2015  |

**Sekundärantikörper****Tabelle 2.9:** Sekundärantikörper

| Antigen       | Name                                     | Organismus<br>Typ | Stammlösung<br>Verdünnung              | Bezugsquelle                                |
|---------------|--|-------------------|--|---|
| Kaninchen IgG | Goat- $\alpha$ -Rabbit,<br>IgG, Alexa488 | Ziege<br>IgG, pkl | 1,5 mg/ml<br>1:1000 (ZF)               | Molecular Probes<br>(#A11070)               |
|               | Goat- $\alpha$ -Rabbit,<br>IgG, cy3      | Ziege<br>IgG, pkl | 1,5 mg/ml<br>1:1000 (ZF)<br>1:400 (ZK) | Dianova<br>(#111-165-144)                   |
|               | Goat- $\alpha$ -Rabbit,<br>IgG, Alexa647 | Ziege<br>IgG, pkl | 1,5 mg/ml<br>1:1000 (ZF)<br>1:400 (ZK) | Jackson<br>ImmunoResearch<br>(#111-606-045) |
| Maus IgG      | Goat- $\alpha$ -Mouse,<br>IgG, Alexa488  | Ziege<br>IgG, pkl | 1,5 mg/ml<br>1:400 (ZK)                | Molecular Probes<br>(#A11029)               |
|               | Goat- $\alpha$ -Mouse,<br>IgG, cy3       | Ziege<br>IgG, pkl | 1,5 mg/ml<br>1:1000 (ZF)               | Jackson<br>ImmunoResearch<br>(#115-165-146) |
|               | Goat- $\alpha$ -Mouse,<br>IgG, Alexa647  | Ziege<br>IgG, pkl | 1,5 mg/ml<br>1:1000 (ZF)<br>1:400 (ZK) | Dianova<br>(#115-176-062)                   |
| Mensch IgG    | Goat- $\alpha$ -Human,<br>IgG (H+L)      | Ziege<br>IgG, pkl | 2 mg/ml<br>1:400 (ZK)                  | Invitrogen<br>(#A21089)                     |

**Tabelle 2.9:** Sekundärantikörper - Fortsetzung

| Antigen   | Name                                      | Organismus<br>Typ     | Stammlösung<br>Verdünnung      | Bezugsquelle                                |
|-----------|---|-----------------------|--------------------------------|---|
| Ratte IgG | Goat- $\alpha$ -Rat,<br>IgG, Alexa546     | Ziege<br>IgG, pkl     | 1,5 mg/ml<br>1:1000            | Life Technologies<br>(#A11077)              |
| Ziege IgG | HRP-conjugated-<br>Rabbit- $\alpha$ -Goat | Kaninchen<br>IgG, pkl | 800 $\mu$ g/ml<br>1:10000 (WB) | Jackson<br>ImmunoResearch<br>(#305-035-008) |

**Farbstoffe****Tabelle 2.10:** Farbstoffe

| Antigen            | Farbstoff | Stammlösung<br>Verdünnung              | Bezugsquelle                |
|--------------------|-----------|--|-----------------------------|
| Aktin (Phalloidin) | Alexa568  | 300 U/ml<br>1:75 (ZK)                  | Life Technologies (#A12380) |
|                    | Alexa647  | 300 U/ml<br>1:75 (ZK)                  | Life Technologies (#A22287) |
| DNA                | DAPI      | 1,0 mg/ml<br>1:2000 (ZF)<br>1:500 (ZK) | Roth (#6335.1)              |

**Proteine**

Zur Oberflächenfunktionalisierung von Deckgläsern wurden diese mit 10  $\mu$ g/ml humanem Fibronectin (Sigma-Aldrich, #F2006) beschichtet.

Zum Nachweis einer möglichen Interaktion von Ncam1a und Ncam1b mit verschiedenen Isoformen des Fgfr1a wurden membrangebundene und lösliche rekombinante Proteine aller Interaktionspartner hergestellt. Die Methode ist Kapitel 2.2.9, die klonierten Plasmide sind Tabelle 2.19 zu entnehmen.

Membrangebundene Proteine enthalten die komplette kodierende Sequenz (CDS) mit Ausnahme des Stopp-Codons (w/o stop). Am 3'-Ende der CDS befindet sich ein 6x His- und ein Myc-Tag. Für die löslichen Proteine wurde die gesamte extrazelluläre Sequenz (ECD) kloniert, an deren 3'-Ende sich ein humaner IgG Fc-Tag befindet. Alle Proteine sind in Tabelle 2.11 aufgezeigt.

**Tabelle 2.11:** Proteine

| Name                | Form            | Aminosäuren | Tag  |
|---------------------|-----------------|-------------|--|
| Fgfr1a-IIIb-R-CDS   | Membrangebunden | 1-811       | 6x His, Myc                                |
| Fgfr1a-IIIb-202-CDS | Membrangebunden | 1-811       | 6x His, Myc                                |
| Fgfr1a-IIIb-ECD     | Löslich         | 1-355       | hIgG Fc (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) |
| Fgfr1a-IIIC-001-CDS | Membrangebunden | 1-808       | 6x His, Myc                                |

**Tabelle 2.11:** Proteine - Fortsetzung

| Name                  | Form            | Aminosäuren (AS) | Tag  |
|-----------------------|-----------------|------------------|--|
| Fgfr1a-IIIc-ECD       | Löslich         | 1-354            | hIgG Fc (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) |
| Fgfr1a-w/o Exon 7-CDS | Membrangebunden | 1-301 + 351-811  | 6x His, Myc                                |
| Ncam1a-CDS            | Membrangebunden | 1-837            | 6x His, Myc                                |
| Ncam1a-ECD            | Löslich         | 1-679            | hIgG Fc (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) |
| Ncam1b-CDS            | Membrangebunden | 1-1031           | 6x His, Myc                                |
| Ncam1b-ECD            | Löslich         | 1-704            | hIgG Fc (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) |

### 2.1.4 Polymerasen, Restriktionsendonukleasen, weitere Enzyme, Längenstandards und Gelladepuffer

#### Polymerasen, Restriktionsendonukleasen und weitere Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben gelagert und mit den vorgegebenen Puffersystemen verwendet. Polymerasen sind der Tabelle 2.12, Restriktionsendonukleasen der Tabelle 2.13 und weitere Enzyme der Tabelle 2.14 zu entnehmen.

**Tabelle 2.12:** Polymerasen

| Name                          | Anwendung                     | Bezugsquelle                       |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Sp6 RNA Polymerase            | <i>in vitro</i> Transkription | Roche (#10810274001)               |
| T3 RNA Polymerase             | <i>in vitro</i> Transkription | Roche (#11 031 163 001)            |
| T7 RNA Polymerase             | <i>in vitro</i> Transkription | Roche (#10881767001)               |
| DreamTaq Green DNA Polymerase | cPCR                          | Thermo Fisher Scientific (#EP0713) |
| VeraSeq DNA Polymerase        | PCR                           | Biozym (#P7511L)                   |

**Tabelle 2.13:** Restriktionsendonukleasen

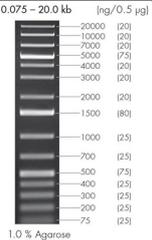
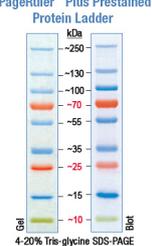
| Name  | Bezugsquelle                       |
|-------|------------------------------------|
| BamHI | Thermo Fisher Scientific (#ER0051) |
| EcoRI | Thermo Fisher Scientific (#ER0271) |
| NheI  | Thermo Fisher Scientific (#ER0971) |
| NotI  | Thermo Fisher Scientific (#ER0595) |
| XbaI  | Thermo Fisher Scientific (#ER0681) |

**Tabelle 2.14:** Weitere Enzyme

| Name                     | Bezugsquelle                       |
|--------------------------|------------------------------------|
| cOmpete Tablet           | Roche (#04693116001)               |
| DNase I, RNasefree       | Roche (#04716728001)               |
| ProteinaseK              | Roche (#03115887001)               |
| RiboLock RNase Inhibitor | Thermo Fisher Scientific (#EO0381) |
| T4 DNA Ligase            | NEB (#MO202S)                      |

## Längenstandards und Gelladepuffer

Tabelle 2.15: Längenstandards und Gelladepuffer

|   | Name                                      | Bezugsquelle  |
|---|---|---|
|  | peqGold 1 kb DNA-Leiter Plus OrangeG      | Fisher Scientific (#SM1333)<br><br>(Bildquelle: <a href="http://www.vwr.de">www.vwr.de</a> )                    |
|  | PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder | Fisher Scientific (#26619)<br><br>(Bildquelle: <a href="http://www.thermofisher.com">www.thermofisher.com</a> ) |
|   | Gel Loading Dye, Purple (6x)              | NEB (#B7024S)   |

## 2.1.5 Nukleinsäuren, Plasmide und Sonden

### Morpholino

Alle Morpholinos wurden in höchster Reinheit lyophilisiert von der Firma Gene Tools, LLC (Oregon, USA) bezogen und nach Herstellerangaben in ddH<sub>2</sub>O auf 1 mM gelöst. In der vorliegenden Arbeit wurden Morpholinos gegen *ncam1a*-5'UTR und *ncam1b*-start eingesetzt (Tab. 2.16). Das komplementäre Startcodon ist **fett** dargestellt. Morpholinos sind künstlich hergestellte Oligonukleotide, welche komplementär an die zu hemmende mRNA binden und dadurch deren Translation hemmen. Aufgrund des Morpholinringes und einer Phosphorodi-amidatgruppe werden die injizierten Morpholinos nicht von endogenen Nukleasen abgebaut und können für etwa 48 Stunden effektiv eine Translation reduzieren (Summerton und Weller 1997). Aufgrund der ansteigenden Zellzahl verringert sich die Effektivität des Morpholinos nach etwa 48 Stunden.

Tabelle 2.16: Eingesetzte Morpholinos

| Name               | Sequenz (5'-3')           | Konzentration |
|--------------------|---------------------------|---------------|
| ZfStandard Control | CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA | 1 ng/nl       |
| ZfNcam1a-5'UTR     | TTCCGTGTAGAATAGGTAGAGTTGG | 1 ng/nl       |
| ZfNcam1b-start     | AGATTATCGCCTTGGTCGGAAACAT | 1 ng/nl       |

### Nukleotide

Für die DNA-Synthese wurde der peqGold dNTP-Mix der Firma Peqlab (#20-3010) eingesetzt. In diesem Mix sind die einzelnen Nukleotide zu je 10 mM enthalten.

Für die *in vitro* Transkription der RNA-Sonden wurden DIG-markierte NTPs (10 mM, jedes Nukleotid) verwendet. Diese wurden von der Firma Roche erworben (#11277073910).

## Primer

Primer und Oligos wurden in höchster Reinheit lyophilisiert von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen, in ddH<sub>2</sub>O auf 100 pmol/µl gelöst und bei -20 °C gelagert. Alle genutzten Primer sind Tabelle 2.17 zu entnehmen. Für die Klonierung der Expressionsvektoren wurden Schnittstellenprimer verwendet. Am 5'-Ende dieser Primer befindet sich eine *nonsense*-Sequenz von 5 bp, welche die Restriktionsendonukleasen benötigen, um mit höchster Effektivität arbeiten zu können. Auf diese Sequenz folgt die eigentliche Schnittstelle (*kursiv*) und die genspezifische Sequenz (unterstrichen). Die Klonierung in das Plasmid pcDNA 3.1 hIgG-Fc benötigt zusätzlich eine **Fc-Linker-Sequenz** am 3'-Ende des einzubringenden DNA-Fragments, welche ebenfalls mit einem Schnittstellenprimer eingefügt wurde. Bindet der Primer an das Startcodon, so ist dieses **fett** dargestellt.

**Tabelle 2.17:** Eingesetzte Primer

| Gen                  | Primerbezeichnung             | Sequenz 5'-3'                                      |
|----------------------|-------------------------------|--|
| Cxcr4b               | zCxcr4b-start-for             | <b>ATGGAATTTT</b> ACGATAGCAT                       |
|                      | zCxcr4b-end-rev               | CTAACTCGTCAGTGC <b>ACTGG</b>                       |
| FGFR1a               | zFGFR1a-CDS-7f                | TCAGATGTAGAGGATCTTTGATA                            |
|                      | zFGFR1a-CDS-612f              | GGAGGCTTCAAGGTACGAGAGC                             |
|                      | zFGFR1a-CDS-838f              | AGTGGTGGGCAGTGATGTGGAGT                            |
|                      | zFGFR1a-CDS-1072r             | GTCCTGGGGAAGCTCGTATTCG                             |
|                      | zFGFR1a-CDS-1192f             | GCACAGCTCTGCCAAGAAAAGCG                            |
|                      | zFGFR1a-CDS-1619r             | CTCCCAGCAGGTTGATGATGTT                             |
|                      | zFGFR1a-CDS-1994r             | GTCAAACAGAGCTTCGGGAGC                              |
|                      | zFGFR1a-CDS-2471r             | ACACACACACTGAGTAAATGAGT                            |
|                      | zFGFR1a-CDS-BamHI f           | CATGAGGATCC <b>ATGA</b> AGATGATGATGATA             |
|                      | zFGFR1a-CDS-XbaI r            | CATGATCTAGAGCGCTTTTAAAGGCCAC                       |
|                      | zFGFR1a-ECD-NheI f            | CATGAGCTAGC <b>ATGA</b> AGATGATGATGATA             |
|                      | zFGFR1a-ECD-BamHI r           | CATGAGGATCC <b>ACTTACCTGT</b><br>AGTCGGGGGAACGGCTT |
|                      | zFGFR1a-Fu-Ex8hom6-f          | GAGCCTTAAAGGCCGTTCCCCGACTCAG                       |
| zFGFR1a-Fu-Ex6hom8-r | CGGGGGAACGGCCTTTAAGGCTCGGACAT |  |
| hIgG-Fc              | hIgG-Fc-r                     | TGCAGAGAGAAGATTGGGAG                               |
| polyA                | pCDNA-polyA-r                 | GGAAGGCACGGGGGAGGGGC                               |

## Plasmide

Alle Plasmide wurden durch eine Minipreparation (s. Kapitel 2.2.6) gewonnen und bei -20 °C gelagert. Die Langzeitlagerung der Plasmide erfolgte in *E. coli*-Bakterien in Glycerinstocks bei -80 °C (s. Kapitel 2.2.6).

**Tabelle 2.18:** Plasmide als Leervektoren

| Name              | Bezugsquelle                       | Antibiotika-resistenz | Leervektor für Klonierung von     | Tag  |
|-------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| pCDNA 3.1 hIgG-Fc | Gerardy-Schahn, MH-Hannover        | Ampicillin, Zeocin    | ECD von -Fgfr1a-IIIb -Fgfr1a-IIIc | humanes IgG-Fc-Fragment (CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) |
| pCDNA 3.1 6x His  | Vallone, KIT                       | Ampicillin, Geneticin | CDS von Fgfr1a-Isoformen          | 6x His, Myc  |
| pCR-BluntII-TOPO  | Thermo Fisher Scientific (#450245) | Kanamycin             | Blunt End PCR-Amplifikate         | Topoisomerase  |

Plasmide, welche im Verlauf der vorliegenden Arbeit kloniert wurden, sind als solche gekennzeichnet (R. Dries). Alle weiteren Plasmide lagen entweder zu Beginn der Arbeit laborintern vor (M. Schober) oder wurden von den Arbeitsgruppen T. Piotrowski, Stowers Institute, USA und S. Scholpp, University of Exeter, GB zur Verfügung gestellt. Alle genutzten Plasmide sind in der Tabelle 2.19 aufgezeigt.

**Tabelle 2.19:** Klonierte Plasmide

| Name  | Insert (bp)                | Bezugsquelle                          |
|---|----------------------------|---------------------------------------|
| zCxcl12a-pCR-BluntII-TOPO                     | zCxcl12a (903)             | T. Piotrowski, Stowers Institute, USA |
| zCxcr4b-pCR-BluntII-TOPO                      | zCxcr4b (1062)             | R. Dries                              |
| zCxcr7b-pBS-IISK+                             | zCxcr7b (1404)             | T. Piotrowski, Stowers Institute, USA |
| Erm-pBS-IISK+                                 | Erm-CDS (2700)             | S. Scholpp, University of Exeter, GB  |
| zFgfr1a-IIIb (R)-pCR-BluntII-TOPO             | Fgfr1a-IIIb(R) (2436)      | R. Dries                              |
| zFgfr1a-IIIb (R)-pcDNA 3.1 6x His (w/o Stopp) | Fgfr1a-IIIb (R)-CDS (2433) | R. Dries                              |
| zFgfr1a-IIIb (202)-pCR-BluntII-TOPO           | Fgfr1a-IIIb(202) (2436)    | R. Dries                              |

**Tabelle 2.19:** Klonierte Plasmide - Fortsetzung

| Name  | Insert (bp)                     | Bezugsquelle                               |
|---|---------------------------------|--|
| zFgfr1a-IIIb (202)-<br>pcDNA 3.1 6x His (w/o Stopp) | Fgfr1a-IIIb<br>(202)-CDS (2433) | R. Dries                                   |
| zFgfr1a-IIIb-<br>pCDNA 3.1 hIgG-Fc (w/o Stopp)      | Fgfr1a-IIIb-ECD (1065)          | R. Dries                                   |
| zFgfr1a-IIIc (001)-<br>pCR-BluntII-TOPO             | Fgfr1a-IIIc(001) (2427)         | R. Dries                                   |
| zFgfr1a-IIIc (001)-<br>pcDNA 3.1 6x His (w/o Stopp) | Fgfr1a-IIIc<br>(001)-CDS (2424) | R. Dries                                   |
| zFgfr1a-IIIc-<br>pcDNA 3.1 hIgG-Fc (w/o Stopp)      | Fgfr1a-IIIc-ECD (1062)          | R. Dries                                   |
| zFgfr1a-w/o Ex7-<br>pcDNA 3.1 6x His (w/o Stopp)    | Fgfr1a-w/o Ex7-CDS (2286)       | R. Dries                                   |
| Lef1 (Plasmid unbekannt)                            | Lef1-CDS (3000)                 | S. Scholpp,<br>University of Exeter,<br>GB |
| zNcam1a-<br>pcDNA 3.1 6x His (3151a)                | Ncam1a-CDS (2511)               | M. Schober<br>(Institutsintern)            |
| zNcam1a-<br>pcDNA 3.1 hIgG-Fc (3150a)               | Ncam1a-ECD (2037)               | M. Schober<br>(Institutsintern)            |
| zNcam1b-<br>pcDNA 3.1 6x His (3151b)                | Ncam1a-CDS (3093)               | M. Schober<br>(Institutsintern)            |
| zNcam1b-<br>pcDNA 3.1 hIgG-Fc (3150b)               | Ncam1b-ECD (2112)               | M. Schober<br>(Institutsintern)            |

**Sonden****Tabelle 2.20:** Sonden

| Name    | Plasmid              | Antisense:<br>Restriktionsenzym<br>Promotor | Sense:<br>Restriktionsenzym<br>Promotor | Länge<br>(bp) |
|---------|----------------------|---|---|---------------|
| Cxcl12a | pCR-BluntII-<br>TOPO | XbaI<br>Sp6                                 | BamHI<br>T7                             | 1037          |
| Cxcr4b  | pCR-BluntII-<br>TOPO | Not1<br>Sp6                                 | BamHI<br>T7                             | 1062          |
| Cxcr7b  | pBS-IISK+            | Not1<br>T7                                  | KpnI<br>T3                              | 1500          |
| Erm     | pBS-IISK+            | EcoRI<br>T7                                 | KpnI<br>T3                              | 2700          |

**Tabelle 2.20:** Sonden-Forsetzung

| Name                | Plasmid              | Antisense:<br>Restriktionsenzym<br>Promotor | Sense:<br>Restriktionsenzym<br>Promotor | Länge<br>(bp) |
|---------------------|----------------------|---|---|---------------|
| Fgfr1a-IIIb-<br>CDS | pCR-BluntII-<br>TOPO | BamHI<br>T7                                 | Not1<br>Sp6                             | 2500          |
| Lef1                | unbekannt            | Not1<br>T7                                  | unbekannt                               | 3000          |

### 2.1.6 Geräte und Arbeitsmaterialien

**Tabelle 2.21:** Geräte und Arbeitsmaterialien

| Name   | Hersteller                                    | Anwendung   |
|--|---|---|
| Amersham Imager 600  | GE Healthcare                                 | Dokumentation von Gelen und Blots                         |
| CellStar Zellkultur<br>Flaschen                            | Greiner Bio-One (#658170)                     | Zellkulturflaschen für<br>Standardkultivierung            |
| Cell+ Oberfläche<br>für anspruchsvolle<br>adhärente Zellen | Sarstedt (#83.3911.300)                       | Zellkulturflaschen zur Ex-<br>pression löslicher Proteine |
| µ-Slide 18 well<br>Flat uncoated                           | ibidi (#81821)                                | Dokumentation<br>Bead-Assay                               |
| Micropipette Puller  | Sutter Instrument, Science Product<br>(#P-30) | Herstellung von<br>Injektionsnadeln                       |
| Mini-Protean 3 Cell  | Bio-Rad (#165-3301)                           | SDS-PAGE-<br>Gelelektrophorese                            |
| Mini-Trans Blot 3 Cell                                     | Bio-Rad (#170-3935)                           | Western Blot  |
| MJ Research Thermo-<br>cycler                              | Biozym (#PTC-200)                             | Thermocycler für PCR                                      |
| Pneumatic Pico Pump  | WPI (#PV-820)                                 | Mikroinjektion  |
| PURELAB flex   | Elga Veolia                                   | Gewinnung ddH <sub>2</sub> O                              |
| Stericup-GP (0,22 µm)                                      | Merck (#SCGPU05RE)                            | Sterilfiltration  |
| Thin-Wall Capillary<br>(3", w/Fil, 1,00 mm)                | World Precision Instruments<br>(#TWI00F-3)    | Glaskapillaren  |
| Vivaflow 200   | Sartorius (#VF20P0)                           | Tangentialflusskassette<br>zum Einengen von Medien        |
| ZebTec   | Tecniplast                                    | Aquarienanlage  |

### **2.1.7 Mikroskope und Objektive**

#### **ApoTome (Zeiss, Oberkochen)**

- Fluar 5x/0.25
- Plan-Apochromat 40x/0.95, corr
- Plan-Apochromat 63x/1.4 oil

#### **Laser Scanning Mikroskop 510 Meta (Zeiss, Oberkochen)**

- Plan-Apochromat 10x/0.45
- Plan-Apochromat 40x/0.95, corr
- Plan-Apochromat 63x/1.4 oil

#### **SteREO Lumar V.12 (Zeiss, Oberkochen)**

### **2.1.8 Programme**

#### **Sequenzanalyse**

- CLC Sequence Viewer 8
- FinchTv
- SnapGene Viewer

#### **Bildauswertung und -bearbeitung**

- GIMP - GNU Image Manipulation Program
- Fiji is just ImageJ
- ImageJ
- ZEN 2012

#### **Statistische Auswertung**

- Microsoft Office Excel 2007

#### **Textverarbeitung**

- Latex
- Texstudio

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Der Zebrafisch: Linien, Haltung, Embryonengewinnung und Aufzucht

#### Zebrafischlinien

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung des posterioren Seitenlinienorgans (pSLO) im Zebrafisch (*Danio rerio*) untersucht. Hierfür wurden die transgenen Zebrafischlinien *Tg(ClaudinB::lynGFP)* und *Tg(Atoh1a::TdTomato)* genutzt. Die GFP-Expression erfolgt in der erstgenannten Linie unter dem Promotor des ClaudinB, welches verstärkt in Tight Junctions von Organen der sensorischen Plakoden, zu welchen auch das pSLO gehört, vorkommt (Haas und Gilmour 2006). *Atoh1a* ist ein Transkriptionsfaktor, der sich entscheidend auf die Entwicklung von Haarsinneszellen auswirkt (Wibowo et al. 2011). Die Expression von *TdTomato* erfolgt unter dem Promotor von *Atoh1a* und markiert differenzierte Haarsinneszellen sowie späte Vorläuferstadien (vorliegende Doktorarbeit).

#### Zebrafischhaltung und Embryonengewinnung

Die Haltung adulter Versuchstiere erfolgte in einer *ZebTEC*-Aquarienanlage der Firma Tecniplast (Buguggiate, Italien) unter konstanten Standardbedingungen (27 °C; pH 7,2; 360 µS; 0,3 bar; NO<sub>3</sub> < 50 mg/ml; NO<sub>2</sub> 0 mg/ml).

Zur Gewinnung von Embryonen wurden die adulten Fische am Vorabend paarweise in Abblanchbecken mit Gitterboden (1.0 L, Tecniplast) gesetzt. Das Weibchen (mit Grünpflanze) und das Männchen wurden durch eine Trennwand voneinander separiert. Die Haltung erfolgte in temperiertem Aquarienanlagenwasser. Am nächsten Morgen wurden die Paare mit dem Gitterbodeneinsatz in frisches, temperiertes Aquarienanlagenwasser gesetzt und die Trennwand herausgezogen. Die abgelaichten Embryonen fallen durch den Gitterboden in das Auffangbecken. Dies verhindert das Auffressen der Embryonen durch die adulten Fische.

#### Aufzucht der Embryonen

Nach dem Abblanchen wurden die Embryonen in Petrischalen mit Embryonenmedium (Tab. 2.5) überführt und bei 28,5 °C in einem Brutinkubator gehalten. Eine Haltung bei dieser Temperatur gewährleistet eine normale Entwicklung der Embryonen. Eine zeitverzögerte Entwicklung kann durch Herabsetzen der Temperatur erzielt werden. Für die Gewinnung von 36 hpf-Embryonen wurden diese für 24 Stunden bei 28,5 °C und weitere 24 Stunden bei 25 °C gehalten. Embryonen für die Mikroinjektion wurden in Danieau-Medium überführt.

Nach 24 Stunden wurden die Embryonen händisch mit Pinzetten dechorioniert. Das Dechorionieren mit Pronase wurde vermieden, da das pSLO eine oberflächennahe Struktur darstellt und bei zu langer Inkubation mit der Pronase angegriffen werden könnte. Embryonen, die für den Haarsinneszellen-Toxizitätstest verwendet wurden, schlüpften auf natürlichem Wege nach spätestens 3 dpf aus dem Chorion. Die dechorionierten Embryonen wurden in frisches Embryonenmedium überführt und mit 0,3%igem PTU (Phenylthiourea) behandelt, um eine Pigmentierung zu vermeiden. Der Medienwechsel und Zugabe von PTU erfolgte täglich bis zum Tag der Fixierung.

Die Bestimmung des Entwicklungsstadiums erfolgte nach der Tabelle von Kimmel et al. (1995).

### 2.2.2 Mikroinjektion von Zebrafischembryonen

Für die Mikroinjektion von Morpholinos oder mRNA wurden Injektionsnadeln aus Glaskapillaren hergestellt. Hierzu wurde ein Micropipette Puller genutzt. Als Einstellungen wurde für die Heizspirale "Heat 2: 900" und für das Gewicht eine Zugkraft von "Pull: 400" gewählt. Bei diesem Vorgang erhitzt sich die Heizspirale des Micropipette Puller, wodurch es zum Schmelzen des Glases kommt. Durch die Zugkraft des angebrachten Gewichtes wird die Glaskapillare an der Schmelzstelle auseinandergezogen und die Nadeldicke bestimmt.

Die Injektion erfolgte mit einem Drucklufttransjektor (Druck: 0,2 psi (vent); Dauer: timed; Bereich: 100 ms) in den Dotter im 1-Zell Stadium. Aufgrund der noch nicht vollständig geschlossenen Zellmembran in Richtung des Dotters, wird die injizierte Lösung durch Dotterströmungen bis zum 4-Zell-Stadium gleichmäßig in den Zellen verteilt.

Die Injektionsnadeln wurden jeweils mit 5 µl Injektionsansatz befüllt (Tab. 2.22). Die Injektionsmenge betrug, bei Berücksichtigung der oben genannten Einstellungen, pro Druckluftstoß zwischen 3-5 nl. Nach der Injektion wurden die Embryonen in Petrischalen mit Embryomedium überführt.

**Tabelle 2.22:** Injektionsansatz

| Lösung               | Menge   |
|----------------------|---------|
| Phenolrot            | 5,0 µl  |
| 50x Danieau          | 0,2 µl  |
| ddH <sub>2</sub> O   | 3,25 µl |
| Morpholino (1 ng/nl) | 1,55 µl |
|                      | 10,0 µl |

### 2.2.3 *Wholemout*-immunhistochemische Färbung von Zebrafischembryonen

Für die *Wholemout*-immunhistochemische Färbung wurden die Embryonen vor der Fixierung auf Eis anästhesiert. Alle Schritte von der Fixierung bis zur Inkubation im Primärantikörper erfolgten in Netzchen in 2 ml-Gefäßen. Dies ermöglicht einen einfachen und schonenden Wechsel der Lösungen für die Embryonen. Die Inkubation in der Antikörperlösung wurde in 250 µl-PCR-Gefäßen mit höchstens 30 Embryonen pro Gefäß durchgeführt. Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach etabliertem Standardprotokoll (Tab. 2.23). Im Anschluss an die immunhistochemische Färbung wurden die Embryonen mit zwei Minutiennadeln entdottert. Das Mounting erfolgte zwischen zwei Deckgläsern, welche durch zwei Platzhalter (Glasstreifen in der Dicke von 2 Deckgläsern) separiert wurden, um ein Zerdrücken der Embryonen zu vermeiden.

**Tabelle 2.23:** *Wholemout*-immunhistochemische Färbung von Zebrafischembryonen

| Schritt                           | Lösung  | Dauer<br>Temperatur   |
|-----------------------------------|---|---|
| Fixierung                         | 4% PFA in Phosphatpuffer                      | 4 h<br>4 °C   |
| Waschen                           | 1x Phosphatpuffer                             | 3x 5 min<br>RT  |
| Waschen                           | ddH <sub>2</sub> O                            | kurz  |
| Permeabilisieren                  | Acteon  | 36 hpf: 5 min;<br>48 hpf: 6 min;<br>ab 55 hpf: 8 min<br>Mo-injiziert: -30 sec<br>-20 °C |
| Waschen                           | ddH <sub>2</sub> O                            | kurz  |
| Waschen                           | 1x Phosphatpuffer                             | 3x 5 min<br>RT  |
| Reduktion von Doppelbindungen     | NaBH <sub>4</sub> in 1x PBS                   | 5 min<br>RT   |
| Waschen                           | 1x PBS  | bis keine Blasen sichtbar sind<br>RT  |
| Waschen                           | PBS/ BSA/ DMSO                                | 30 min<br>RT  |
| Inkubation mit Primärantikörper   | PBS/ BSA/ DMSO<br>Primärantikörper Tab. 2.8   | Über Nacht<br>4 °C  |
| Waschen                           | PBS/ BSA/ DMSO                                | 3x 15 min<br>RT   |
| Inkubation mit Sekundärantikörper | PBS/ BSA/ DMSO<br>Sekundärantikörper Tab. 2.9 | 2 h<br>RT   |
| Waschen                           | PBS/ BSA/ DMSO                                | 1x 15 min<br>RT   |
| Waschen                           | PBS/ BSA/ DMSO                                | Über Nacht<br>4 °C  |
| Entdottern                        | 1x PBS  |   |
| Mounting                          | 20% Mowiol                                    |   |

### 2.2.4 *in situ* Hybridisierung (ISH) von Zebrafischembryonen

Das Anästhesieren der Embryonen erfolgte vor der Fixierung auf Eis. Alle Inkubationsschritte wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Für die ISH wurde ein etabliertes Standardprotokoll (Tab. 2.24) angewendet. Es wurden stets 100 ng Sonde in 200 µl Hyb+ eingesetzt. Der Nachweis der gebundenen alkalischen Phosphatase erfolgte mit 1:250 NBT/BCIP-Stammlösung.

Um unspezifische Bindungen des  $\alpha$ -Digoxigenin-AP zu reduzieren, wurde der Antikörper in der Blockierlösung zuvor mit Embryonengewebe präadsorbiert. Dadurch werden unspezifische Bindestellen des Antikörpers gesättigt, sodass dessen Spezifität in der experimentellen Probe gewährleistet ist.

**Tabelle 2.24:** *in situ* Hybridisierung von Zebrafischembryonen

| Schritt                     | Lösung                               | Dauer<br>Temperatur             |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| Fixierung                   | 4 % PFA in PBS                       | Über Nacht<br>4 °C              |
| Waschen                     | 1x PBST                              | 3x 5 min<br>RT                  |
| Überführung in MeOH         | 25 % MeOH : 75 % PBST                | 5 min<br>RT                     |
|                             | 50 % MeOH : 50 % PBST                | 5 min<br>RT                     |
|                             | 75 % MeOH : 25 % PBST                | 5 min<br>RT                     |
|                             | 100 % MeOH                           | 5 min<br>RT                     |
|                             | 100 % MeOH                           | Über Nacht - 6 Monate<br>-20 °C |
| Rehydratation               | 50 % MeOH: 50 % PBST                 | 5 min<br>RT                     |
|                             | 1x PBST                              | 2x 5 min<br>RT                  |
| Re-Fixierung                | 4 % PFA in PBS                       | 30 min<br>RT                    |
| Waschen                     | 1x PBST                              | 2x 5 min<br>RT                  |
| Permeabilisierung           | 10 $\mu$ g/ml ProteinaseK in 1x PBST | 36 hpf - 5 dpf: 30 min<br>RT    |
| Inhibierung der ProteinaseK | 2 mg/ml Glycin in 1xPBST             | 2x 2 min<br>RT                  |
| Re-Fixierung                | 4 % PFA in PBST                      | 30 min<br>RT                    |
| Waschen                     | 1x PBST                              | kurz<br>RT                      |
| Waschen                     | 1x PBST                              | 3x 5 min<br>RT                  |

**Tabelle 2.24:** *in situ* Hybridisierung von Zebrafischembryonen - Fortsetzung

| Schritt                                 | Lösung                        | Dauer<br>Temperatur |
|---|-------------------------------|---------------------|
| Prä-Hybridisierung                      | Hyb+                          | 1-5 h<br>69 °C      |
| Hybridisierung mit Sonde                | Hyb+<br>Sonden in Tab. 2.20   | Über Nacht<br>69 °C |
| Fixierung der Sonde                     | Hyb-                          | 5 min<br>69 °C      |
|   | 75 % Hyb- : 25 % 2x SSCT      | 10 min<br>69 °C     |
|   | 50 % Hyb- : 50 % 2x SSCT      | 10 min<br>69 °C     |
| Fixierung der Sonde                     | 25 % Hyb- : 75 % 2x SSCT      | 10 min<br>69 °C     |
|   | 2x SSCT                       | 5 min<br>69 °C      |
|   | 0,2x SSCT                     | 2x 30 min<br>69 °C  |
| Waschen                                 | 50 % 0,2x SSCT : 50 %<br>MABT | 5 min<br>RT         |
| Waschen                                 | MABT                          | 5 min<br>RT         |
| Blockierung                             | 2% Blockierlösung             | 1 h<br>RT           |
| Inkubation mit<br>Antikörper            | MABT mit Anti-DIG             | Über Nacht<br>4 °C  |
| Waschen                                 | MABT                          | 4x 15 min<br>RT     |
| Färbung durch Alkalische<br>Phosphatase | Färbelösung mit<br>NBT/BCIP   | RT                  |

Nach der ISH wurden die Embryonen zunächst an einem Binokular anhand der Färbereaktion der Alkalischen Phosphatase ausgewertet. Im Anschluss an die ISH erfolgte eine immunhistochemische Färbung gegen das GFP der transgenen Zebrafischlinie Tg(*ClaudinB::lynGFP*), da dessen Fluoreszenz durch die Lösungen der ISH stark angegriffen wird (Tab. 2.25).

**Tabelle 2.25:** *Wholemout*-immunhistochemische Färbung nach ISH

| Schritt                              | Lösung  | Dauer<br>Temperatur |
|--------------------------------------|---|---------------------|
| Re-Fixierung                         | 4 % PFA in PBST                               | 2h<br>RT            |
| Waschen                              | 1x PBST                                       | 3x 5 min<br>RT      |
| Inkubation mit<br>Primärantikörper   | PBS/ BSA/ DMSO<br>Primärantikörper Tab. 2.8   | Über Nacht<br>4 °C  |
| Waschen                              | PBS/ BSA/ DMSO                                | 3x 15 min<br>RT     |
| Inkubation mit<br>Sekundärantikörper | PBS/ BSA/ DMSO<br>Sekundärantikörper Tab. 2.9 | 2 h<br>RT           |
| Waschen                              | PBS/ BSA/ DMSO                                | 1x 15 min<br>RT     |
| Waschen                              | PBS/ BSA/ DMSO                                | Über Nacht<br>4 °C  |
| Entdottern                           | 1x PBS  |                     |
| Mounting                             | 20% Mowiol                                    |                     |

### 2.2.5 Molekularbiologie: RNA-Isolation, PCR und Klonierung

#### RNA-Isolation

Die Extraktion totaler RNA erfolgte mit peqGold Trifast der Firma Peqlab nach Herstellerangaben. Es wurden für jedes untersuchte Entwicklungsstadium je 50 Embryonen in 1 ml Trifast homogenisiert. Die isolierte RNA wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser und 1 µl Ribolock RNase-Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) aufgenommen. Die Kurzzeitlagerung erfolgte bei -20 °C, die Langzeitlagerung bei -80 °C.

#### Reverse Transkription

Die Erststrangsynthese wurde mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Aus 3 µg totaler RNA wurde mit sequenzspezifischen Primern die im Interesse stehende mRNA isoliert. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde für max. eine Woche bei -20 °C gelagert.

## Zweitstrangsynthese mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### Standard-PCR

Bei der synthetisierten cDNA handelt es sich um einen einsträngigen Erststrang. Während der PCR synthetisiert die DNA-abhängige Polymerase einen komplementären Zweitstrang und vervielfältigt die isolierte cDNA. Für diese Reaktion wurde stets ein 50 µl Ansatz der VeraSeq High Fidelity DNA Polymerase 2.0 (Biozym) nach Herstellerangaben mit je 2 µl cDNA angesetzt. Es wurde das Standard-PCR-Programm verwendet (Tab. 2.26).

**Tabelle 2.26:** Standard-PCR-Programm der Veraseq-DNA-Polymerase

| Schritt                | Temperatur   | Dauer      | Anzahl Zyklen |
|------------------------|--|------------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 98 °C  | 30 sek.    |               |
| Denaturierung          | 98 °C  | 10 sek.    | 35x           |
| Hybridisierung         | Primer ≤ 20 nt: niedrigste T <sub>m</sub><br>Primer > 20 nt: niedrigste T <sub>m</sub><br>+ 3 °C | 20 sek.    |               |
| Elongation             | 72 °C  | 30 sek./kb |               |
| Finale Elongation      | 72 °C  | 5 min.     |               |
| Lagerung               | 4 °C   |            |               |

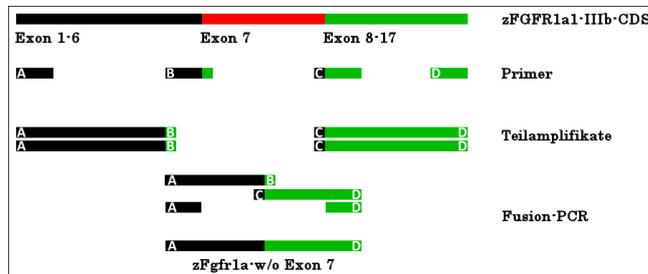
### 2-Schritt PCR

Für die Klonierung der codierenden Sequenz in einen Expressionsvektor mussten Schnittstellen für entsprechende Restriktionsenzyme an die 5'-Enden angebracht werden. Hierfür kamen Schnittstellenprimer zum Einsatz, die während einer 2-Schritt-PCR (Tab. 2.27) angehängt wurden. Bei dieser Methode wird die Hybridisierungstemperatur zunächst so gewählt, dass die Primer spezifisch an die komplementäre Sequenz binden können (I). Anschließend erfolgt die eigentliche Amplifikation nach Standardprotokoll (II).

**Tabelle 2.27:** 2-Schritt PCR-Programm der VeraSeq-DNA-Polymerase

| Schritt                | Temperatur | Dauer     | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------|-----------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 98 °C      | 30 sek.   |               |
| Denaturierung (I)      | 98 °C      | 10 sek    | 3x            |
| Hybridisierung (I)     | 72 °C      | 60 sek    |               |
| Elongation (I)         | 72 °C      | 50 sek    |               |
| Denaturierung (II)     | 98 °C      | 10 sek    | 35x           |
| Hybridisierung (II)    | 72 °C      | 20 sek    |               |
| Elongation (II)        | 72 °C      | 30 sek/kb |               |
| Finale Elongation      | 72 °C      | 10 min    |               |
| Lagerung               | 4 °C       |           |               |

## Fusion-PCR



**Abbildung 2.1: Synthese des Fgfr1a ohne Exon 7 mittels Fusion-PCR.**

Für die Fusions-PCR werden die Exon-überlappenden Primer B und C von jeweils 29 bp synthetisiert. In einer ersten 2-Schritt-PCR werden die Teilamplifikate A+B und C+D amplifiziert. Nach einer Gelaufreinigung der Teilamplifikate erfolgt die eigentliche Fusions-PCR. Hierfür werden zunächst lediglich die Teilamplifikate miteinander hybridisiert, die eine komplementäre Sequenz von 23 bp im Übergangsbereich von Exon 6 und 8 aufweisen. Nach zehn Zyklen werden die Primer A und D zur Reaktion gegeben und der Fgfr1a-w/o Exon 7 amplifiziert.

Die Synthese des Fgfr1a ohne Exon 7 (Fgfr1a-w/o Ex7) erfolgte nach der Fusion-PCR-Methode (Abb. 2.1). Hierfür wurden Exon-überlappende Primer von je 29 nt synthetisiert (Abb. 2.1, B und C). Als Template diente das Plasmid zFGFR1a-IIIb (R)-pcDNA 3.1 6x His (w/o Stopp). Bei der Fusion-PCR werden zunächst zwei Teilamplifikate synthetisiert (Abb. 2.1, A+B und C+D). Teilstück A+B wurde durch das Primerpaar "zFGFR1a-CDS-BamHif/zFGFR1a-Fu-Ex6hom8-r", Teilstück C+D durch "zFGFR1a-Fu-Ex8hom6-f/zFGFR1a-CDS-XbaIr" synthetisiert. Das PCR-Programm entsprach der 2-Schritt PCR (Tab. 2.27). Die Teilamplifikate wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben gel-extrahiert. Im Anschluss erfolgte die Fusion beider Teilamplifikate. Hierfür wurden je 3 µl beider Teilamplifikate in einem Standard-PCR Ansatz ohne Primer inkubiert. Im Übergangsbereich von Exon 6 und 8 weisen die Teilamplifikate eine komplementäre Sequenz von 23 bp auf. An dieser Stelle erfolgt die Hybridisierung der Teilamplifikate (Abb. 2.1, B+C). Nach 10 Zyklen ohne eine finale Elongation wurde das Primerpaar "zFGFR1a-BamHif und zFGFR1a-XbaIr" und nochmals 0,4 U Polymerase hinzugefügt. Die anschließende PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt (2.28) und führte zur Synthese des Fgfr1a-w/o Exon 7 (Abb. 2.1, A+D).

**Tabelle 2.28:** Fusion-PCR

| Schritt                              | Temperatur | Dauer  | Anzahl Zyklen |
|--------------------------------------|------------|--------|---------------|
| Initiale Denaturierung (I)           | 98 °C      | 30 sek |               |
| Denaturierung (I)                    | 98 °C      | 10 sek | 10x           |
| Hybridisierung (I)                   | 72 °C      | 60 sek |               |
| Elongation (I)                       | 72 °C      | 50 sek |               |
| + Zugabe Primer und 0,4 U Polymerase |            |        |               |
| Initiale Denaturierung (II)          | 98 °C      | 30 sek |               |
| Denaturierung (II)                   | 98 °C      | 10 sek | 30x           |
| Hybridisierung (II)                  | 72 °C      | 20 sek | 30x           |
| Elongation (II)                      | 72 °C      | 75 sek |               |
| Finale Elongation                    | 72 °C      | 10 min |               |
| Lagerung                             | 4 °C       |        |               |

### Kolonie-PCR (cPCR)

Zur Überprüfung einer positiven Klonierung und Transformation wurde eine Kolonie-PCR (cPCR) mit der DreamTaq Green-DNA-Polymerase durchgeführt. Hierzu wurden unter sterilen Bedingungen einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in je 4,5 µl ddH<sub>2</sub>O suspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Bakterienzellen bei 95 °C für 5 Minuten. Das Lysat diente als Template für die cPCR. Es wurde ein 20 µl PCR-Ansatz nach Herstellerangaben angesetzt (Tab. 2.29).

**Tabelle 2.29:** Standard-PCR-Programm der DreamTaq Green-DNA-Polymerase

| Schritt                | Temperatur   | Dauer    | Anzahl Zyklen |
|------------------------|--|----------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C  | 2 min    |               |
| Denaturierung          | 95 °C  | 30 sek   | 25x           |
| Hybridisierung         | Primer $\leq$ 20 nt: niedrigste T <sub>m</sub><br>Primer $>$ 20 nt: niedrigste T <sub>m</sub> + 3 °C | 30 sek   |               |
| Elongation             | 72 °C  | 1 min/kb |               |
| Finale Elongation      | 72 °C  | 10 min   |               |
| Lagerung               | 4 °C   |          |               |

### TOPO-Klonierung

Unmittelbar nach der Zweitstrangsynthese wurden 3 µl (~300 ng) der *Blunt End* PCR-Amplifikate (ohne vorherigen Restriktionsverdau) in den pCR-BluntII-TOPO Vektor der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben kloniert. Das bereits linearisierte Plasmid hat am 3'-Ende eine DNA-Topoisomerase 1 aus dem Virus *Vaccinia* kovalent gebunden, wodurch keine zusätzliche Ligase benötigt wird. Die Klonierung in diesen Vektor diente zur Sequenzierung der isolierten CDS. Der Einbau des Amplifikats erfolgt jedoch nicht gerichtet, wodurch sich dieses Klonierungsverfahren nicht für die Klonierung von Expressionsvektoren eignet.

### Restriktionsverdau, Ligation

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturexperimente und Proteinsynthesen wurden die Vektoren pcDNA 3.1 6x His, Myc und pcDNA 3.1 hIgG-Fc eingesetzt. Für den gerichteten Einbau der CDS bzw. ECD mussten geeignete Schnittstellen ausgewählt werden, die in der multiplen Klonierungsstelle der Vektoren vorkommen, jedoch nicht im Amplifikat schneiden können. Für Klonierungen aller Isoformen des zFgr1a in pcDNA 3.1 6x His, Myc wurden die Schnittstellen *Bam*HI und *Xba*I ausgewählt, für Klonierungen in pcDNA 3.1 hIgG-Fc die Schnittstellen *Nhe*I und *Bam*HI. Die Schnittstellen wurden mit Schnittstellenprimer in einer 2-Schritt PCR (Tab. 2.27) angehängt. Der **Restriktionsverdau** erfolgte sowohl für die PCR-Amplifikate als auch für die Vektoren über Nacht bei 37 °C. Die eingesetzte Menge betrug für Vektoren je 5 µg und für PCR-Produkte je 1 µg. Für den Verdau über Nacht wurden je 10 U des Enzyms verwendet. Die Auswahl des Puffersystems erfolgte nach Herstellerangaben. Die

Enzymreaktion wurde jeweils durch Aufreinigung des Verdau über eine SigmaSpin Säule der Firma Sigma Aldrich abgestoppt. Der Nachweis einer erfolgreichen Restriktion erfolgte über ein 1 % Agarosegel in 1x TAE.

Im Anschluss an den Verdau wurde die **Ligation** durchgeführt. Die T4-DNA Ligase bildet eine Phosphodiesterbindung zwischen dem linearisierten Plasmid und dem verdauten PCR-Produkt aus. Für diese Bindung wird ATP benötigt, welches bereits im Puffer enthalten ist. Für die Ligation wurde stets ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 7:1 gewählt, wobei immer 50 ng des Vektors eingesetzt wurden. Die benötigte Menge des Inserts wurde nach  $Benötigte\ Insertmenge\ (g) = \frac{7}{1} * \frac{50\ ng * kb\ Insert}{kb\ Vektor}$  berechnet. Dem Ligationsansatz wurden 10 U der T4-DNA Ligase beigefügt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 11 °C.

### 2.2.6 Mikrobiologie: Transformation, Plasmid-Isolierung und Glycerinstocks

Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes für die **Transformation** eingesetzt. Es wurden 25 µl chemisch kompetente *E. coli* Zellen pro Transformation genutzt. Nach Zugabe des Ligationsproduktes wurden die Zellen für 30 Minuten auf Eis gelagert. Die Aufnahmeeffizienz des Ligationsproduktes wurde durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden erhöht. Nach einer erneuten Inkubation auf Eis (2 Minuten) wurde dem Transformationsansatz, unter sterilen Bedingungen, 250 µl SOC-Medium ohne Antibiotika zugegeben. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei 37 °C, 300 rpm für eine Stunde. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung positiver Klone erfolgte eine Kolonie-PCR nach Tab. 2.29.

Positive Klone wurden in antibiotikahaltigem (1:1000) LB-Medium über Nacht bei 37 °C, 300 rpm kultiviert. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA mittels einer **Minipräparation** der Firma Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Plasmid-DNA des Plasmids pcDNA 3.1 6x His, Myc wurde in einer Maxipräparation nach *Cold Spring Harbor Protocols* gewonnen.

Für die Langzeitlagerung wurden 700 µl positiv transformierte Bakterien in flüssigem LB-Medium mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.7 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma LGC Genomics (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Sanger-Methode.

### 2.2.8 *in vitro* Transkription zur Sondensynthese und Synthese von Rescue-mRNA

Die *in vitro* Transkription der Sonden wurde nach Linearisierung des jeweiligen Plasmids mit der entsprechenden Polymerase für 2 Stunden bei 37 °C durchgeführt (siehe Tab. 2.20). Anschließend erfolgte eine Lithiumchloridfällung (4 M) in 100 % Ethanol (1:3 (v/v)). Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C. Die synthetisierte RNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen,

getrocknet und in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Zur Verhinderung des Abbaus der Sonden-RNA durch RNasen wurden 40 U RiboLock RNase Inhibitor zugegeben.

Die Synthese der *ncam1b*-mRNA (Linearisierung mit *NotI*) erfolgte mit dem Kit "mMessage mMachine Sp6" nach Herstellerangaben. Die Fällung erfolgte mit Lithiumchlorid.

## 2.2.9 Zellkultur: Transfektion von CHO-Zellen und Proteinbiosynthese

### Expression membrangebundener Proteine

Für den Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden Versuche in immortalisierten CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) der Zelllinie *K1* durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C, 98 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>. Das Passagieren der Zellen wurde spätestens alle 72 Stunden durchgeführt. Hierzu wurde das Standardkulturmedium DMEM, welchem 10 % FCS zugegeben wurde, von den Zellen abgenommen und die Zellen dreimal mit 1x DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen mit 150 µl Trypsin/EDTA in DPBS (25 % : 75 %) für 3 Minuten bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml DMEM/FCS aufgenommen und bei 10000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml DMEM/FCS aufgenommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen.

Für die Transfektion wurden 250.000 Zellen/well in *6-well*-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine 2000 Transfection Reagent nach Herstellerangaben mit 2,5 µg Plasmid-DNA/well. Hierfür wurden pro well 150 µl Opti-MEM mit 5 µl Lipofectamine 2000 Transfection Reagent sowie 150 µl Opti-MEM mit 2,5 µg Plasmid-DNA für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Plasmid-DNA-Ansatz vorsichtig zum Lipofectamine-Ansatz pipettiert. Es wurde auf ein Resuspendieren des Ansatzes verzichtet, da die gebildeten Lipidkomplexe sehr empfindlich sind. Nach der Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Ansatz vorsichtig zu den Zellen gegeben, welche sich in 2 ml DMEM/FCS befanden und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen abgelöst und in DMEM/FCS mit 0,75 mg/ml Geneticin selektiert. Die Selektionsdauer lag je nach Experiment zwischen 3 und 12 Tagen.

### Expression löslicher Proteine

Zur Gewinnung löslicher Fc-gekoppelter Proteine wurde die genetisch modifizierte CHO-Zelllinie *2A10* verwendet. In dieser Zelllinie liegt eine Mutation im *st8siaIV*-Gen vor, wodurch die zu synthetisierten Proteine keine Polysialinsäure tragen. Die Kultivierung und das Passagieren der Zellen erfolgte analog zu der Vorgehensweise bei der *CHO-K1*-Zelllinie.

Für die Transfektion der *2A10*-Zellen wurden 2\*10<sup>6</sup> Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen von Sarstedt (mit Cell+ Oberfläche) ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamine 2000 Transfection Reagent nach Herstellerangaben mit 4 µg Plasmid-DNA.

24 Stunden nach der Transfektion erfolgte für 10 Tage die Selektion der transfizierten Zellen mit 0,75 mg/ml Zeocin. Für die letzte Selektionsrunde wurden die transfizierten Zellen in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen von Sarstedt (mit Cell+ Oberfläche) ausgesät. Nach 10 Tagen wurden die Zellen gründlich mit 1x DPBS gewaschen, sodass kein DMEM/FCS mehr in der

Zellkulturflasche vorhanden ist. Nach der Selektion erfolgte die Kultivierung ohne Passagieren der Zellen in OPTI-CHO mit 4 mM L-Glutamine. Nach spätestens 72 Stunden wurde das Medium von den Zellen abgenommen und für 30 Minuten, 4000xg, 4 °C zentrifugiert. Zu den Zellen wurde 25 ml frisches Medium gegeben. Der Überstand des zentrifugierten Mediums wurde in sterilen 500 ml Schottflaschen gelagert. Zur Verhinderung von Bakterienkontaminationen und dem Abbau des gewonnenen Proteins durch Proteinasen, wurde dem gesammelten Medium 0,02 % steriles Thimerosal sowie cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail nach Herstellerangaben zugegeben. Das gesammelte Medium wurde innerhalb von zwei Wochen mit Stericup-GP sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.2.10 Aufreinigung löslicher Proteine aus Zellkulturüberstand

Die Aufkonzentrierung der löslichen Proteine Fgfr1a-IIIb-ECD und Fgfr1a-IIIc-ECD sowie Ncam1b-ECD erfolgte durch den Einsatz der Tangentialfluss-Kassette Vivaflow 200 der Firma Sartorius nach Herstellerangaben. Die konzentrierten Proben wurden anschließend über Nacht bei 4 °C an eine ProteinG HP HiTrap-Säule der Firma GE Healthcare gebunden, eluiert und neutralisiert. Die Säule zeigt eine erhöhte Affinität zu dem Fc-Tag auf. Die Proteinkonzentration der Eluate wurde zunächst in einem Bradford-Assay mit einer BSA-Standardreihe (2 mg/ml) überprüft. Anschließend wurden die Eluate mittels Amicon Ultra-15 50K nach Herstellerangaben umgepuffert und aufkonzentriert. Lösliches Ncam1a-ECD-Protein wurde laborintern von Michaela Schober (Schober 2016) zur Verfügung gestellt. Zur abschließenden Überprüfung der Reinheit der Proteine wurde eine SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) und ein Western Blot durchgeführt.

### SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-PAGE und der Western Blot erfolgten nach einem abgewandelten Protokoll der Originalpublikation von Ulrich Laemmli 1970.

Der Probenansatz für die SDS-PAGE setzte sich aus 10 µl des Proteins, 0,5 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol und 5 µl 3x SDS-Probenpuffer zusammen. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und zentrifugiert (14000 rpm, 5 min, 4 °C). Es wurde der gesamte Probenansatz auf das Gel geladen.

**Tabelle 2.30:** Protokoll für SDS-PAGE und Western Blot

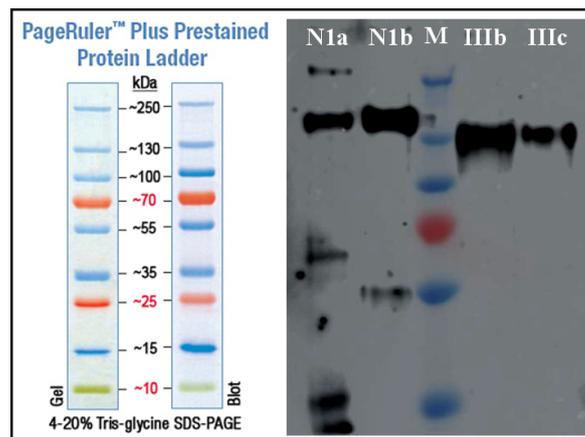
| Schritt                          | Lösung                              | Dauer<br>Temperatur                        |
|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| Herstellung Trenn- und Sammelgel | Tab. 2.4                            | -  |
| Gelelektrophorese                | 1x Laemmli-Puffer<br>(Laemmli 1970) | 15 min, 50 V<br>1 h, 180 V<br>15 min, 50 V |
| Aktivierung PVDF-Membran         | 100 % MeOH                          | 1 min                                      |
| Äquilibrieren PVDF-Membran       | Western Blot Puffer                 | -  |

**Tabelle 2.30:** Protokoll für SDS-PAGE und Western Blot - Fortsetzung

| Schritt                           | Lösung  | Dauer<br>Temperatur    |
|-----------------------------------|---|------------------------|
| Blotting                          | Western Blot Puffer   | 2 h, 150 mA<br>auf Eis |
| Blockierung PVDF-Membran          | 5 % BSA in TBST   | 30 min                 |
| Inkubation mit Primärantikörper   | 5 % BSA in TBST<br>Primärantikörper 2.8                           | über Nacht<br>4 °C     |
| Waschen                           | 0,05 % TBST   | 4x 15 min              |
| Inkubation mit Sekundärantikörper | 5 % BSA in TBST<br>Sekundärantikörper 2.9                         | 2 h<br>RT              |
| Waschen                           | 0,05 % TBST   | 4x 15 min              |
| Waschen                           | 1x TBS  | 5 min                  |
| HRP-Reaktion                      | 500 µl Peroxidase Solution<br>500 µl Luminol/Enhancer<br>Solution | 2 min                  |

Die Coomassie-Färbung der SDS-PAGE erfolgte mit Roti-Blue (5x Konzentrat) der Firma Roth über Nacht bei Raumtemperatur (Tab. 2.4). Die Entfärbung wurde mit 25 % MeOH in ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

Die Ncam1-Paraloge weisen ein Molekulargewicht von jeweils 140 kDa auf. Die Berechnung der Fgfr1a-ECD-Isoformen ergibt ein Molekulargewicht von 50 kDa. Das Molekulargewicht des Fc-Tags beträgt 25 kDa. Im Falle der Fgfr1a-ECD-Isoformen ist davon auszugehen, dass die isolierten Proteine posttranslational glykosyliert wurden.



**Abbildung 2.2:** Western Blot der aufgereinigten löslichen Proteine der Ncam1a-Paraloge und Fgfr1a-Isoformen. Ncam1a (N1a) und Ncam1b (N1b) weisen ein Molekulargewicht von 140 kDa auf. Fgfr1a-IIIb und -IIIc zeigen ein Molekulargewicht von 130 kDa auf. (Bildquelle Protein-Leiter: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com))

## 2.2.11 Protein-Protein-Interaktionsnachweis

### Overlay-Assay in Zellkultur

Der Nachweis einer möglichen Interaktion von Ncam1b mit Isoformen des Fgfr1a erfolgte in Zellkultur. Transfizierte Zellen (25.000 Zellen), welche mit einem Plasmid für ein membran-gebundenes Protein transfiziert wurden, wurden am Vortag auf mit Fibronectin beschichtete Deckgläser (Ø 18 mm) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation der lebenden Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem möglichen Interaktionspartner (20 µg/ml) in 1 % BSA. Nach der Inkubation wurden die noch lebenden Zellen 6x 10 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung und immunhistochemische Färbung der Zellen nach Standardprotokoll (Tab. 2.31).

**Tabelle 2.31:** Immunhistochemische Färbung von Zellen

| Schritt                           | Lösung                                 | Dauer<br>Temperatur |
|-----------------------------------|--|---------------------|
| Waschen                           | 1x PBS                                 | 3x 5 min<br>RT      |
| Fixierung                         | 4 % PFA in PBS                         | 10 min<br>RT        |
| Waschen                           | 1x PBS                                 | 3x 5 min<br>RT      |
| Reduktion von Doppelbindungen     | NaBH <sub>4</sub>                      | 3x 4 min<br>RT      |
| Permeabilisierung                 | 0,1 % PBST                             | 5 min<br>RT         |
| Waschen                           | 1x PBS                                 | 2x 5 min<br>RT      |
| Inkubation mit Primärantikörper   | 1 % BSA<br>Primärantikörper Tab. 2.8   | 1 h<br>RT           |
| Waschen                           | 1x PBS                                 | 3x 5 min<br>RT      |
| Inkubation mit Sekundärantikörper | 1 % BSA<br>Sekundärantikörper Tab. 2.9 | 1 h<br>RT           |
| Waschen                           | 1x PBS                                 | 3x 5 min<br>RT      |
| Mounting                          | 20 % Mowiol                            |                     |

### Bead-Aggregations-Assay

Eine weitere Nachweismethode einer Interaktion der Ncam1-Paraloge mit Fgfr1a-Isoformen stellt der Bead-Aggregations-Assay nach Galuska et al. (2010) dar. Hierfür werden fluoreszierende ProteinA-Beads (0,5  $\mu\text{m}$ ) mit den rekombinaten Fc-Proteine ((10  $\mu\text{g}$ ) siehe Tab. 2.11) bzw. humanem Fc-Fragment (Merck, #401104) beschichtet und für 24 h bei RT inkubiert. Die Dokumentation der Aggregatbildung erfolgte über einen Zeitraum von 24 h mit einem konfokalen LSM510 in unbeschichteten, abgeflachten  $\mu$ -Slides der Firma ibidis.

**Tabelle 2.32:** Bead-Aggregations-Assay

| Schritt   | Lösung   | Dauer<br>Temperatur                  |
|---|--|--------------------------------------|
| Verdünnung der Beads                            | 20 $\mu\text{l}$ Beads in<br>200 $\mu\text{l}$ PBS aufnehmen | RT                                   |
| Waschen   | 1 % BSA in PBS   | 3x 5 min, 13000 g,<br>4 °C           |
| Sonifizierung                                   | Beads in 1 % BSA in PBS                                      | 30 sek                               |
| Inkubation und Beschichtung<br>mit Fc-Proteinen | Zugabe von 10 $\mu\text{g}$ Fc-Protein                       | über Nacht, RT,<br>leicht schüttelnd |
| Waschen   | 1 % BSA in PBS   | 3x 5 min, 13000 g,<br>4 °C           |
| Aggregation                                     | 1:12 Verdünnung (je Protein)<br>in 1 % BSA in PBS            | über Nacht, RT,<br>leicht schüttelnd |

### 2.2.12 BrdU-Assay

Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon, das anstelle des Thymidin in der S-Phase des Zellzyklus eingebaut wird. Dies ermöglicht die Untersuchung der Proliferationsrate von Zellen. Der BrdU-Assay wurde an 36 hpf alten Embryonen durchgeführt, welche für 20 Minuten auf Eis in der BrdU-haltigen Lösung (10 mM) gehalten wurden. Als Kontrolle diente 1 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in E3. Anschließend wurden die Embryonen anästhesiert und nach Tabelle 2.33 fixiert und gefärbt.

**Tabelle 2.33:** BrdU-Assay

| Schritt           | Lösung                                 | Dauer<br>Temperatur |
|-------------------|--|---------------------|
| Fixierung         | 4 % PFA in PBS                         | über Nacht, 4 °C    |
| Permeabilisierung | 100 % Methanol                         | über Nacht, -20 °C  |
| Rehydratation     | 50 % MeOH: 50 % PBST                   | 5 min, RT           |
| Waschen           | 0,5 % PBST                             | 4x 15 min, RT       |
| Permeabilisierung | 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ProteinaseK | 10 min, RT          |
| Waschen           | 0,5 % PBST                             | 4x 15 min, RT       |

**Tabelle 2.33:** BrdU-Assay - Fortsetzung

| Schritt                           | Lösung  | Dauer<br>Temperatur |
|-----------------------------------|---|---------------------|
| Re-Fixierung                      | 4 % PFA in PBS                                  | 30 min, RT          |
| Denaturierung des BrdU-Epitops    | 2 N HCl   | 1 h, RT             |
| Waschen                           | 0,5 % PBST                                      | 15 min, RT          |
| Blockierung                       | PBS/ BSA/ DMSO                                  | 1 h, RT             |
| Inkubation mit Primärantikörper   | PBS/ BSA/ DMSO<br>(Primärantikörper Tab. 2.8)   | über Nacht,<br>4 °C |
| Waschen                           | PBS/ BSA/ DMSO                                  | 3x 15 min, RT       |
| Inkubation mit Sekundärantikörper | PBS/ BSA/ DMSO<br>(Sekundärantikörper Tab. 2.9) | 2 h, RT             |
| Waschen                           | PBS/ BSA/ DMSO                                  | 1x 15 min, RT       |
| Waschen                           | PBS/ BSA/ DMSO                                  | Über Nacht, 4 °C    |
| Entdottern                        | 1x PBS  |                     |
| Mounting                          | 20 % Mowiol                                     |                     |

### 2.2.13 Haarsinneszellen-Toxizitätstest

Mechanosensitive Strukturen wie die Haarsinneszellen der Neuromasten reagieren ab dem 5. Entwicklungstag (5 dpf) sensitiv auf das Aminoglycosid Neomycin. Eine Behandlung der Embryonen mit einer 300  $\mu$ M Neomycinlösung zum Zeitpunkt 5 dpf führt zum Absterben der Haarsinneszellen (Harris et al. 2003). Die Embryonen werden für die Dauer des Toxizitätstest in Netzen (20 Embryonen/Netz) in 6-well Platten gehalten. Dies vereinfacht das Wechseln der Waschlösungen. Zunächst wurden die Embryonen 3x 5 Minuten mit frischem 0,5x E2-Medium gewaschen. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation der Embryonen in der Neomycinlösung. Als Kontrolle diente eine 1 % DMSO in 0.5x E2-Lösung. Nach der Inkubation folgten erneut drei 5 Minuten-Waschschritte mit frischem 0,5x E2-Medium. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Unmittelbar nach dem letzten Waschschritt wurden 25 % der Kontrollen und behandelten Embryonen auf Eis anästhesiert und über Nacht in 4 % PFA in Phosphatpuffer bei 4 °C fixiert. Die verbliebenen Embryonen wurden zu gleichen Teilen auf Petrischalen mit 0.5x E2-Medium und PTU verteilt, sodass für jeden der Regenerationstage, 24, 48 bzw. 72 Stunden nach Behandlung (hpt), 25 % der Kontrollen und der behandelten Embryonen fixiert werden konnten. Die Embryonen wurden während der Regenerationsphase im Inkubator bei 28,5 °C gehalten. Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach dem Standardprotokoll (Tab.2.23).

Die laterale Hemmung durch den Delta-Notch Signalweg reguliert während der Entwicklung die koordinierte Bildung von Haarsinneszellen. Eine Hemmung des Signalweges durch den Notch-Inhibitor DAPT führt zur erhöhten Bildung von Haarsinneszellen (Romero-Carvajal et al. 2015). Die Inkubation der Neomycin-behandelten Embryonen mit einer 50  $\mu$ M DAPT-Lösung führt zu einer rascheren Regeneration der Haarsinneszellen. Hierfür wurden Neomycin-behandelte Embryonen eine Stunde nach der Neomycinbehandlung in 0.5x E2-Medium bei

28,5 °C gehalten. Im Anschluss daran wurden die Embryonen für 24 Stunden in der DAPT-Lösung bei 28,5 °C gehalten. Als Kontrolle diente eine 1 % DMSO in 0.5x E2-Lösung. Alle Embryonen wurden nach Ablauf der Inkubation auf Eis anästhesiert, über Nacht in 4 % PFA in Phosphatpuffer bei 4 °C fixiert und nach dem Standardprotokoll gefärbt (Tab. 2.23).

Ab dem 5. Entwicklungstag sind Zebrafischembryonen in der Lage, Nahrung aufzunehmen. Sie werden ab diesem Zeitpunkt als Fisch behandelt, dessen Tötung und Fixierung zu Versuchszwecken beim zuständigen Regierungspräsidium genehmigt sind und dort gemeldet wurden.

### 2.2.14 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2007.

#### Statistische Auswertung der Overlay-Assay Experimente

Die Quantifizierung der Overlay-Assays erfolgte nach einer immunhistologischen Färbung von transfizierten und überlagerten Zellen durch Auswertung der Signaldetektion des His- und Fc-Tags. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach dem  $\chi^2$ -Test mit Schwellenwerten der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05 \hat{=} *$ ,  $p \leq 0,01 \hat{=} **$  und  $p \leq 0,001 \hat{=} ***$ .

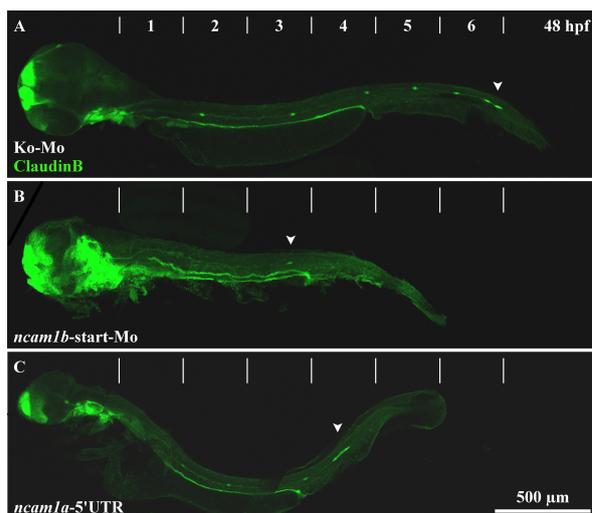
#### Auswertung von *in situ* Hybridisierungen

Die statistische Auswertung der Färbereaktion der alkalischen Phosphatase mit NBT/BCIP erfolgte nach dem  $\chi^2$ -Test mit Schwellenwerten der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05 \hat{=} *$ ,  $p \leq 0,01 \hat{=} **$  und  $p \leq 0,001 \hat{=} ***$ .

#### Haarsinneszellen-Toxizitätstest und Behandlung mit DAPT

Für die Bestimmung von Ncam1- und HCS-1-positiven Zellen wurden die Zellkerne der Embryonen mit DAPI gefärbt; die jeweiligen Einzelkanäle mit dem DAPI-Kanal überlagert und ausgewertet. Die berechneten Signifikanzen wurden nach der Studentsche *t*-Verteilung mit Schwellenwerten der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05 \hat{=} *$ ,  $p \leq 0,01 \hat{=} **$  und  $p \leq 0,001 \hat{=} ***$  ermittelt.

### 3 Ergebnisse



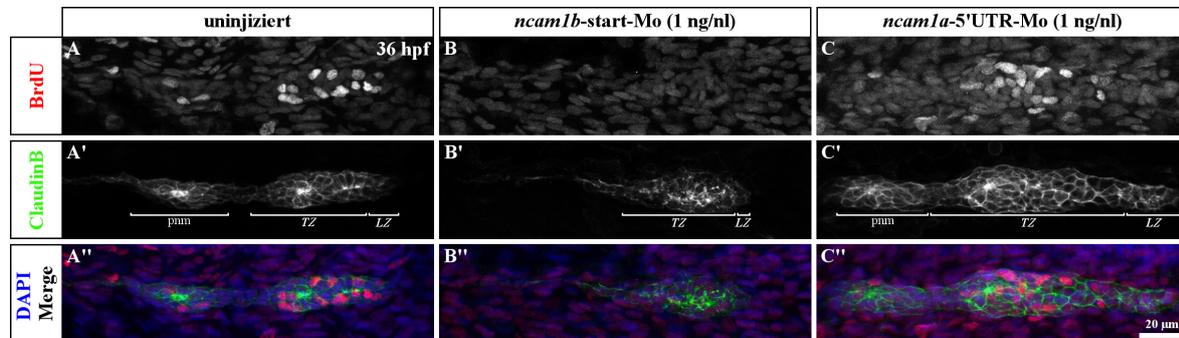
**Abbildung 3.1: Ncam1a und Ncam1b beeinflussen die Entwicklung des primären posterioren Seitenlinienorgans (pSLO).** **A)** Phänotyp des pSLO nach Injektion eines Kontroll-Morpholinos. Das Primordium (Pfeilkopf) erreicht 48 hpf das Schwanzende (Abschnitt 6) und setzte 5 Protoneuromasten entlang des horizontalen Myoseptums ab. **B)** Das verkleinerte Primordium von *ncam1b*-Morphanten erreicht 48 hpf Abschnitt 3. Protoneuromasten sind nicht zu sehen. **C)** Nach *Knockdown* von *ncam1a* erreicht das normal große Primordium 48 hpf Abschnitt 4 und setzte drei Protoneuromasten ab.

*Knockdown* des Ncam1-Paralogs *ncam1a* (Abb. 3.1, C) hat weniger starke Auswirkungen auf die Entwicklung des pSLO. Diese vorausgehenden Studien lassen vermuten, dass Ncam1b einen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen den Signalwegen Wnt und Fgfr1a sowohl während der Entwicklung des pSLO als auch im differenzierten Zustand hat. In der vorliegenden Arbeit soll daher die Funktion von Ncam1b auf molekularer Ebene während der Entwicklung des pSLO entschlüsselt und die Rolle der Ncam1-Paralogs im differenzierten und regenerierenden Stadium der motosensorischen Neuromasten gezeigt werden. Proliferations- und Expressionsstudien an *Wholemout*-Embryonen der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)* sollen zunächst Aufschluss darüber geben, ob die Fgfr1a-Signaltransduktion in *ncam1b*-Morphanten beeinflusst wird. Der Nachweis einer Interaktion von Ncam1b und Ncam1a mit verschiedenen Isoformen des Fgfr1a erfolgt in Zellkulturexperimenten durch Overlay- und Bead-Aggregations-Assays. Abschließend wird die Expression der Ncam1-Paralogs während der Regeneration der sensorischen Haarsinneszellen im differenzierten pSLO untersucht.

Die Entwicklung des posterioren Seitenlinienorgans (pSLO) im Zebrafisch unterliegt komplexen Wechselwirkungen der antagonistisch wirkenden Signalwege Wnt (*Leading-Zone*) und Fgfr1a (*Trailing-Zone*) im primären posterioren Seitenlinienprimordium (PrimI) (Aman et al. 2011). Eine Störung dieses *Feedback Loops* führt zu Fehlentwicklungen des pSLO, was sich in der Primordiengröße, der Migrationsgeschwindigkeit und dem Fehlen der Neuromasten widerspiegeln kann (Lecaudey et al. 2008, Aman et al. 2011, Venero Galanternik et al. 2015). Ein *Knockdown* des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls *ncam1b*, das in der *Trailing-Zone* exprimiert wird, zeigt einen ebenso veränderten Phänotypen des sich entwickelnden pSLO (Heiny 2012, Dries 2014, Berghaus 2015). Das Primordium ist in seiner Größe reduziert, die Migrationsgeschwindigkeit ist herabgesetzt und die Ausbildung von Protoneuromasten ist beeinträchtigt (Abb. 3.1, B). Der

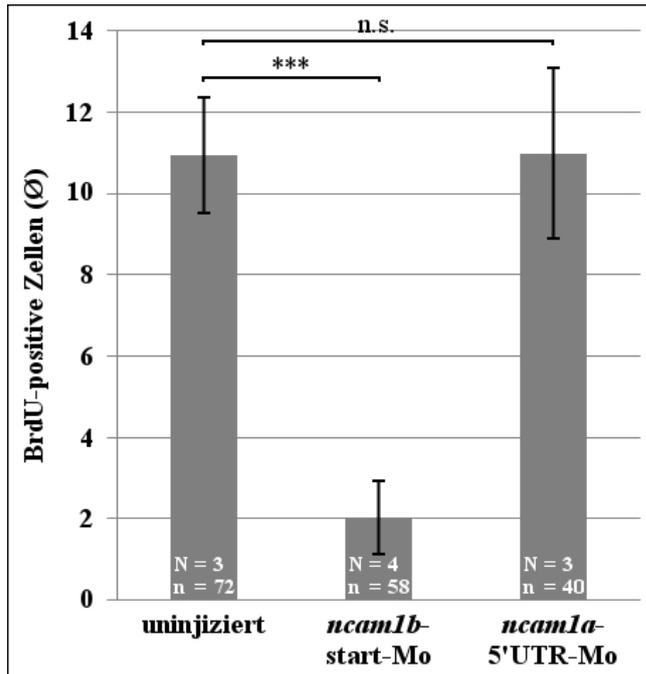
## 3.1 Die Funktion und Interaktion von Ncam1 während der Entwicklung des pSLO

### 3.1.1 Ncam1b beeinflusst die Proliferation im migrierenden Primordium



**Abbildung 3.2: *ncam1b*-Morphanten zeigen keine Proliferation primordialer Zellen bei 36 hpf.** A-C'') Konfokale Lateralansicht des primären posterioren Seitenlinienprimordiums (Vergrößerung: 40x). Rostral befindet sich links, caudal rechts. A-C) Antikörperdetektion des Proliferationsmarkers BrdU. A'-C') Expression des transgen markierten ClaudinB. A''-C'') Überlagerung der Einzelkanäle mit DAPI. A-A'') In uninjizierten Embryonen werden BrdU-markierte Zellen in *Leading-* und *Trailing-Zone* detektiert. B-B'') *ncam1b*-Morphanten weisen keinen Einbau des BrdU in die DNA primordialer Zellen auf. C-C'') In *ncam1a*-Morphanten können proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Abkürzungen: **LZ**: *Leading-Zone*, **TZ**: *Trailing-Zone*, **pnm**: Protoneuromast

Die Funktion des primären posterioren Seitenlinienprimordiums (PrimI) besteht in der Ausbildung sensorischer Protoneuromasten und ihrer Absetzung entlang des horizontalen Myoseptums. Die Bildung und Absetzung erfordert eine zyklische Proliferation der Zellen des PrimI während der Migration (Aman und Piotrowski 2011). Zur Überprüfung der Zellteilung zum Zeitpunkt 36 hpf wurden Embryonen für 20 min in einer BrdU-Lösung (10 mM) gehalten, anschließend fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Uninjizierte Embryonen zeigen inkorporiertes BrdU in Zellen der *Leading-* und *Trailing-Zone* des Primordiums (Abb. 3.2, A-A''). Die Bestimmung der Zonen im Primordium erfolgte anhand der Zellmorphologie. Pseudomesenchymale Zellen der *Leading-Zone* zeigen eine zufällige Orientierung und bilden das erste caudale Drittel des Primordiums. Epitheliale Zellen der *Trailing-Zone* ordnen sich zu rosettenförmigen Protoneuromasten an und erscheinen strukturierter. Das gezeigte Primordium hat unmittelbar vor der Fixierung einen Protoneuromasten (pnm) entlassen, welcher sich nun zum Neuromasten differenziert und proliferierende Zellen aufweist. Der Morpholino-*Knockdown* von *ncam1b* führt zu einem verkleinerten Primordium, in dem strukturell zwei Zonen unterschieden werden können (Abb. 3.2, B'). Eine Proliferation ist jedoch weder in der *Leading-* noch in der *Trailing-Zone* zu beobachten (Abb. 3.2, B und B''). Der *Knockdown* des Paralog *ncam1a* zeigt keine Auswirkungen auf die Zellproliferation des PrimI (Abb. 3.2, C). BrdU-markierte Zellen werden im gezeigten Primordium verstärkt in der *Trailing-Zone* beobachtet (Abb. 3.2, C''). *ncam1a*-Morphanten können weiterhin Protoneuromasten ausbilden und diese während der etwas verlangsamten Migration absetzen (Dries 2014).



**Abbildung 3.3: Quantifizierung BrdU-markierter Zellen im migrierenden Primordium zum Zeitpunkt 36 hpf.** Die statistische Auswertung zeigt die durchschnittliche Zahl BrdU-markierter Zellen in uninjizierten Embryonen sowie in *ncam1b*- und *ncam1a*-Morphanten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach der Studentischen *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: N: Anzahl der Experimente, n: Anzahl der Embryonen

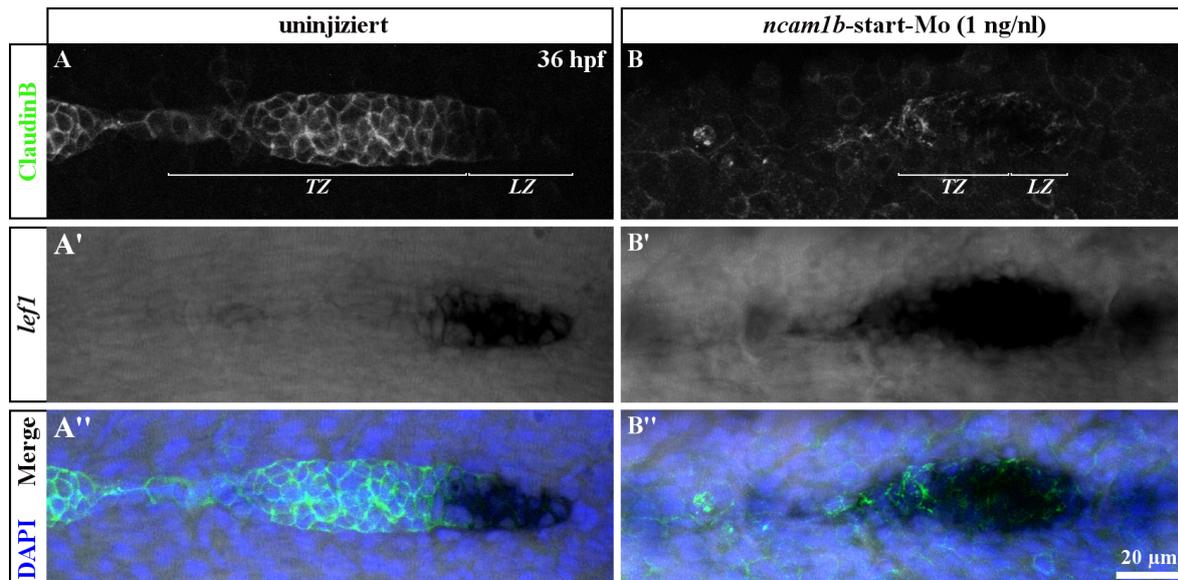
Für die statistische Auswertung des Proliferationsassays wurden nur solche Zellen gewertet, die sich von der unspezifischen Hintergrundfärbung deutlich absetzten. Die Quantifizierung ergibt für uninjizierte Embryonen durchschnittlich 10,94 ( $\pm 1,43$ ) BrdU-markierte Zellen im Primordium zum Zeitpunkt 36 hpf (Abb. 3.3). Für die Auswertung der Morpholino-Injektionen wurden immer sämtliche Embryonen eines Ansatzes berücksichtigt, unabhängig ihres Phänotyps. Dies führt in *ncam1b*-Morphanten zu durchschnittlich 2,02 ( $\pm 0,91$ ) proliferierenden Zellen und in *ncam1a*-Morphanten zu 10,99 ( $\pm 2,11$ ) BrdU-markierten Zellen. Die Studentische *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  zeigt, dass sich die Proliferation zwischen uninjizierten und *ncam1b*-Morphanten signifikant voneinander unterscheidet ( $p < 0,0001$ ). Ein *Knockdown* von *ncam1a* wirkt sich nicht signifikant aus ( $p = 0,98$ ).

### 3.1.2 Ncam1b nimmt Einfluss auf die Signalwege Wnt und Fgfr1a

#### Der *ncam1b*-Knockdown führt zu einer veränderten *lef1*-Verteilung

Das Primordium kann nicht nur morphologisch in zwei Zonen gegliedert werden, sondern auch funktionell. In der *Leading-Zone* führt der aktive Wnt-Signalweg zu einer Expression des Transkriptionsfaktors Lef1, wohingegen die *Trailing-Zone* von dem aktiven Fgfr1a-Signalweg dominiert wird. Die Begrenzung der funktionellen Zonen erfolgt durch die Expression entsprechender Inhibitoren, wie *Sef* in der *Leading-* und *Dkk* in der *Trailing-Zone*. Eine deutlich funktionelle Grenze dieser Signalzentren existiert nicht, sodass ein funktioneller Überlappungsbereich der Signalwege auftritt (Aman et al. 2011).

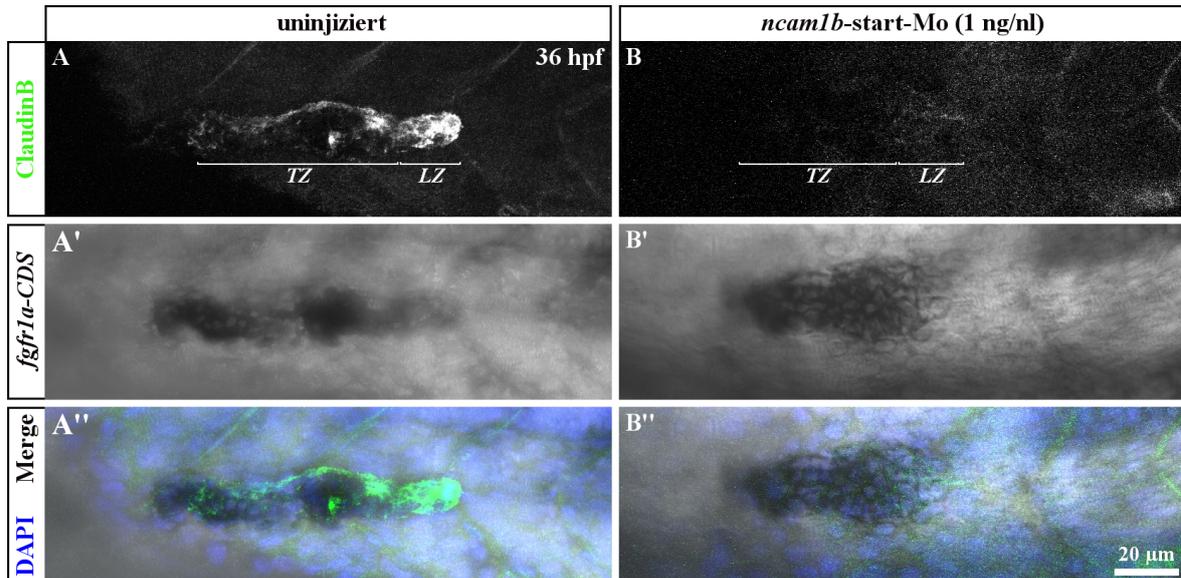
Ein klassisches Modell der Zellproliferation innerhalb des Primordiums geht von einer Schlüsselfunktion des Wnt-abhängigen Transkriptionsfaktors Lef1 aus, der die Proliferation einleitet (Aman et al. 2011, Gamba et al. 2010). Der Proliferationsassay zeigt eine verringerte Zellteilung in Primordien von *ncam1b*-Morphanten (Abb. 3.2, B-B''), weshalb im Nachfolgenden



**Abbildung 3.4: Veränderte Lokalisation von *lef1* in *ncam1b*-Morphanten bei 36 hpf.** **A-B**) Konfokale Lateralansicht des primären posterioren Seitenlinienprimordiums in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)* nach *in situ* Hybridisierung mit einer *lef1*-Sonde (Vergrößerung: 40x). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A-B**) Expression des transgen markierten ClaudinB. **A'-B')** Detektion der DIG-HRP-markierten *lef1*-Sonde durch NBT/BCIP. **A''-B'')** Überlagerung der Einzelkanäle mit DAPI. **A-A'')** Die *lef1*-Expression beschränkt sich in uninjizierten Embryonen auf die *Leading-Zone* und den Übergangsbereich zur *Trailing-Zone* des Primordiums. **B-B'')** *ncam1b*-Morphanten exprimieren *lef1* nicht nur im ersten caudalen Drittel, sondern auch rostral der *Leading-Zone*. Abkürzungen: **LZ**: *Leading-Zone*, **TZ**: *Trailing-Zone*

den die Transkription dieses klassischen Proliferationsmarkers in *ncam1b*-Morphanten untersucht werden soll.

*in situ* Hybridisierungen von *lef1* zum Zeitpunkt 36 hpf zeigen *lef1*-Transkripte innerhalb der *Leading-Zone* uninjizierter Embryonen (Abb. 3.4, A-A'). Im Übergangsbereich zur *Trailing-Zone* nimmt die Intensität der Sondenbindung ab, was auf die nach rostral zunehmende Inhibition des Wnt-Signalweges durch Dkk zurückzuführen ist (Abb. 3.4, A'). Ein Morpholino-induzierter *Knockdown* von *ncam1b* führt zu einer erhöhten mRNA-Synthese von *lef1* (Abb. 3.4, B-B'). Die räumliche Verteilung der mRNA beschränkt sich nicht länger auf das erste caudale Drittel des Primordiums, sondern kann auch in rostralen Bereichen detektiert werden. Da der NBT/BCIP-Niederschlag keine genauen Rückschlüsse auf eine deutliche morphologische Grenze zwischen *Leading-* und *Trailing-Zone* zulässt, kann nur spekuliert werden, ob im verkleinerten Primordium der *ncam1b*-Morphanten eine solche Trennung existiert. Es lässt sich jedoch vermuten, dass in den Zellen im rostralen Bereich des Primordiums die apikale Konstriktion eingeleitet werden kann, wodurch sich die Zellen in einer Rosette orientieren. Diese rosetten-ähnliche Zellanordnung ist in den *Knockdown*-Primordien zu sehen und deutet das Vorhandensein von *Leading-* und *Trailing-Zone* trotz verstärkter *lef1*-Transkription in *ncam1b*-Morphanten an (s. Abb. 3.1, B und 3.2, B').

***ncam1b*-Morphanten exprimieren den *Trailing-Zone*-Marker *Fgfr1a***

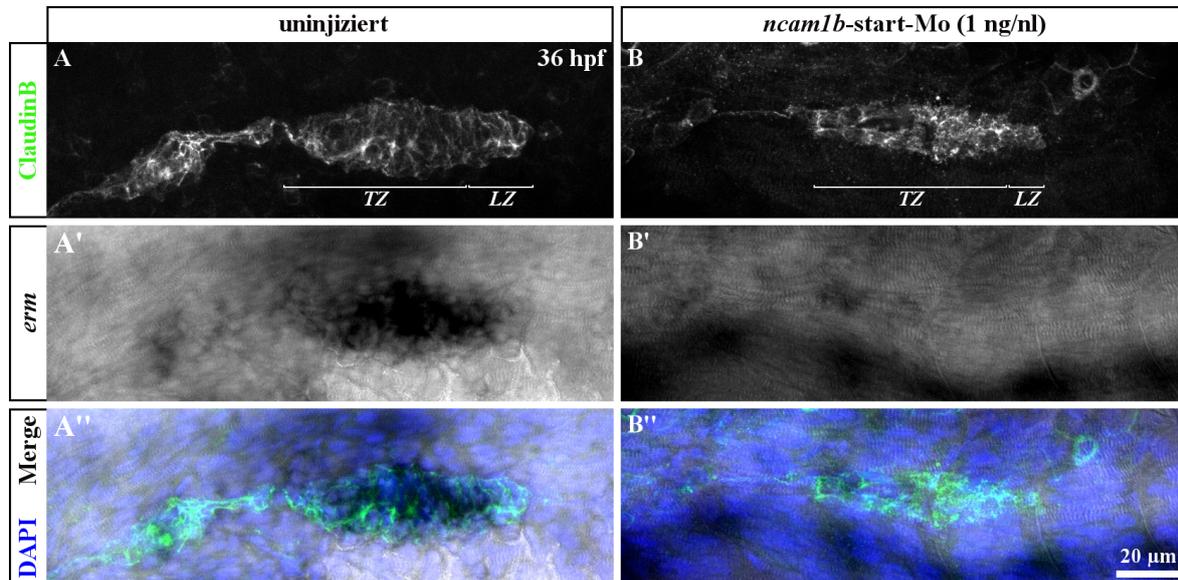
**Abbildung 3.5:** *ncam1b*-Morphanten transkribieren *fgfr1a-CDS* in der *Trailing-Zone* des Primordiums bei 36 hpf. **A-B''**) Konfokale Lateralansicht des primären posterioren Seitenlinienprimordiums in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)* nach *in situ* Hybridisierung mit einer *fgfr1a-CDS*-Sonde (Vergrößerung: 40x). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A-B**) Expression des transgen markierten ClaudinB. **A'-B'**) Detektion des NBT/BCIP-Niederschlags der DIG-HRP-gekoppelten *fgfr1a-CDS*-Sonde. **A''-B''**) Überlagerung der Einzelkanäle mit DAPI. **A-A''**) In uninjizierten Embryonen wird *fgfr1a* im Bereich der *Trailing-Zone* exprimiert. **B-B''**) Die Expressionsstärke nimmt nach caudal ab. Auch in der *Trailing-Zone* von *ncam1b*-Morphanten wird *fgfr1a* exprimiert. *Abkürzungen:* **LZ:** *Leading-Zone*, **TZ:** *Trailing-Zone*

Die Zellmorphologie des Primordiums in *ncam1b*-Morphanten deutet darauf hin, dass sich trotz des verkleinerten Phänotyps eine *Leading-* und *Trailing-Zone* im Primordium bilden. Nachdem sich die Lokalisation der *lef1*-mRNA nach einem *Knockdown* von *ncam1b* in rostrale Bereiche des Primordiums ausbreitet (Abb. 3.4), stellt sich die Frage, ob die Expression des Antagonisten *Fgfr1a* beeinflusst wird.

In der *Trailing-Zone* kann durch *in situ* Hybridisierungen zum Zeitpunkt 36 hpf eine Expression von *fgfr1a* beobachtet werden (Abb. 3.5, A-A''). Nach caudal nimmt die Signalintensität ab; im Bereich der *Leading-Zone* wird *fgfr1a* nur sehr schwach exprimiert.

Im rostralen Bereich des verkleinerten Primordiums der *ncam1b*-Morphanten zeigt die markierte Sonde ebenfalls eine Bindung an die *fgfr1a*-mRNA (Abb. 3.5, B-B''). In der caudalen Zone nimmt die Intensität ab, was für eine schwache Konzentration von *fgfr1a* in diesem Bereich spricht. Diese Beobachtungen bestätigen, dass in den Primordien von *ncam1b*-Morphanten eine morphologisch und funktionell unterscheidbare *Leading-* und *Trailing-Zone* etabliert wird. Der Überlappungsbereich der Signalwege Wnt und *Fgfr1a* ist jedoch größer als in der Kontrollgruppe.

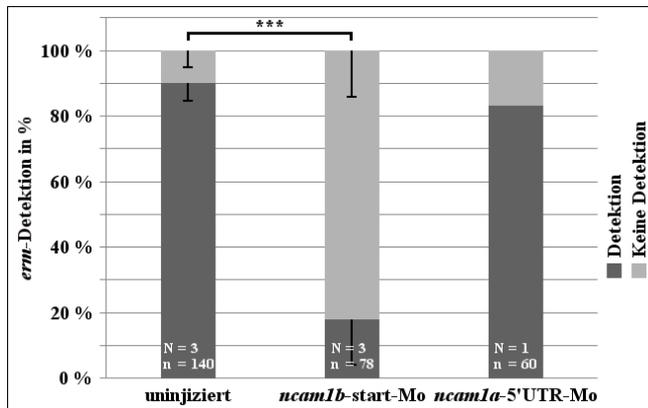
### Ncam1b beeinflusst die Fgfr1a-Signaltransduktion



**Abbildung 3.6: Verringerte Transkription des Fgfr1a-Zielgens *erm* in *ncam1b*-Morphanten zum Zeitpunkt 36 hpf. A-B''**) Konfokale Lateralansicht des primären posterioren Seitenlinienprimordiums in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lymGFP)* nach *in situ* Hybridisierung mit einer *erm*-Sonde (Vergrößerung: 40x). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A-B**) Expression des transgen markierten ClaudinB. **A'-B'**) Detektion der DIG-markierten *erm*-Sonde mit NBT/BCIP. **A''-B''**) Überlagerung der Einzelkanäle mit DAPI. **A-A''**) In uninjizierten Embryonen wird *erm* in der *Trailing-Zone* des Primordiums exprimiert. **B-B''**) *ncam1b*-Morphanten zeigen hingegen keine Genaktivität des Fgfr1a-Zielproteins Erm.  
Abkürzungen: **LZ**: *Leading-Zone*, **TZ**: *Trailing-Zone*

Der Wnt-abhängige Transkriptionsfaktor Lef1 gilt als ein Schlüsselprotein in der Zellproliferation des Primordiums. Es wäre zu erwarten, dass die reduzierte Proliferation in *ncam1b*-Morphanten auf eine reduzierte *lef1*-Transkription zurückzuführen ist. Stattdessen wurde jedoch eine gesteigerte Expression von *lef1* und eine normale Expression von *fgfr1a* beobachtet. Aman et al. (2011) zeigen, dass eine Überexpression von Lef1 zwar zu einem deutlichen Anstieg der Proliferation führt, sich eine Inhibierung hingegen nur schwach auswirkt. Eine Hemmung des Fgfr1a führt hingegen zu einer deutlichen Herabsetzung der Proliferationsrate. Das nachfolgende Experiment soll Aufschluss darüber geben, ob in *ncam1b*-Morphanten eine Aktivierung des Fgfr1a ausbleibt und die reduzierte Proliferation in den Morphanten eine Folge der nicht-Aktivierung des Fgfr1a ist. Dazu wird eine *erm*-Sonde eingesetzt. ERM ist ein Transkriptionsfaktor, der in Säugern bei der Differenzierung und Proliferation eine Rolle spielt (Akagi et al. 2015).

In uninjizierten Embryonen kann *erm* im Bereich der *Trailing-Zone* detektiert werden (Abb. 3.6, A-A''). Dies entspricht dem Wirkungsbereich des Fgfr1a (vgl. Abb. 3.5, A-A''). Nach caudal nimmt die Signalstärke ab. Im Bereich der *Leading-Zone* ist *erm* nur schwach zu sehen, was mit der Expression des Wnt-abhängigen Fgfr1a-Inhibitors Sef korreliert. Dieser wird in der *Leading-Zone* exprimiert und hemmt die Aktivität des Fgf-Rezeptors (Aman und Piotrowski 2008). In *ncam1b*-Morphanten ist lediglich ein sehr schwaches SONDENSIGNAL im äußersten rostralen Bereich des Primordiums zu sehen (Abb. 3.6, B-B''). Dies deutet darauf hin, dass die Fgfr1a-Signaltransduktion in *ncam1b*-Morphanten gestört ist.

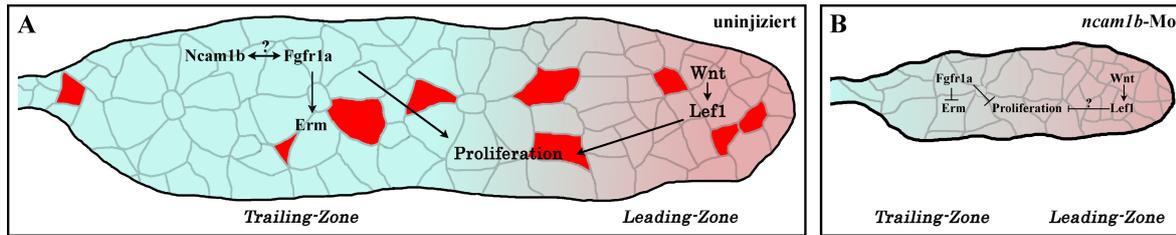


**Abbildung 3.7: Quantifizierung der Genexpression des Fgfr1a-Zielgens *erm*.** Die statistische Auswertung zeigt den prozentualen Anteil der Genexpression des Fgfr1a-Zielgens *erm* in uninjizierten, *ncam1b*-start- und *ncam1a*-5'UTR-Morpholino injizierten Embryonen. Die Detektion erfolgte anhand des NBT/BCIP-Niederschlags der DIG-HRP-markierten *erm*-Sonde im Bereich der *Trailing-Zone* des Primordiums. 82% ( $\pm 14\%$ ) der *ncam1b*-Morphanten zeigen keine Sondendetektion. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach dem  $\chi^2$ -Test zum Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . *Abkürzungen:* N: Anzahl der Experimente, n: Anzahl der Embryonen.

Die reduzierte Transkription von *erm* in Primordien von *ncam1b*-Morphanten wurde nach der *in situ* Hybridisierung statistisch ausgewertet (Abb. 3.7). Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass Ncam1b die Fgfr1a-Aktivität beeinflusst. Bislang ist bekannt, dass Erm in der frühen Embryonalentwicklung durch die Bindung von Fgf8 an Fgfr1a in Bereichen der Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze und dem Metencephalon exprimiert wird (Roehl und Nüsslein-Volhard 2001). Diese Bindung ist in *ncam1b*-Morphanten nach wie vor vorhanden und wurde als Marker für eine erfolgreiche *in situ* Hybridisierung genutzt. Die statistische Auswertung der *erm*-Expression beschränkte sich jedoch auf die Sondendetektion im Primordium. Konnte durch die *in situ* Hybridisierung eine Expression von *erm* nachgewiesen werden, so wurde diese als Detektion erfasst; lag keine Bindung im Primordium vor, so wurde diese als keine Detektion notiert.

In uninjizierten Embryonen kann in 90% ( $\pm 5,20\%$ ) der Embryonen mRNA des Fgfr1a-Zielgens in der *Trailing-Zone* des Primordiums detektiert werden. Lediglich 10% ( $\pm 5,20\%$ ) zeigen keine Bindung der Sonde. Nach Injektion des *ncam1b*-start-Morpholinos ist in 82% ( $\pm 14\%$ ) der injizierten Embryonen keine detektierbare *erm*-mRNA im Primordium zu sehen. In 18% ( $\pm 14,00\%$ ) der injizierten Embryonen bindet die *erm*-Sonde an die komplementäre mRNA. Der Morpholino-*Knockdown* von *ncam1a* wurde nur einmal durchgeführt, weshalb über die Auswirkungen eines *ncam1a*-*Knockdowns* nur eine tendenzielle Aussage getroffen werden kann. Ca. 83% der *ncam1a*-Morphanten zeigen eine Bindung der *erm*-Sonde im Primordium, wohingegen in ca. 17% keine Expression im Primordium zu sehen ist. Die Signifikanzberechnung nach dem  $\chi^2$ -Test ergab einen signifikanten Unterschied von  $p < 0,001$  zwischen uninjizierten Embryonen und *ncam1b*-Morphanten.

Die bisher durchgeführten Untersuchungen zeigen nicht nur phänotypische Veränderungen eines *ncam1b*-*Knockdowns* während der Entwicklung des pSLO, sondern auch erstmals den Einfluss von Ncam1b auf die Signalwege Wnt und Fgfr1a. Die Primordien der *ncam1b*-Morphanten lassen noch immer eine Unterteilung in *Leading-* und *Trailing-Zone* erkennen, obwohl sich der überlappende Bereich des Wnt- und Fgfr1a-Signalweges vergrößert. Die Überprüfung der Zellproliferation ergibt trotz erhöhter *lef1*-Expression eine stark reduzierte Teilungsrate primordialer Zellen in *ncam1b*-Morphanten. Die Expression des Fgfr1a-Zielgens



**Abbildung 3.8: Reduzierte Fgfr1a-Signaltransduktion und Proliferation in *ncam1b*-Morphanten.**  
**A)** Das Primordium kann morphologisch und funktionell in eine Wnt-dominierende *Leading-Zone* und eine Fgfr1a-aktive *Trailing-Zone* unterteilt werden. Die Proliferation (rot) wird sowohl durch den Wnt-abhängigen Transkriptionsfaktor Lef1 reguliert als auch, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, durch einen Ncam1b-vermittelten Faktor. Bei diesem könnte es sich um Erm handeln, dessen Expression durch eine Bindung von Ncam1b-Fgfr1a induziert wird. **B)** *ncam1b*-Morphanten können trotz des verkleinerten Phänotyps in eine morphologische *Leading-Zone* und *Trailing-Zone* unterteilt werden. Funktionell kann jedoch weder eine Zellproliferation noch eine Aktivierung des Fgfr1a nachgewiesen werden.

*erm* ist in *ncam1b*-Morphanten ebenfalls stark reduziert, obwohl der Rezeptor in der *Trailing-Zone* vorliegt. Dies deutet auf eine Ncam1b-vermittelte Aktivierung von Fgfr1a und eine dadurch induzierte Proliferation hin (zusammengefasst in Abb. 3.8).

### 3.1.3 Im Zebrafisch werden verschiedene Fgfr1a-Isoformen exprimiert

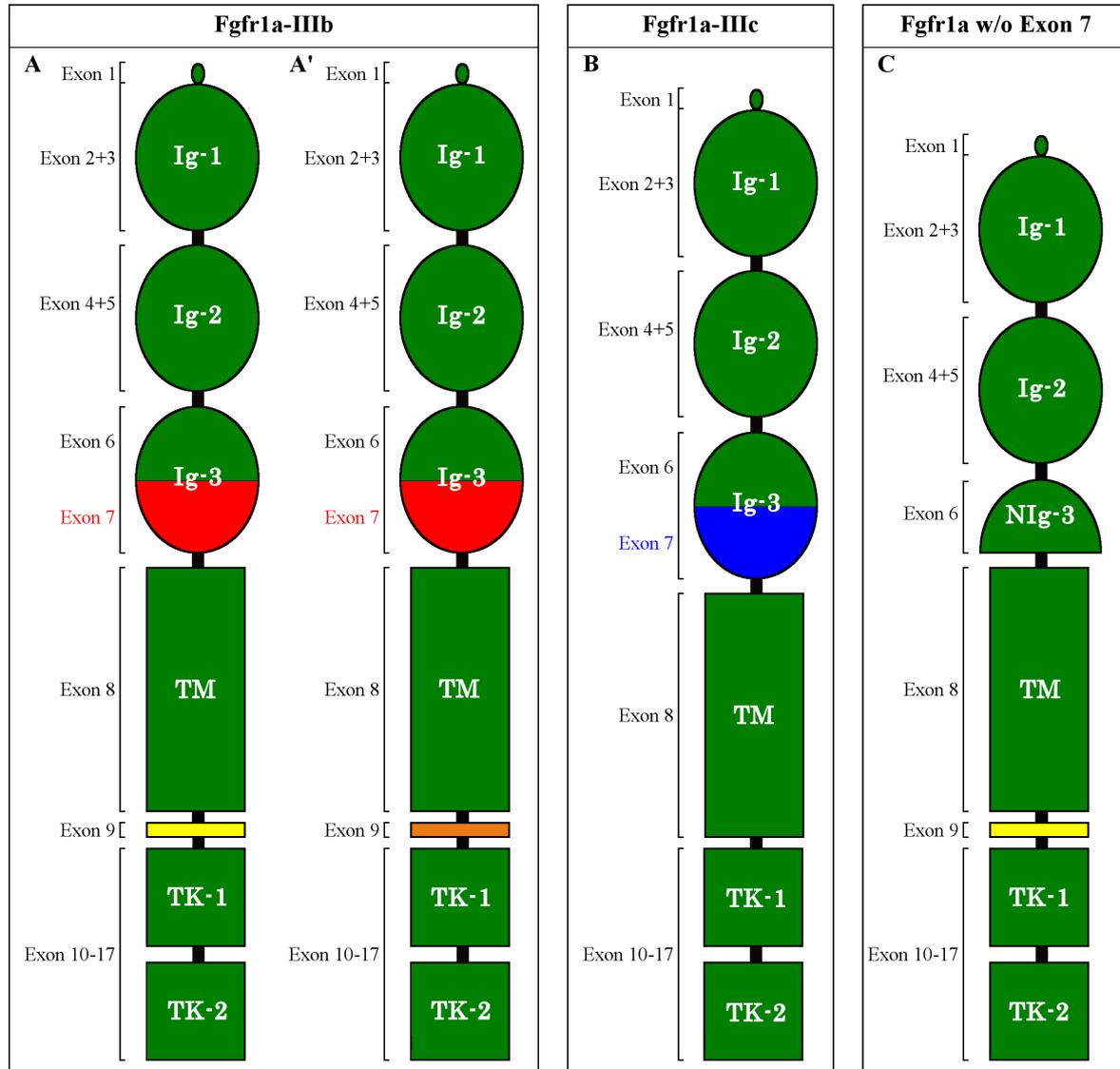
#### Isolierung von Fgfr1a-Isoformen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten

Ein *Knockdown* von *ncam1b* führt zu einer fehlenden Expression von Ncam1b in der *Trailing-Zone* des Primordiums. In diesem Bereich wird auch der Rezeptor Fgfr1a exprimiert. Aufgrund der beobachteten Phänotypen und funktionellen Veränderungen während der Entwicklung des pSLO in *ncam1b*-Morphanten wird vermutet, dass Ncam1b ein Interaktionspartner von Fgfr1a darstellt und eine Bindung von Ncam1b an Fgfr1a eine spezifische Ncam1b-Fgfr1a-vermittelte Signalkaskade induziert. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden Interaktionsstudien in Zellkulturen und Bead-Aggregationsstudien durchgeführt. Hierzu musste zunächst die codierende mRNA des Fgfr1a zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien aus Zebrafischembryonen isoliert, in Expressionsvektoren kloniert und sequenziert werden. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf Splice-Varianten der dritten Ig-Domäne des Rezeptors, da diese als mögliche Interaktionsstelle mit NCAM1 diskutiert wird (Kiselyov et al. 2003).

In der Datenbank *ensembl* finden sich zwei Splice-Varianten von Fgfr1a im Zebrafisch. Scholpp et al. (2004) publizieren eine Isoform mit einer codierenden Sequenz von 2436 bp (812 AS) (Gene-ID: AY197498.1) zum Entwicklungszeitpunkt 12 hpf. Diese Isoform wird im Folgenden, homolog zu Splice-Isoformen in Säugern, als Fgfr1a-IIIc bezeichnet (Groth und Lardelli 2002). Zusätzlich postulieren Algorithmen der Datenbank *ensembl* eine weitere Splice-Variante der Ig-3 Domäne. Scholpp et al. (2004) isolieren diese Isoform teilweise, konnten die codierende Sequenz jedoch nicht vollständig publizieren (Gene-ID: AY197501.1). Diese wird nachstehend als Fgfr1a-IIIb bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit konnte aus dem Transkriptom eines Embryonenpools aus 50 Individuen zum Entwicklungszeitpunkt 48 hpf die Isoform Fgfr1a-IIIb isoliert werden, deren Exon 9 für zwei Serin-Aminosäuren codiert (Abb. 3.9, A). Eine weitere Variante des Rezeptors konnte aus den Entwicklungsstadien 24 hpf, 3 dpf und 7 dpf isoliert werden (Abb. 3.9, A'). Diese weist, wie die bereits zuvor gefundene Isoform, das als IIIb bezeichnete Exon 7 auf, unterscheidet sich jedoch im Bereich des Exons 9 (Abb. 3.9, A'). Das für die Juxtamembran-Domäne codierende Exon 9 bildet in dieser Variante ein Valin und ein Theorin aus. Da sich der extrazelluläre Bereich, welcher für eine Interaktion in Frage kommt, dieser Isoformen nicht unterscheidet, werden sie nachfolgend als Fgfr1a-IIIb zusammengefasst. Die bereits vollständig publizierte Isoform IIIc konnte aus dem Transkriptom von Embryonen im Stadium 24 hpf isoliert werden und enthält kein Exon 9 (Abb. 3.9, C). Das Exon 7 der Splice-Variante IIIb codiert für 49 Aminosäuren; IIIc trägt die genetische Sequenz für 48 Aminosäuren. Fgfr1a-IIIb und -IIIc weisen für die Proteinsequenz des Exons 7 eine Homologie von 47% auf.

In Säugern wurde eine Interaktion zwischen der zweiten Fibronectin-Domäne von NCAM1 und dem C-terminalen Bereich der Ig-3 Domäne des FGFR1 beschrieben (Kiselyov et al. 2003). Sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zeigen, dass die Ncam1-Paralogue und Fgfr1a-Isoformen auf vergleichbare Weise miteinander interagieren, stellt sich die Frage, welche Auswirkungen ein Fehlen des C-terminalen Bereichs der Ig-3 Domäne haben würde.



**Abbildung 3.9: Expression verschiedener Fgfr1a-Isoformen des Exon 7 im Zebrafisch. A-C)** Isolierung von Fgfr1a-Isoformen, die eine Abwandlung von Exon 7 und Exon 9 aufzeigen, aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Zebrafischs. Die Bezeichnung der Isoformen ist auf die dritte Ig-Domäne (III) und die Kategorisierung in Mäusen zurückzuführen (IIIb und IIIc). **A)** Expression der IIIb-Isoform zum Entwicklungszeitpunkt 48 hpf. Das für die Juxtamembran-Domäne codierende Exon 9 enthält zwei Serin-Aminosäuren. **A')** Die aus den Entwicklungsstadien 24 hpf, 3 und 7 dpf isolierte Isoform IIIb entspricht in ihrem extrazellulären Bereich der Isoform aus (A), jedoch unterscheidet sich die Aminosäureabfolge des Exons 9, das bei dieser Isoform für ein Valin und ein Theorin codiert. **B)** Isolierung der Fgfr1a-IIIc Isoform aus dem Entwicklungsstadium 24 hpf. Diese Isoform zeigt keine Expression des Exon 9. **C)** Synthetisierte artifizielle Isoform des Fgfr1a ohne Exon 7. In dieser Form ist nur die N-terminale Ig-3 Domäne enthalten. **Abkürzungen:** **Ig-1-3:** Immunglobulin-Domäne 1-3, **TM:** Transmembrandomäne, **TK-1-2:** Tyrosin-Kinase Domäne 1-2, **w/o:** without

Hierfür wurde ausgehend von Fgfr1a-IIIb durch Fusion-PCR ein artifizieller Fgfr1a synthetisiert, der über keinen C-terminalen Bereich der Ig-3 Domäne mehr verfügt (Abb. 3.9, C). Aufgrund des fehlenden Exon 7 wird dieser als Fgfr1a w/o Exon 7 (*w/o: without*) bezeichnet.

### Expression der codierenden Sequenz von Ncam1a und Ncam1b sowie der Fgfr1a-Isoformen in Zellkulturen

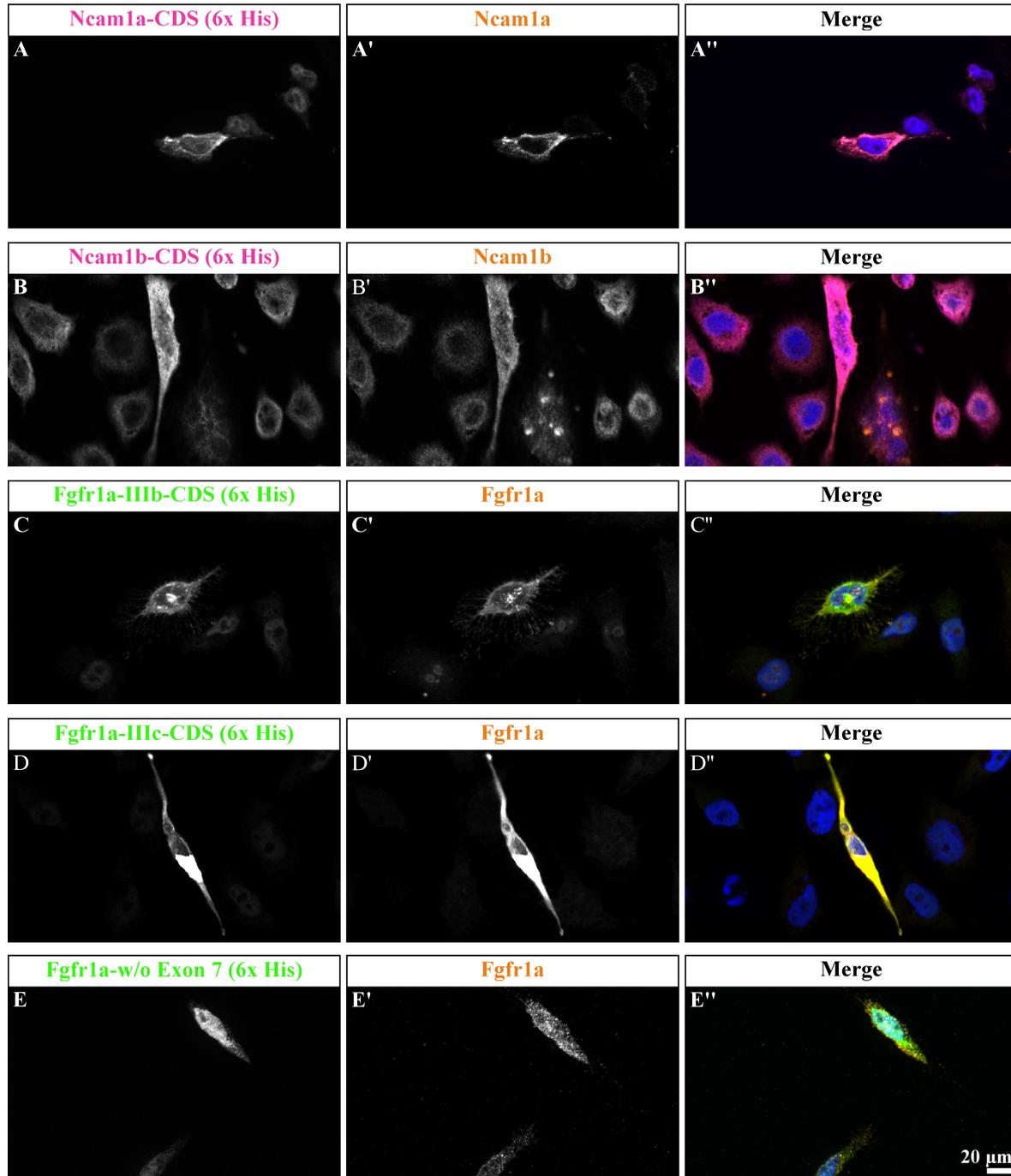
Nach der Isolierung, Klonierung und Sequenzierung verschiedener Splice-Varianten des Fgfr1a erfolgte die Transfektion der jeweiligen Plasmide in Zellen der Säuger-Zelllinie *CHO-K1*. Die Plasmide der codierenden Sequenz von Ncam1a und Ncam1b wurden laborintern kloniert und zur Verfügung gestellt (Schober 2016). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte anhand einer Antikörperdetektion des an die Gensequenz klonierten His-Tags. Um sicherzustellen, dass es sich bei den eingebrachten Plasmiden und den durch den His-Tag markierten Proteinen tatsächlich um die jeweiligen Proteine Ncam1a, Ncam1b und Fgfr1a handelt, wurden diese zusätzlich mit einem proteinspezifischen Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.10).

Zellen, welche mit einem Ncam1a-codierenden Plasmid transfiziert wurden und dieses exprimieren, können mit einem Antikörper gegen den His-Tag detektiert werden (Abb. 3.10, A). Die Färbung des Ncam1a-Epitops überlagert mit der Expression des His-markierten Proteins und zeigt, dass es sich hierbei um die Expression von Ncam1a handelt (Abb. 3.10, A'). Alle Zellen wurden zusätzlich mit DAPI angefärbt. Die Überlagerung der Einzelkanäle zeigt jedoch, dass nicht alle Zellen transfiziert wurden. Damit liegt eine interne Kontrolle für die Spezifität der Antikörper vor (Abb. 3.10, A'').

Die immunhistochemische Färbung der Ncam1b-transfizierten Zellen weist eine Hintergrundfärbung durch die eingesetzten Antikörper auf (Abb. 3.10, B-B''). Die transfizierte Zelle setzt sich durch ein wesentlich stärkeres Signal ab und kann folglich durch die jeweiligen Antikörper eindeutig detektiert werden.

Die Fgfr1a-Isoformen IIIb und IIIc zeigen nach der immunhistochemischen Färbung ein Signal des His-Tags, das mit der Expression des jeweiligen Rezeptors übereinstimmt (Abb. 3.10, C-C'' und D-D''). Der Antikörper gegen Fgfr1a bindet im C-terminalen Bereich des Proteins, sodass alle Splice-Varianten lokalisiert werden können. In den umliegenden nicht-transfizierten Zellen ist keine Expression von Fgfr1a zu sehen.

Zellen, die den artifiziellen Rezeptor ohne Exon 7 exprimieren, können ebenfalls durch die immunhistochemische Färbung des His-Tags- und der Fgfr1a-Expression spezifisch bestimmt werden (Abb. 3.10, E-E'').



**Abbildung 3.10:** Expression der Ncam1-Paralogen und Fgfr1a-Isoformen in *CHO-K1*-Zellen. **A-E)** Immunhistochemischer Nachweis des His-Tags. **A'-E')** Spezifische Antikörperfärbung der zu exprimierenden Proteine. **A''-E'')** Überlagerung der Einzelkanäle mit DAPI (Vergrößerung: 63x Öl). **A-A'')** Proteinexpression von Ncam1a, gebunden an einen His-Tag. Zellen, die kein Ncam1a-His exprimieren, werden nicht durch den spezifischen Antikörper detektiert. **B-B'')** Expression der vollständigen codierenden Sequenz (CDS) von Ncam1b. **C-C'')** Proteinexpression von Fgfr1a-IIIb. **D-D'')** Expression der Fgfr1a-Isoform IIIc. **E-E'')** Detektion des artifiziiellen Fgfr1a-w/o Exon 7 (*w/o: without*).

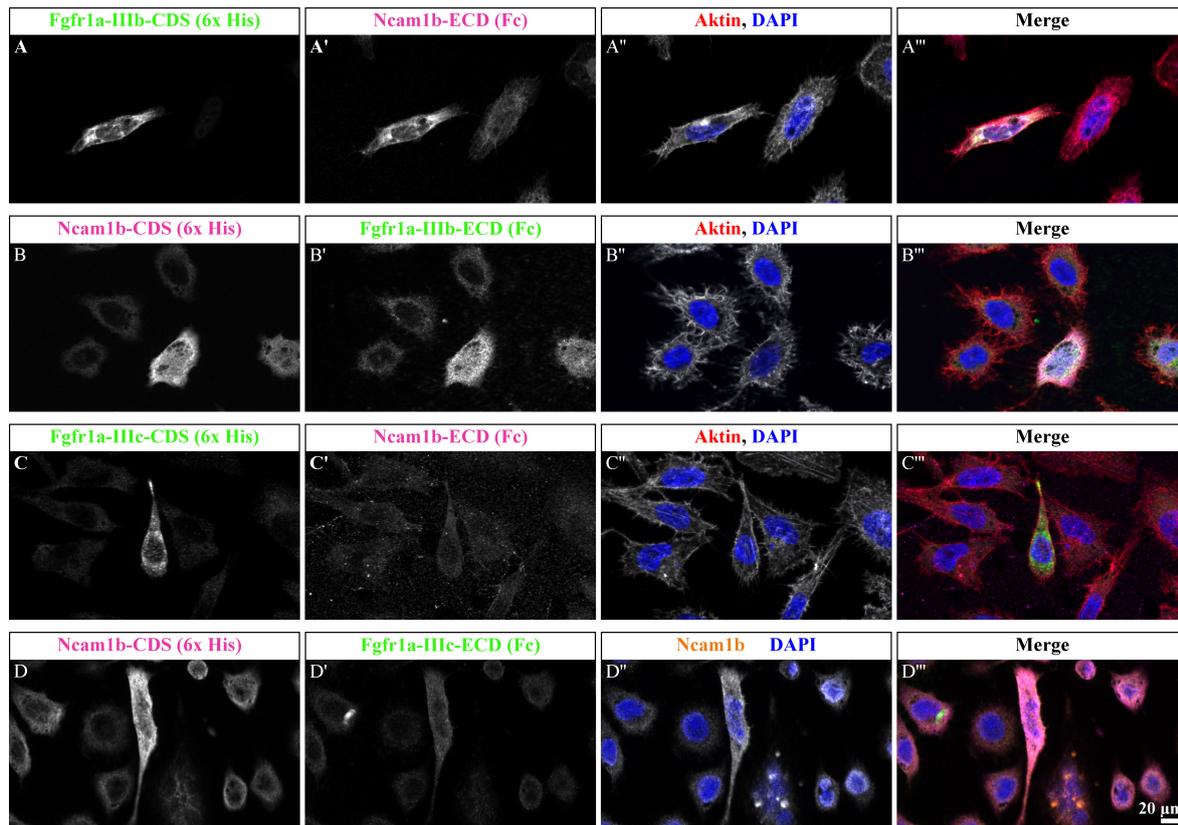
### 3.1.4 Ncam1-Paraloge interagieren unterschiedlich mit Fgfr1a-Isoformen

Der Nachweis einer möglichen Interaktion der Ncam1-Paraloge mit verschiedenen Fgfr1a-Isoformen wurde zunächst in Overlay-Assays in Zellkultur durchgeführt. Hierfür wurden *CHO-K1*-Zellen individuell mit Plasmiden transfiziert, welche die codierende Sequenz der jeweiligen Proteine tragen. Die Zellen wurden dann mit möglichen Interaktionspartnern, die zuvor als lösliche Proteine synthetisiert wurden (Kap. 2.2.10), inkubiert. Alle transfizierten, membrangebundenen Proteine können mittels eines His-Tags und alle löslichen, durch Interaktion gebundenen Proteine durch einen Fc-Tag nachgewiesen werden. Die Untersuchung einer Co-Lokalisation der beiden Tags und folglich einer Wechselwirkung der Proteine erfolgte nach der immunhistochemischen Färbung durch Fluoreszenzmikroskopie.

#### Ncam1b interagiert mit Fgfr1a-IIIb, schwächer mit Fgfr1a-IIIc

Die Transfektion von *CHO-K1*-Zellen mit Fgfr1a-IIIb führt zur Expression des membranengebundenen Rezeptors (Abb. 3.11, A). Die Färbung des Zytoskeletts und der DNA zeigt, dass nicht alle Zellen den Rezeptor exprimieren (Abb. 3.11, A''). Der exprimierte Fgfr1a-IIIb bindet das exogen zugegebene, lösliche Ncam1b-Fc-Protein; die untransfizierte Zelle zeigt keine Wechselwirkung (Abb. 3.11, A' und A'''). Um methodische Artefakte auszuschließen, wurden die Overlay-Assays ebenfalls in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Zellen, welche nun Ncam1b membrangebunden exprimieren, binden lösliches Fgfr1a-IIIb-Fc-Protein (Abb. 3.11, B-B'''). Dadurch kann die Interaktion unabhängig von der Expressionsart nachgewiesen werden. Zellen, welche kein Ncam1b exprimieren, zeigen keine Bindung von Fgfr1a-IIIb.

Aus dem Transkriptom von Zebrafischembryonen konnte eine weitere Splice-Variante isoliert werden: Fgfr1a-IIIc. Zellen, welche diesen Rezeptor exprimieren, zeigen nach Inkubation mit löslichem Ncam1b-Fc-Protein eine schwache bis nahezu kaum detektierbare Bindung (Abb. 3.11, C'' und C'''). Am überwiegenden Teil der Fgfr1a-IIIc transfizierten Zellen lässt sich keine Bindung des löslichen Ncam1b-Proteins als potenzieller Bindungspartner nachweisen. Einige wenige Zellen zeigen jedoch eine Wechselwirkung von Fgfr1a-IIIc mit Ncam1b. Dies ist in Abbildung 3.11, D-D'''' für Ncam1b-exprimierende Zellen nach Inkubation mit löslichem Fgfr1a-IIIc zu erkennen. Diese vereinzelt Interaktionen wurden unabhängig davon beobachtet, ob Ncam1b oder Fgfr1a-IIIc als membrangebundenes Protein exprimiert wurde.

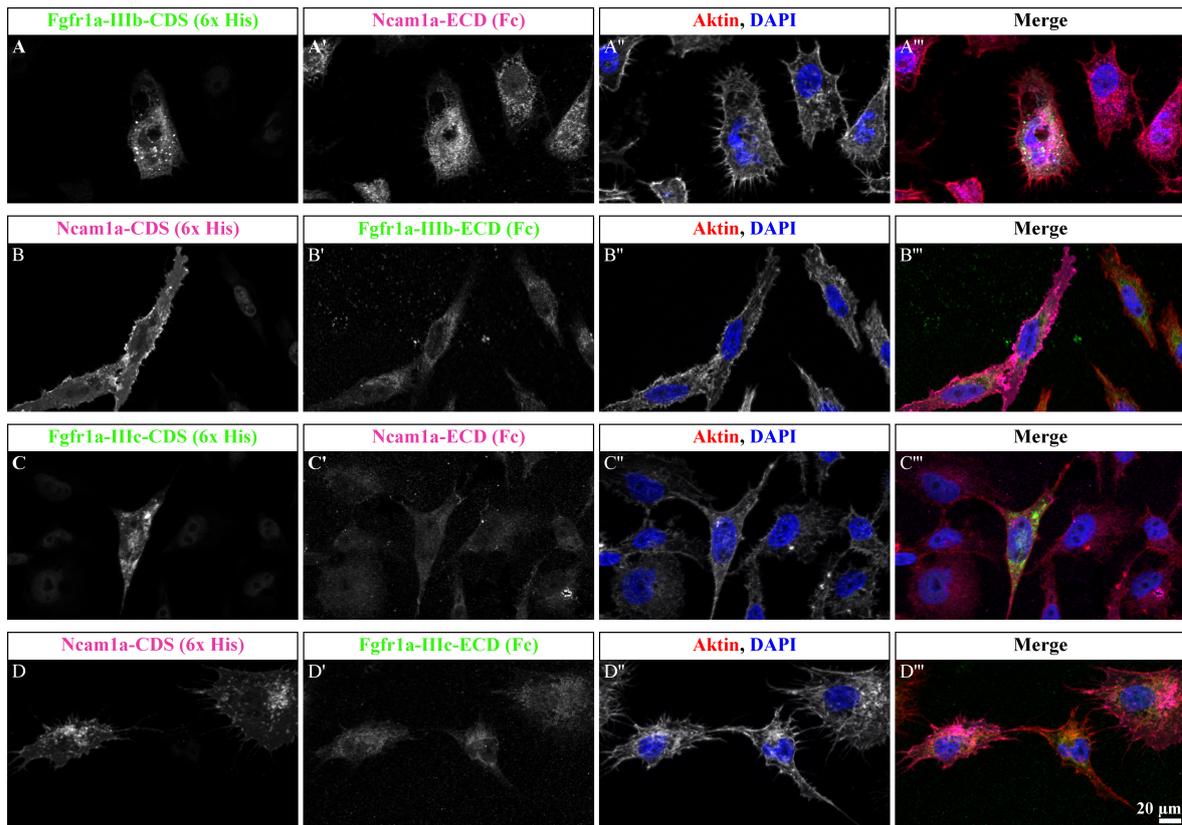


**Abbildung 3.11: Ncam1b interagiert mit Fgfr1a-IIIb und schwach mit Fgfr1a-IIIc. A-D)** Expression His-markierter Proteine in *CHO-K1*-Zellen. **A'-D')** Detektion des Fc-Tags, der als lösliches Protein zugegebenen potentiellen Interaktionspartner. **A''-C'')** Immunhistochemische Färbung des Zytoskeletts und der DNA. **D'')** Ncam1b und DAPI. **A'''-D''')** Überlagerung der Einzelkanäle (Vergrößerung: 63x Öl). **A-A''')** Membrangebundener Fgfr1a-IIIb interagiert mit löslichem Ncam1b. **B-B''')** Ncam1b interagiert mit exogenem Fgfr1a-IIIb. **C-C''')** Fgfr1a-IIIc zeigt keine Bindung mit löslichem Ncam1b. **D-D''')** Membrangebundenes Ncam1b interagiert schwach mit Fgfr1a-IIIc.

### Ncam1a kann Wechselwirkungen mit Fgfr1a-IIIb eingehen, aber nicht mit Fgfr1a-IIIc

Ähnlich wie die Interaktion von Ncam1b mit Fgfr1a-IIIc verhält sich die Bindung von Ncam1a an Fgfr1a-IIIb. Zellen, welche die IIIb-Isoform des Fgf-Rezeptors exprimieren, zeigen eine schwache bis kaum nachweisbare Bindung von löslichem Ncam1a (Abb. 3.12, A-B'''). Diese Wechselwirkung konnte nur bei wenigen Zellen beobachtet werden (Abb. 3.14). In gleicher Art und Weise verhält sich membrangebundenes Ncam1a zu löslichem Fgfr1a-IIIb. Die Mehrheit der transfizierten Zellen zeigt keine Co-Lokalisation der Proteine (Abb. 3.12, B-B''').

Die Untersuchung einer Interaktion von Ncam1a mit Fgfr1a-IIIc führt hingegen zu einem eindeutigen Ergebnis. Es kann weder eine Bindung von löslichem Ncam1a-Fc-Protein an membrangebundenen Fgfr1a-IIIc detektiert werden, noch eine Interaktion zwischen exprimiertem Ncam1a und löslichem Fgfr1a-IIIc-Fc-Protein (Abb. 3.12, C-D'''). Die Antikörperfärbung des Fc-Tags der löslichen Proteine zeigt keinen Signalunterschied zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Zellen.

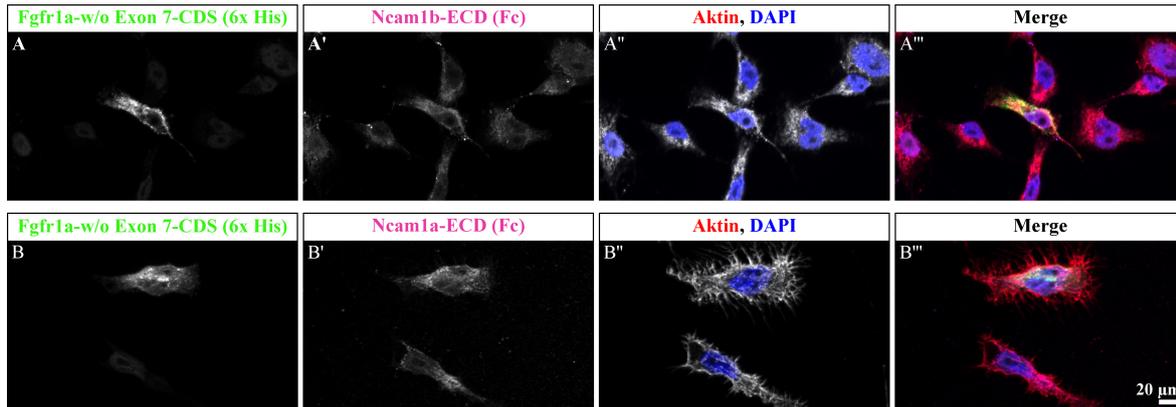


**Abbildung 3.12: Ncam1 bildet schwache Wechselwirkungen mit Fgfr1a-IIIb aus, aber nicht mit Fgfr1a-IIIc. A-D)** Detektion membrangebundener Proteine mittels His-Tag in *CHO-K1*-Zellen. **A'-D')** Immunhistochemischer Nachweis des Fc-Tags der möglichen Bindungspartner. **A''-D'')** Zytoskelett und DAPI-Färbung. **A'''-D''')** Überlagerung der Einzelkanäle (Vergrößerung: 63x Öl). **A-A''')** Membrangebundener Fgfr1a-IIIb interagiert schwach mit löslichem Ncam1a. **B-B''')** Keine Wechselwirkung zwischen exprimiertem Ncam1a und exogen zugegebenem Fgfr1a-IIIb zu beobachten. **C-C''')** Die Fgfr1a-Isoform IIIc interagiert nicht mit Ncam1a. **D-D''')** Membrangebundenes Ncam1a weist keine Bindung von löslichem Fgfr1a-IIIc auf.

### Der C-terminale Bereich der Ig-3 Domäne von Fgfr1a interagiert mit den Ncam1-Paralogen

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine unterschiedliche Bindungsaffinität der Ncam1-Paralogen zu den Splice-Varianten des Fgfr1a hin, die sich in der codierenden Sequenz des Exon 7 unterscheiden. Eines von drei potentiellen Interaktionsereignissen zwischen NCAM1 und FGFR1 in Säugern beruht auf Wechselwirkungen zwischen der zweiten Fibronectin-Domäne (NCAM1) und dem C-terminalen Bereich der dritten Ig-Domäne (FGFR1) (Kiselyov et al. 2003). Dieser Bereich des Fgfr1a wird im Zebrafisch durch das Exon 7 codiert. Erfolgt die Bindung der Ncam1-Paralogen in diesem Bereich, so wäre es denkbar, dass ein Fehlen des Exon 7 zu einem Verlust der Bindungsaffinität führt. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde in einer Fusion-PCR (Kap. 2.2.5) ein artifizieller Fgf-Rezeptor 1a kloniert, dem der C-terminale Bereich der dritten Ig-Domäne fehlt.

Die Inkubation der mit Fgfr1a-w/o Exon 7-transfizierten Zellen mit Ncam1b-Fc-Protein zeigt keine Co-Lokalisation der beiden Proteine (Abb. 3.13, A-A'''). Nicht-transfizierte Zellen, die durch Färbung des Zytoskeletts und der DNA zu sehen sind, können ebenso keine Wechselwirkungen mit dem löslichen Protein eingehen. Der C-terminale Bereich der dritten



**Abbildung 3.13: Der C-terminale Bereich der Ig-3 Domäne des Fgfr1a ist an der Bindung der Ncam1-Paraloge beteiligt. A-B)** Expression des His-Tag-markierten membrangebundenen Fgfr1a ohne Exon 7 (*w/o*: without) in *CHO-K1*-Zellen (Vergrößerung: 63x Öl). **A'-B')** Immunhistochemischer Nachweis der möglichen Interaktionspartner durch Fc-Tag. **A''-B'')** Färbung des Zytoskeletts und der DNA. **A'''-B''')** Überlagerung der Einzelkanäle. **A-A''')** Eine Bindung von Ncam1b an Fgfr1a ist ohne die C-terminale Domäne von Ig-3 des Rezeptors nicht möglich. **B-B''')** Membrangebundener Fgfr1a zeigt ohne Exon 7 keine Co-Lokalisation mit Ncam1a.

Ig-Domäne des Rezeptors ist also für eine Bindung an Ncam1b unabdingbar. Auch Ncam1a bindet nicht an den Fgfr1a *w/o* Exon 7 (Abb. 3.13, B-B''').

### Die statistische Auswertung der Zellkulturexperimente zeigt eine unterschiedliche Affinität der Ncam1-Paraloge zu Fgfr1a-Isoformen

Die Immunfluoreszenzaufnahmen der Overlay-Assays lassen bereits eine Tendenz erkennen, wonach die Bindungsaffinität zwischen Fgfr1a-IIIb und Ncam1b am höchsten und die Bindungsaffinität zwischen Fgfr1a-IIIc und Ncam1a am geringsten ist. Zur Quantifizierung wurde an einem Konfokalmikroskop ausgezählt, wie viele der transfizierten Zellen eine Bindung mit dem als lösliches Protein zugegebenen potenziellen Interaktionspartner eingegangen sind.

Als Negativkontrolle dienen transfizierte Zellen, welche lediglich mit 1% BSA überlagert wurden. Die Färbung der Negativkontrolle weist eine unspezifische Hintergrundfärbung des Fc-Tag-Antikörpers auf, die in 10,46% ( $\pm 0,55\%$ ) der transfizierten Zellen zu einem positiven Fc-Signal führt. Die Mehrheit der transfizierten Zellen (89,54% ( $\pm 0,55\%$ )) binden jedoch keinen Fc-Tag-Antikörper (Abb. 3.14).

Die statistische Auswertung der Co-Lokalisation von Fgfr1a-IIIb mit Ncam1b ergibt, dass 91,17% ( $\pm 2,77\%$ ) der transfizierten Zellen eine Bindung eingehen. Lediglich in 8,83% ( $\pm 2,77\%$ ) der ausgewerteten Zellen kann keine Co-Lokalisation beobachtet werden. Die Bindungsaffinität von Fgfr1a-IIIb an Ncam1a unterscheidet sich signifikant von der Bindung an Ncam1b ( $p < 0,001$ ). Eine Wechselwirkung zwischen Fgfr1a-IIIb und Ncam1a kann lediglich in 30,22% ( $\pm 7,70\%$ ) der erfassten Zellen beobachtet werden. 69,78% ( $\pm 7,70\%$ ) der ausgewerteten Zellen weisen hingegen keine Co-Lokalisation von Ncam1a und Fgfr1a-IIIb auf.

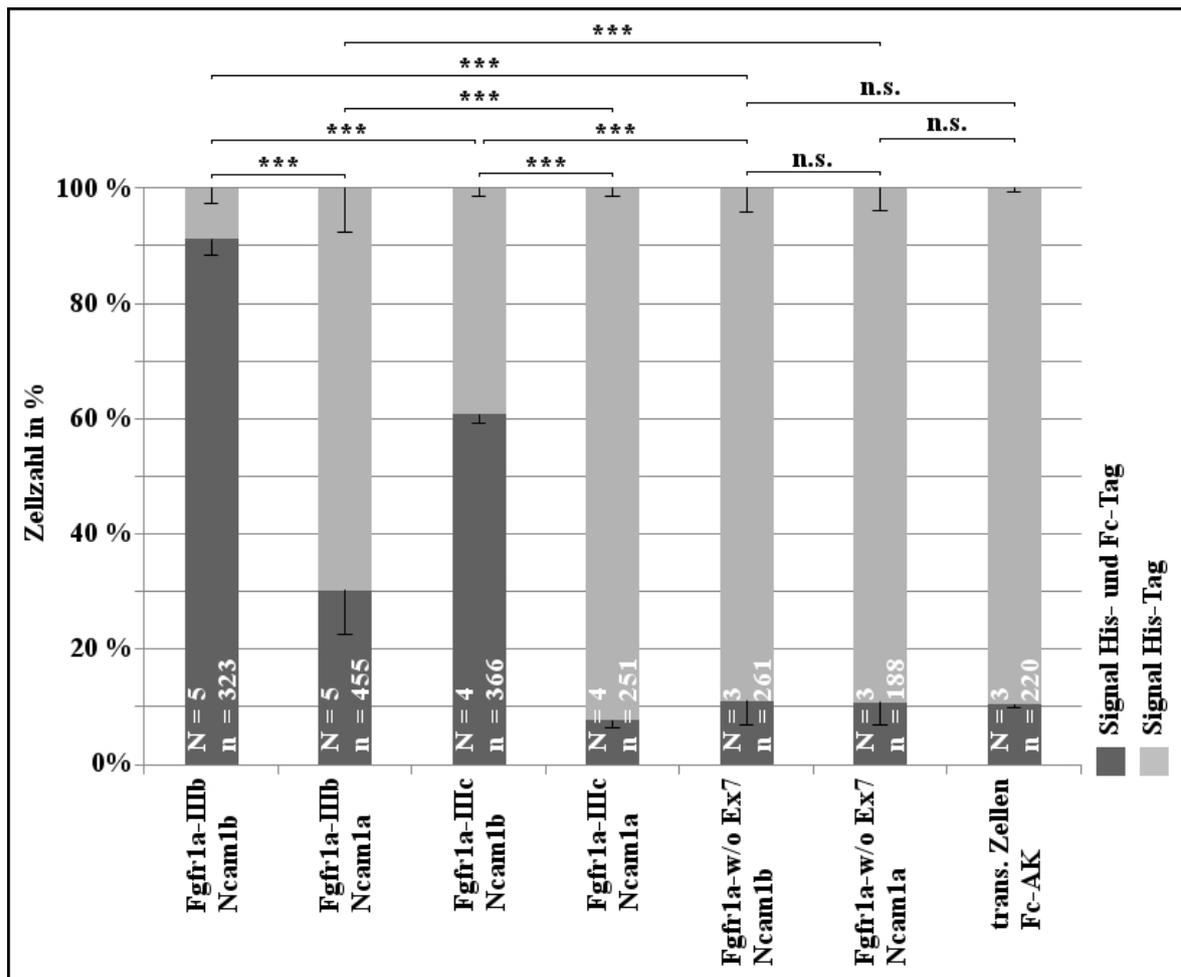


Abbildung 3.14: Die statistische Auswertung der in Zellkultur durchgeführten Overlay-Assays zeigt verschieden starke Bindungsaffinitäten der Fgfr1a-Isoformen zu den Ncam1-Paralogen. Die Zahl der His-Tag-markierten Zellen entspricht 100%. Der prozentuale Anteil an Zellen, die nur durch den His-Tag detektiert werden konnten ist in hellgrau dargestellt. Zellen, die das lösliche Fc-Tag-markierte Protein gebunden haben und somit His-Tag- und Fc-Tag-markiert vorliegen, sind in dunkelgrau gezeigt. Ncam1b kann sowohl Bindungen mit Fgfr1a-IIIb als auch -IIIc eingehen. Ncam1a hingegen zeigt eine schwache Affinität zu Fgfr1a-IIIb und interagiert nicht mit der Isoform IIIc. Die C-terminale Ig-3 Domäne des Fgfr1a ist essentiell für eine Bindung der Ncam1-Paraloge. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach dem  $\chi^2$ -Test zum Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . Abkürzungen: N: Anzahl der Experimente, n: Anzahl der ausgewerteten Zellen.

Die Expression des membrangebundenen Fgfr1a-IIIc führt in 60,75% ( $\pm 1,44\%$ ) der Zellen zu einer Bindung von löslichem Ncam1b, wohingegen in 39,25% ( $\pm 1,44\%$ ) keine Interaktion nachgewiesen werden kann. Werden die transfizierten Zellen hingegen mit Ncam1a inkubiert, so zeigt sich deutlich, dass Fgfr1a-IIIc und Ncam1a keine Affinität zueinander aufweisen. 92,33% ( $\pm 1,35\%$ ) der transfizierten Zellen, zeigen keine Bindung des exogenen Ncam1a-Fc-Proteins. Lediglich in 7,67% ( $\pm 1,35\%$ ) der IIIc-exprimierenden Zellen ist eine Co-Lokalisation zu beobachten. Die Bindungsaffinität zwischen Fgfr1a-IIIc mit Ncam1b bzw. Ncam1a unterscheidet sich signifikant ( $p < 0,001$ ). Der  $\chi^2$ -Test zeigt ebenso einen signifikanten Unterschied in der Bindung von Ncam1a an Fgfr1a-IIIb bzw. -IIIc ( $p < 0,001$ ).

Die Transfektion der *CHO-K1*-Zellen mit der artifiziell klonierten Fgfr1a-Isoform ohne Exon 7 (C-terminaler Bereich der Ig-3 Domäne) zeigt weder eine Interaktion mit Ncam1b (88,91%  $\pm 4,15\%$ ) noch mit Ncam1a (89,20%  $\pm 3,93\%$ ). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse von

Fgfr1a-w/o Exon 7 und der Negativkontrolle deutet darauf hin, dass in diesen Fällen keine Interaktion vorliegt (Ncam1b: 11,19 %  $\pm$  4,15 %; Ncam1a: 10,80 %  $\pm$  3,93 %). Die Bindung von Fgfr1a-w/o Exon 7 mit Ncam1b unterscheidet sich signifikant von der Bindung Fgfr1a-IIIb mit Ncam1b sowie Fgfr1a-IIIc mit Ncam1b ( $p < 0,001$ ). Auch die Interaktion von Fgfr1a-w/o Exon 7 mit Ncam1a unterscheidet sich signifikant von der Interaktion Fgfr1a-IIIb mit Ncam1a ( $p < 0,001$ ).

|        | Fgfr1a-IIIb | Fgfr1a-IIIc | Fgfr1a-w/o Exon 7 |
|--------|-------------|-------------|-------------------|
| Ncam1b | +++         | ++          | -                 |
| Ncam1a | +           | -           | -                 |

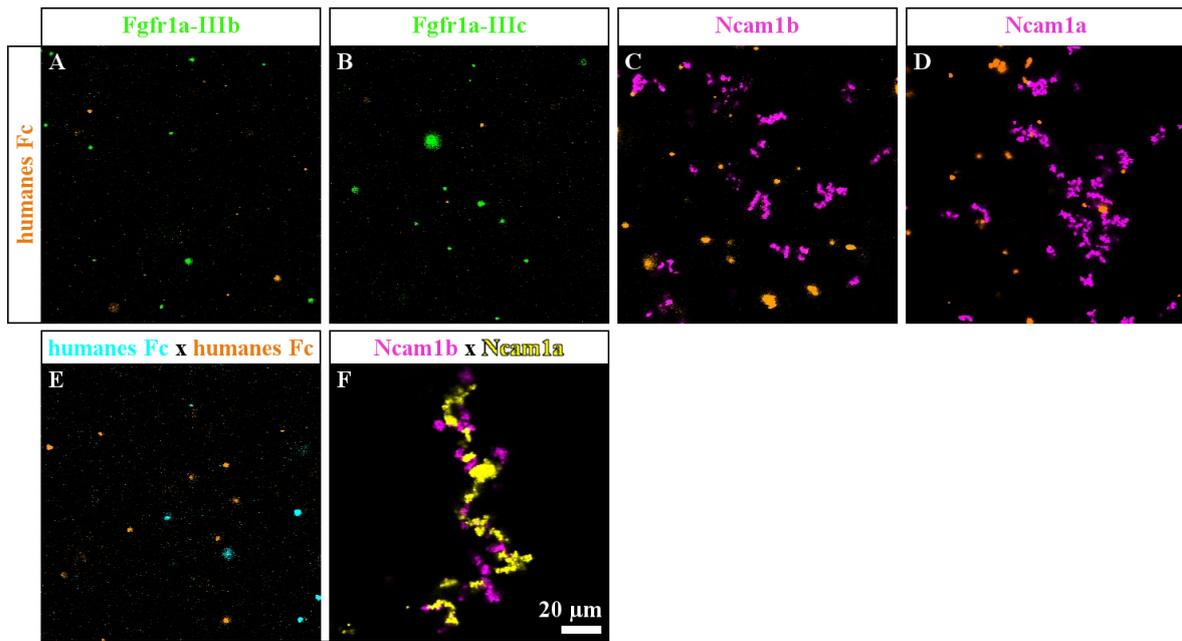
**Abbildung 3.15: Die Ncam1-Paraloge zeigen unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten zu Splice-Varianten von Fgfr1a.**

Die durchgeführten Zellkulturexperimente legen nahe, dass es zur Interaktion zwischen Ncam1b und dem Fgfr1a kommt. Die untersuchten Splice-Varianten des Rezeptors zeigen dabei eine unterschiedlich starke Bindungsaffinität zu den Ncam1-Paralogen. Ncam1b ist in der Lage mit den Fgfr1a-Isoformen IIIb und IIIc in Wechselwirkung zu treten, wohingegen Ncam1a lediglich mit IIIb interagieren kann. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich der dritten Ig-Domäne des Fgfr1a entscheidend für eine Bindung von Ncam1 ist (Abb. 3.15).

### Ncam1b interagiert mit Fgfr1a-IIIb in Bead-Aggregations-Assays

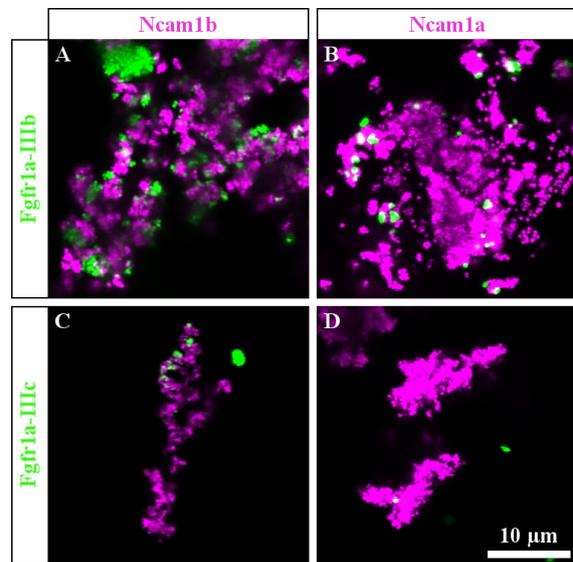
Die vorausgegangenen Zellkulturexperimente unterstützen die Vermutung einer heterophilen Interaktion von Ncam1b mit den Fgfr1a-Isoformen und deuten des Weiteren eine Bindung von Ncam1a mit Fgfr1a-IIIb an. Um diese Wechselwirkungen zu bestätigen, wurden anschließend Bead-Aggregations-Assays durchgeführt. Die löslichen Proteine werden hierfür getrennt an unterschiedlich fluoreszierende ProteinA-beschichtete Beads gebunden. Für den Nachweis einer Interaktion werden die proteingebundenen Beads miteinander inkubiert und die Clusterbildung unter einem Fluoreszenzmikroskop für 24 Stunden dokumentiert.

Die in der vorliegenden Arbeit synthetisierten löslichen Proteine sind alle durch einen Fc-Tag markiert. Um sicherzustellen, dass die beobachtete Clusterbildung auf einer Interaktion der extrazellulären Domänen beruht und nicht auf einer Bindung ihrer Fc-Tags, wurden zuerst Kontrollexperimente durchgeführt. Die proteingekoppelten Beads wurden dabei mit Beads inkubiert, an die nur Fc-Fragmente gebunden waren. Fgfr1a-IIIb und -IIIc sowie Ncam1b und Ncam1a zeigen keine Wechselwirkungen mit humanem Fc (Abb. 3.16, A-D). Die Negativkontrolle, in der Beads lediglich mit humanem Fc beschichtet wurden, zeigt ebenfalls keine Clusterbildung (Abb. 3.16, E). Die Ncam1-Paraloge können sowohl homophile, als auch heterophile Interaktionen eingehen (Schober 2016). Die Inkubation von Ncam1a- mit Ncam1b-gebundenen Beads wurde als Positivkontrolle eingesetzt und zeigt eine heterophile Clusterbildung der beiden Ncam1-Paraloge (Abb. 3.16, F). In Abbildung 3.16 C, D und F sind ebenso homophile Interaktionen der Ncam1-Proteine zu sehen. Die Fgfr1a-Isoformen zeigen eine schwache Tendenz zur homophilen Interaktion, neigen jedoch wenn überhaupt nur zur Bildung kleiner homophiler Aggregate (Abb. 3.16 A, B).



**Abbildung 3.16: Keine Interaktion der Fgfr1a-Isoformen IIIb und IIIc sowie Ncam1b und Ncam1a mit humanem Fc.** A-B) Beads, welche mit Fgfr1a-IIIb oder -IIIc beschichtet sind, interagieren nicht mit humanem Fc. C-D) Die Ncam1-Paraloge zeigen keine Interaktion mit humanem Fc. Ncam1a und Ncam1b sind in der Lage durch homophile Wechselwirkungen Großaggregate auszubilden, die nur sporadisch einzelne Fc-Beads einschließen. E) Humanes Fc bildet keine homophilen Cluster. F) Ncam1b und Ncam1a können heterophil miteinander interagieren. Vergrößerung: 63xÖl, 0.7x Zoom.

Der Bead-Aggregations-Assay bestätigt die in den Overlay-Assays beobachtete Wechselwirkung zwischen Fgfr1a-IIIb und Ncam1b (Abb. 3.17, A). Es scheint, als würde die Isoform Fgfr1a-IIIb innerhalb des Ncam1b-Großclusters kleine homophile Aggregate bilden, die mit Ncam1b in Wechselwirkung treten. Das Ncam1-Paralog Ncam1a ist ebenfalls in der Lage, Bindungen mit dieser Isoform einzugehen (Abb. 3.17, B). Wie in den bereits gezeigten Zellkulturexperimenten, ist diese Interaktion jedoch schwächer als die Wechselwirkung zwischen Ncam1b und Fgfr1a-IIIb (Abb. 3.14). Eine schwache Bindungsaffinität kann auch zwischen Ncam1b und Fgfr1a-IIIc beobachtet werden, was die Ergebnisse der Overlay-Assays bestätigt (Abb. 3.17, C). Bei der Inkubation von Ncam1a und Fgfr1a-IIIc erfolgt hingegen keine Clusterbildung (Abb. 3.17, D).



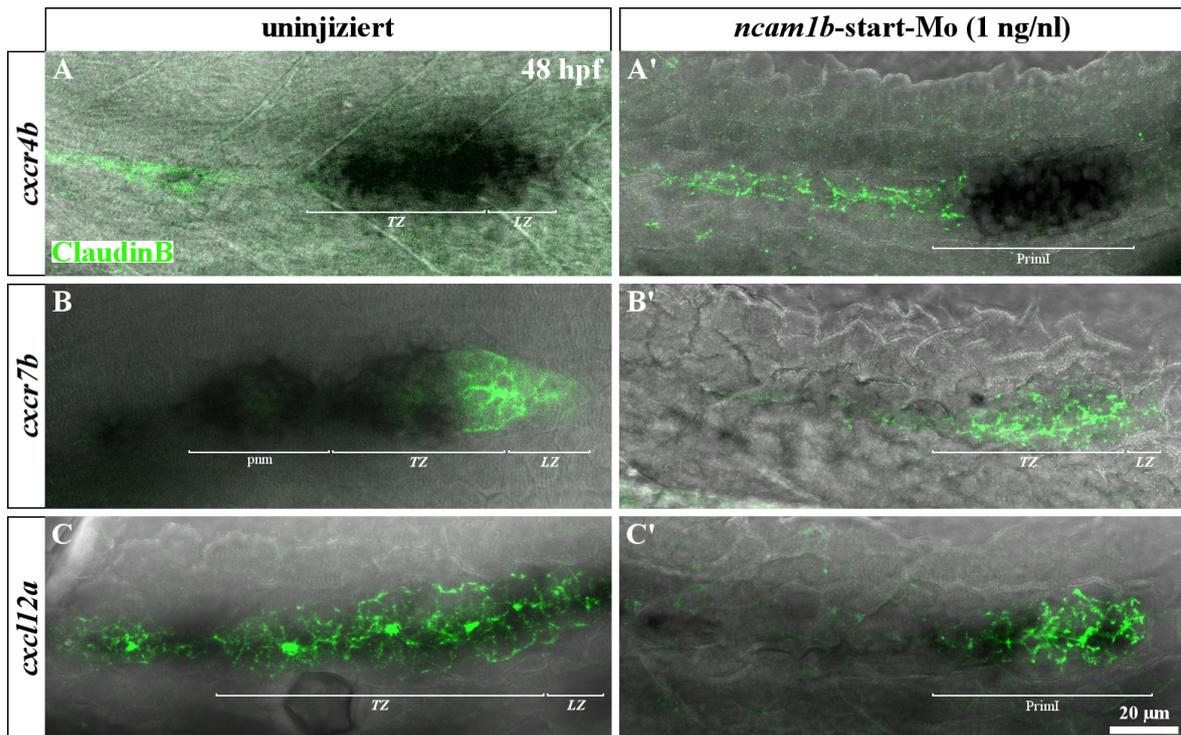
**Abbildung 3.17: Ncam1b interagiert heterophil mit Fgfr1a-IIIb und -IIIc in Bead-Aggregations-Assays. Ncam1a tritt nur mit Fgfr1a-IIIb in Wechselwirkung.** A) Ncam1b-gebundene Beads bilden homophile und heterophile Bindungen mit Fgfr1a-IIIb-gebundenen Beads aus. B) Ncam1a aggregiert in homophilen Clustern und geht vereinzelt Interaktionen mit Fgfr1a-IIIb ein. C) Ncam1b kann mit Fgfr1a-IIIc wechselwirken. D) Ncam1a geht keine heterophilen Bindungen mit Fgfr1a-IIIc ein. Vergrößerung: 63xÖl, 1.5x Zoom.

### 3.1.5 Ncam1b nimmt Einfluss auf die Migration des Primordiums

*Engrailed*-positive Muskelzellen entlang des horizontalen Myoseptums exprimieren homogen den Liganden Cxcl12a. Das Primordium, welches entlang dieses Expressionsstreifens wandert, exprimiert die Rezeptoren Cxcr4b und Cxcr7b. Die Bindung des Liganden durch Cxcr4b führt dabei zur Aktivierung einer G-Protein-gekoppelten Signalkaskade, wohingegen die Bindung an den Cxcr7b, der lediglich in der *Trailing-Zone* exprimiert wird, nur zu einem signallosen Abbau des Liganden führt. Auf diese Weise bildet sich innerhalb des Primordiums ein Liganden-Gradient, mit einer erhöhten Konzentration im Bereich der caudalen *Leading-Zone*. Dies führt zu einer Polarisation des Primordiums, das infolgedessen in Richtung der erhöhten Konzentration des Cxcl12a migriert (David et al. 2002, Haas und Gilmour 2006, Boldajipour et al. 2008, Donà et al. 2013). Die kollektive Migration des Primordiums wird durch die Signalwege Wnt und Fgfr1a bestimmt, die Einfluss auf die Expression der Rezeptoren Cxcr4b und Cxcr7b nehmen (Aman und Piotrowski 2008, Breau et al. 2012, Breau et al. 2013). Eine Inhibierung des Fgfr1a führt zu einer fehlenden Expression des Rezeptors Cxcr7b, wodurch die Migrationsgeschwindigkeit bis zum vollständigen Stillstand herabgesetzt wird. Ein vergleichbarer Phänotyp ist in *ncam1b*-Morphanten zu beobachten (Heiny 2012, Dries 2014). Nachdem die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Interaktion von Ncam1b mit Fgfr1a gezeigt haben, stellt sich nun die Frage, ob diese Wechselwirkung eine Rolle in der Expression des Cxcr7b spielt und das veränderte Migrationsverhalten in *ncam1b*-Morphanten damit begründet werden kann.

Die Verteilung der Chemokin-Rezeptoren Cxcr4b und Cxcr7b sowie des Liganden Cxcl12a wurde in uninjizierten Embryonen und *ncam1b*-Morphanten zum Zeitpunkt 48 hpf durch *in situ* Hybridisierungen nachgewiesen. Die Kontrollgruppe der uninjizierten Embryonen zeigt in 191 von 222 Hybridisierungen eine gleichmäßige Lokalisation von *cxcr4b* im Primordium (Abb. 3.18, A). Lediglich am rostralen Ende kann keine mRNA detektiert werden. *ncam1b*-Morphanten zeigen eine vergleichbare Verteilung von *cxcr4b*, die im verkleinerten Primordium zu sehen ist, mit Ausnahme eines kleinen rostralen Bereichs (Abb. 3.18, A').

Der Rezeptor Cxcr7b wird nur in der *Trailing-Zone* exprimiert, wo es zum signallosen Abbau des Liganden Cxcl12a kommt, wodurch ein Gradient an verfügbarem Cxcl12a im Bereich des Primordiums entsteht. Die Lokalisation der mRNA von *cxcr7b* wird in uninjizierten Embryonen auch auf diesen Bereich beschränkt und kann folglich nur in der *Trailing-Zone* und den abgesetzten Protoneuromasten detektiert werden (Abb. 3.18, B). Die Bindungseffizienz der Sonde ist dabei sehr hoch, sodass eine Expression von *cxcr7b* in 131 von 131 hybridisierten Embryonen zu sehen ist. Die Injektion von *ncam1b*-Morpholino führt zu einer stark reduzierten Transkription von *cxcr7b* (Abb. 3.18, B'). In 54 von 79 injizierten und hybridisierten Embryonen kann nur noch ein stark reduziertes Sondersignal detektiert werden. Der Chemokinligand Cxcl12a wird von Muskelzellen des horizontalen Myoseptums homogen sezerniert. Die Generierung eines Gradienten findet nur auf der Proteinebene und nur innerhalb des Primordiums durch die Rezeptoren Cxcr4b und Cxcr7b statt. In Bereichen, welche das primäre Primordium bereits passiert hat, wird für die gesamte Dauer der Embryonalentwicklung des pSLO erneut Cxcl12a sezerniert, so dass das sekundäre Primordium ebenfalls entlang des horizontalen Myoseptums migrieren kann. Aufgrund dieses Mechanismus wird in 94 von 94 untersuchten uninjizierten Embryonen eine homogene Detektion von Cxcl12a



**Abbildung 3.18: Ein *Knockdown* von *ncam1b* führt zu einer reduzierten Expression von *Cxcr7b* bei 48 hpf. A-C')** Konfokale Lateralansicht des primären posterioren Seitenlinienprimordiums der *Tg(ClaudinB::lynGFP)*-Linie nach *in situ* Hybridisierung. (Vergrößerung: 40x). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A-A')** *ncam1b*-Morphanten zeigen keine Veränderung der *cxcr4b*-Transkription und -Lokalisation. **B-B')** Der *Knockdown* von *ncam1b* führt zu einer reduzierten Transkription von *cxcr7b*. **C-C')** *cxcl12a* wird nicht durch *Ncam1b* beeinflusst. Anzahl ausgewerteter Embryonen (n) und Experimente (N): **A**: n = 191/222, N = 3; **B**: n = 131/131, N = 3; **C**: n = 94/94, N = 3; **A'**: n = 60/71, N = 3; **B'**: n = 54/79, N = 3; **C'**: n = 98/98, N = 3. **Abkürzungen:** **LZ**: *Leading-Zone*, **TZ**: *Trailing-Zone*, **pnm**: Protoneuromast, **PrimI**: primäres Primordium (Zonen-Einteilung nicht möglich)

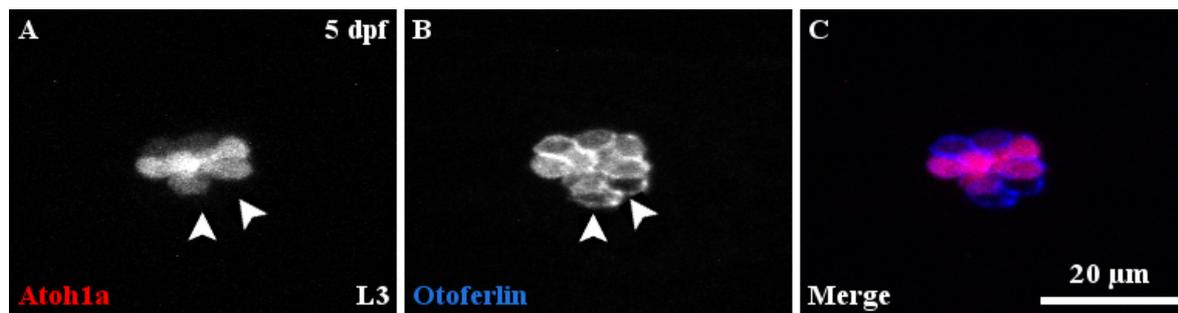
entlang des horizontalen Myoseptums beobachtet (Abb. 3.18, C). *ncam1b*-Morphanten zeigen keine veränderte Transkription oder Lokalisation von *cxcl12a*-mRNA (Abb. 3.18, C'). In 98 von 98 injizierten und hybridisierten Embryonen wurde eine homogene Verteilung von *cxcl12a* entlang des horizontalen Myoseptums beobachtet.

Diese Untersuchungen geben Aufschluss darüber, wie *Ncam1b* die Entwicklung des primären posterioren Seitenlinienorgans maßgeblich beeinflusst. Im Bereich der *Trailing-Zone*, in welcher sowohl *Ncam1b* und *Fgfr1a* exprimiert werden, ist eine Interaktion dieser Proteine möglich, wodurch die Aktivierung der *Fgfr1a*-Signaltransduktion und die Expression des Zielproteins *Erm* reguliert wird. Weiterhin beeinflusst *Ncam1b* (vermutlich in Interaktion mit *Fgfr1a*) die Zellteilungsrate der primordialen Zellen und die Expression des Chemokin-Rezeptors *Cxcr7b*. Zellkulturexperimente zeigen, dass die im Zebrafisch vorkommenden Splice-Varianten *Fgfr1a*-IIIb und -IIIc mit *Ncam1b* interagieren, jedoch kann nur *Fgfr1a*-IIIb eine Bindung mit *Ncam1a* eingehen. Dieses Ergebnis sowie das nur teilweise überlappende Expressionsmuster von *Ncam1a* und *Fgfr1a* könnten erklären, weshalb ein *Knockdown* von *ncam1a* keine Auswirkungen auf die Zellproliferation oder die *Fgfr1a*-Signaltransduktion aufzeigt.

## 3.2 Die Funktion von Ncam1 im differenzierten pSLO

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Rolle der Ncam1-Paraloge während der Entwicklung des pSLO zeigen, dass insbesondere Ncam1b einen maßgeblichen Einfluss auf die Funktion des Primordiums ausübt. Die Bildung der Protoneuromasten und ihre periodische Absetzung entlang des horizontalen Myoseptums sind entscheidend für die Funktionalität des differenzierten pSLO. Die Neuromasten, die sich aus den Protoneuromasten differenzieren, bilden die motosensorischen Sinnesorgane von Fischen und Amphibien, und ermöglichen diesen die Wahrnehmung von Umgebungsreizen. Die Reizaufnahme erfolgt dabei durch die human-homologen Haarsinneszellen im Zentrum eines Neuromasten, die durch bipolare Neuronen innerviert werden. Im Zentrum des abgesetzten, jedoch noch nicht differenzierten Protoneuromasten werden die Ncam1-Paraloge zu gleichen Teilen exprimiert (Dries 2014). Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass die Ncam1-Paraloge Einfluss auf die Entwicklung nehmen, stellt sich die Frage, ob sie auch nach der Entwicklung und Differenzierung der motosensorischen Organe eine Rolle in der Funktion des reiferen pSLO spielen.

### 3.2.1 Otoferlin wird in frühen Vorläuferstadien von Haarsinneszellen exprimiert



**Abbildung 3.19: Expressionsmuster von Atoh1a und Otoferlin in Haarsinneszellen nach 5 dpf.** A-C) Konfokale Lateralansicht des dritten primären abgesetzten Neuromasten (L3) in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(Atoh1a::tdTomato)* (Vergrößerung: 40x). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A)** Atoh1a wird unterschiedlich stark, je nach Differenzierungsgrad, in Haarsinneszellen exprimiert. **B)** Otoferlin kann in allen Atoh1a-positiven Zellen detektiert werden, jedoch ist das Expressionslevel nicht vom Differenzierungsgrad abhängig. Zusätzlich können sehr frühe Vorläuferstadien durch die Expression von Otoferlin beobachtet werden, welche noch keine Expression von Atoh1a aufzeigen (Pfeilkopf). **C)** Überlagerung der Einzelkanäle.

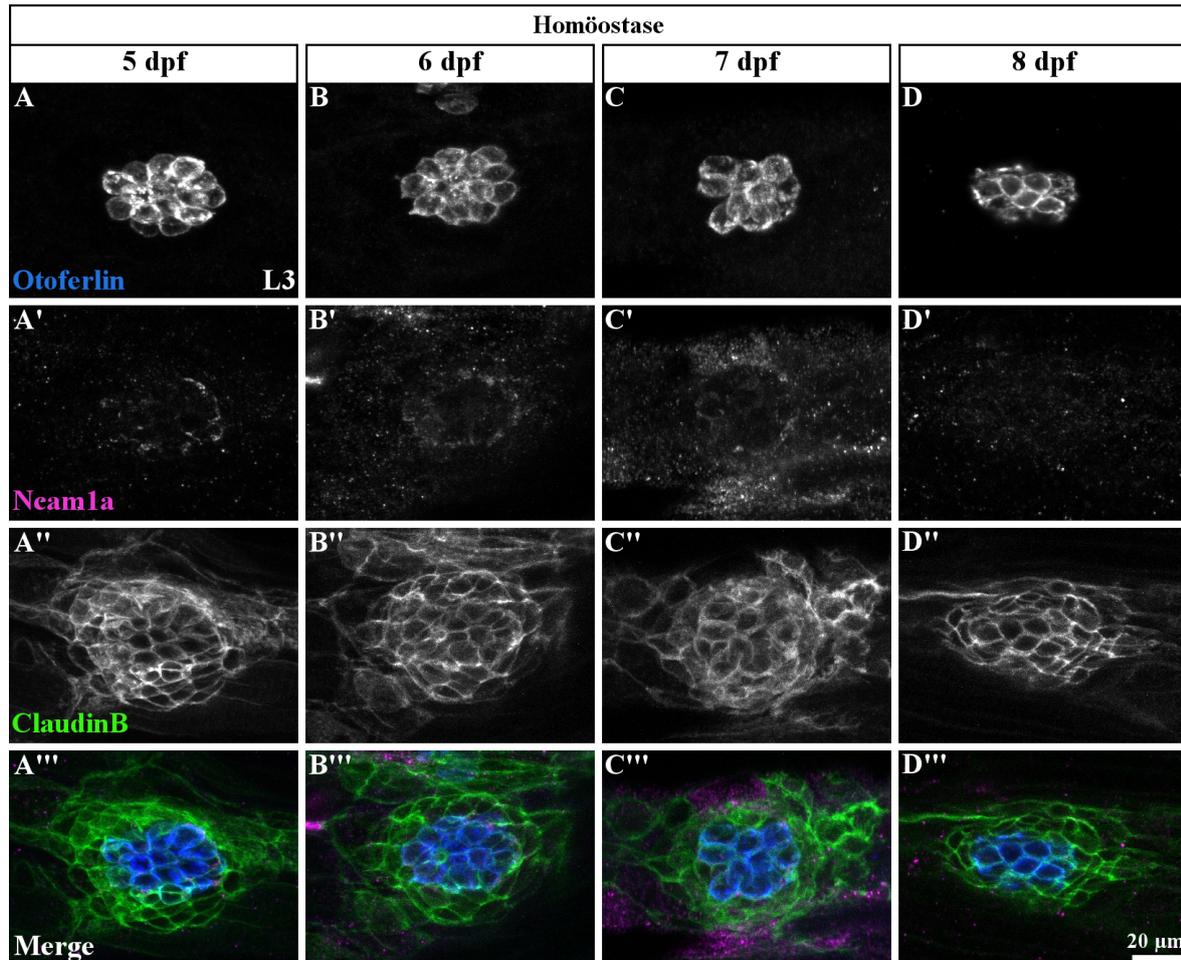
Die durch das migrierende Primordium abgesetzten Protoneuromasten beginnen nach wenigen Stunden mit der Differenzierung der einzelnen Zelltypen eines reifen Neuromasten: den innen liegenden Haarsinneszellen, den umliegenden Stützzellen und einer abschließenden Einzelsicht von Mantelzellen. Zur Untersuchung der Expression und Funktion der Ncam1-Paraloge ist es notwendig, zwischen den einzelnen Zelltypen der Neuromasten unterscheiden zu können. López-Schier und Hudspeth (2006) zeigen, dass in der Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)*, die in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, nur Stütz- und Mantelzellen transgen markiert sind, jedoch nicht Haarsinneszellen. Für die Lokalisation der Haarsinneszellen wurde in der vorliegenden Arbeit ein Antikörper gegen das Transmembranprotein Otoferlin genutzt. Entscheidend für eine Zelle ob sie zur Haarsinneszelle differenziert, ist die Expression des Transkriptionsfaktors Atoh1a. Um sicherzustellen, dass der eingesetzte Antikörper gegen Otoferlin

sowohl Vorläufer- als auch differenzierte Haarsinneszellen detektiert, wurde die Expression von Otoferlin mit der von Atoh1a in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(Atoh1a::tdTomato)* zum Zeitpunkt 5 dpf verglichen (Abb. 3.19). Atoh1a wird als Schlüsselprotein bereits in unipotenten Haarsinneszell-Vorläufern exprimiert (Wibowo et al. 2011). Abbildung 3.19, A zeigt, dass Atoh1a unterschiedlich stark in den detektierten Zellen exprimiert wird, was auf einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad dieser Zellen schließen lässt. Die immunhistochemische Färbung der Haarsinneszellen gegen Otoferlin zeigt, dass alle Atoh1a-positiven Zellen ebenfalls Otoferlin exprimieren und kein unspezifisches Hintergrundsignal durch den Antikörper detektiert wird (Abb. 3.19, B und C). Es ist jedoch kein Expressionsunterschied zwischen den einzelnen Zellen sichtbar, sodass keine Aussage über deren Differenzierungsgrad getroffen werden kann. Die Färbung mit dem Otoferlin-Antikörper zeigt stets 1-2 Zellen, die bereits Otoferlin exprimieren, jedoch keine Expression von Atoh1a aufweisen (Abb. 3.19, Pfeilkopf). Dies lässt darauf schließen, dass Otoferlin bereits in sehr frühen Vorläuferstadien exprimiert wird, die noch kein oder nur wenig Atoh1a bilden, dessen Konzentration unter der Nachweisgrenze liegt.

### 3.2.2 Die Expression der Ncam1-Paraloge in reifen Neuromasten

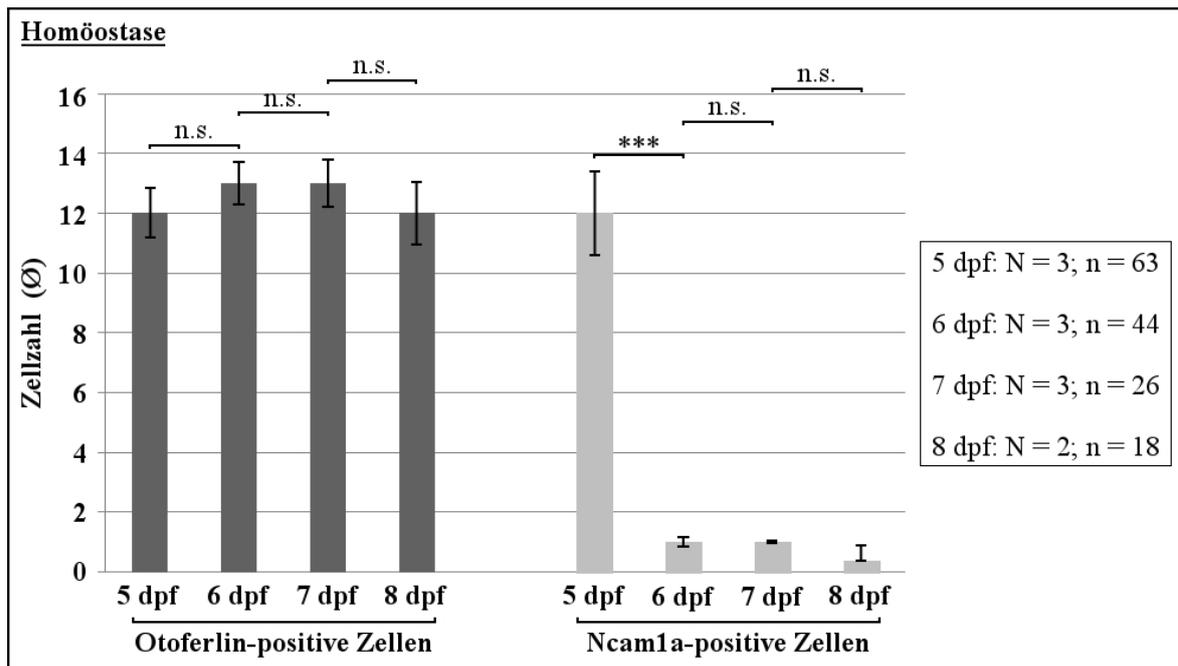
#### **Ncam1a wird weder in Vorläuferstadien noch in differenzierten Haarsinneszellen exprimiert**

Die durch das Primordium abgesetzten Protoneuromasten bestehen zunächst aus durchschnittlich 25 undifferenzierten Zellen (Gompel et al. 2001). Diese beginnen unmittelbar nach der Absetzung mit der Differenzierung zu den zentrumsorientierten Haarsinnes-, den umliegenden Stütz- und den außenliegenden Mantelzellen. Die früheste Detektion einer reifen Haarsinneszelle erfolgt 6 Stunden nach der Absetzung. Zum Entwicklungszeitpunkt 5 dpf kann in den abgesetzten Neuromasten des primären Primordiums (*hier*: der dritte abgesetzte Neuromast (L3)) bereits eine hohe Anzahl an unterschiedlich stark differenzierten Haarsinneszellen beobachtet werden (Abb. 3.20). Bis zur vollständigen Reifung eines Neuromasten vergehen durchschnittlich drei Wochen, sodass während einer normalen Entwicklung die Anzahl an Haarsinneszellen nur langsam ansteigt. Diese Zeit, in der eine normale Entwicklung und Differenzierung gewährleistet ist, wird im folgenden als Homöostase bezeichnet. Der immunhistochemische Nachweis der Expression des Transmembranproteins Otoferlin über einen Zeitraum von 4 Entwicklungstagen (5 dpf-8 dpf) zeigt, dass die Zahl an Haarsinneszellen in dieser Zeit weitestgehend konstant bleibt (Abb. 3.20 A-D). In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Ncam1a unmittelbar nach Absetzung des Protoneuromasten in den zentralen Zellen, von welchen eine als Haarsinneszelle bestimmt werden konnte, exprimiert wird (Dries 2014). Im differenzierten Zustand des abgesetzten Neuromasten ist am Entwicklungstag 5 dpf nur noch eine schwache Expression von Ncam1a detektierbar, welche ausschließlich auf die Haarsinneszellen beschränkt ist (Abb. 3.20, A' und A''). Im Verlauf der weiteren Entwicklung nimmt die Expression rapide ab und ist zum Zeitpunkt 8 dpf nicht mehr nachweisbar (Abb. 3.20, B'-D'). Zum Zeitpunkt 6 dpf können nur noch wenige Zellen mit einer normalen Ncam1a-Verteilung aufgezeigt werden. Es entsteht der Eindruck, dass die äußersten Haar-



**Abbildung 3.20: Schwache Expression von Ncam1a in den Haarsinneszellen ab 5 dpf.** **A-D''')** Konfokale Lateralansicht des dritten primären Neuromasten (L3) in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)* in verschiedenen Entwicklungsstadien (5-8 dpf) (Vergrößerung: 63x ÖI). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A-D)** Immunhistochemischer Nachweis von Otoferlin, welches in unreifen und differenzierten Haarsinneszellen exprimiert wird. **A'-D')** Die Antikörperfärbung von Ncam1a, zeigt eine schwache Expression in Haarsinneszellen zum Zeitpunkt 5 dpf. **A''-D'')** Expression des transgen-markierten ClaudinB in Stütz- und Mantelzellen. **A'''-D''')** Überlagerung der jeweiligen Einzelkanäle.

sinneszellen eine partielle Ncam1a-Expression aufzeigen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um einen Färbe-Artefakt des Antikörpernachweises handelt (Abb. 3.20, B'). Bereits 7 dpf ist Ncam1a nur noch in vereinzelt Zellen sehr schwach zu detektieren (Abb. 3.20, C' und D'). Dies spiegelt sich auch in der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Ncam1a wider (Abb. 3.21). Zwischen den Entwicklungstagen 5 dpf und 8 dpf können in unbehandelten Embryonen durchschnittlich zwischen 12 und 13 Haarsinneszellen durch die Expression von Otoferlin erfasst werden. Die Zahl der Haarsinneszellen kann trotz standardisierter Haltungsbedingungen Schwankungen unterliegen. Die Zahl von Haarsinneszellen beträgt 5 dpf 11,93 ( $\pm 0,83$ ), 6 dpf 12,95 ( $\pm 0,72$ ), 7 dpf 12,66 ( $\pm 0,77$ ) und 8 dpf 12,42 ( $\pm 1,06$ ). Die durchschnittliche Zellzahl ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entwicklungstagen und beträgt nach der zweiseitigen Studentischen *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  zu den Zeitpunkten 5-6 dpf:  $p = 0,18$ , 6-7 dpf:  $p = 0,66$  und 7-8 dpf:  $p = 0,78$ .

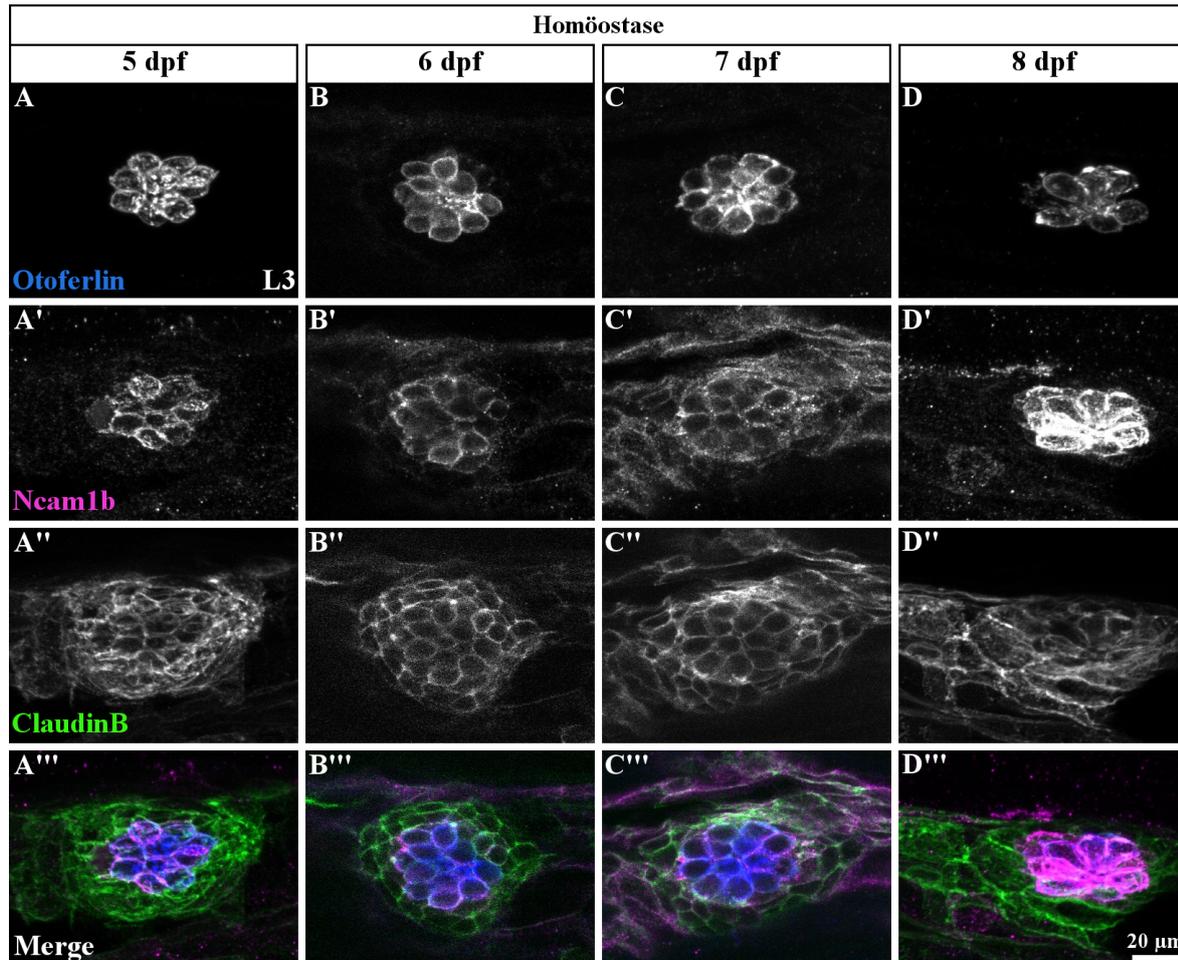


**Abbildung 3.21: Quantifizierung von Ncam1a-exprimierenden Zellen während der Entwicklung von Haarsinneszellen.** Die statistische Auswertung zeigt gerundete Mittelwerte der Zahl von Haarsinnes- und Ncam1a-positiven Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Auswertung erfolgte am dritten primären abgesetzten Neuromasten L3, durch eine immunhistochemische Färbung von Otofelin und Ncam1a in *Tg(ClaudinB::lynGFP)*-Embryonen im Zeitraum 5 dpf bis 8 dpf. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach der Studentischen *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . *Abkürzungen:* N: Anzahl der Experimente, n: Anzahl der Embryonen

Die statistische Auswertung von Ncam1a-exprimierenden Zellen bestätigt die Beobachtung, dass mit Beginn des 6. Entwicklungstages die Expression von Ncam1a rapide herabgesetzt wird. Zum Zeitpunkt 5 dpf können noch durchschnittlich  $11,57 (\pm 1,39)$  Zellen gezählt werden, die Ncam1a exprimieren. Es wurden nur solche Zellen statistisch gewertet, die eine Expression von Ncam1a im gesamten Zellumriss zeigen. Die Auswertung bestätigt, was schon in Abbildung 3.20, A-A'' zu sehen ist. Nur Haarsinneszellen und keine Stützzellen exprimieren Ncam1a. Zum Zeitpunkt 6 dpf nimmt die Expression von Ncam1a in den Haarsinneszellen deutlich ab und kann durchschnittlich nur noch in  $0,69 (\pm 0,17)$  Zellen detektiert werden. Diese Beobachtung verhält sich signifikant zum Zeitpunkt 5 dpf ( $p = 0,001$ ). Im weiteren Verlauf nimmt die Zahl Ncam1a-exprimierender Zellen weiter ab und unterscheidet sich nicht signifikant zum jeweiligen Vortag 6-7 dpf:  $p = 0,28$ ; 7-8 dpf:  $p = 0,29$ . Zum Zeitpunkt 7 dpf werden  $0,56 (\pm 0,52)$  und an Tag 8  $0,375 (\pm 0,53)$  Zellen gezählt.

### Ncam1b wird in differenzierten Haarsinnes- und Stützzellen exprimiert

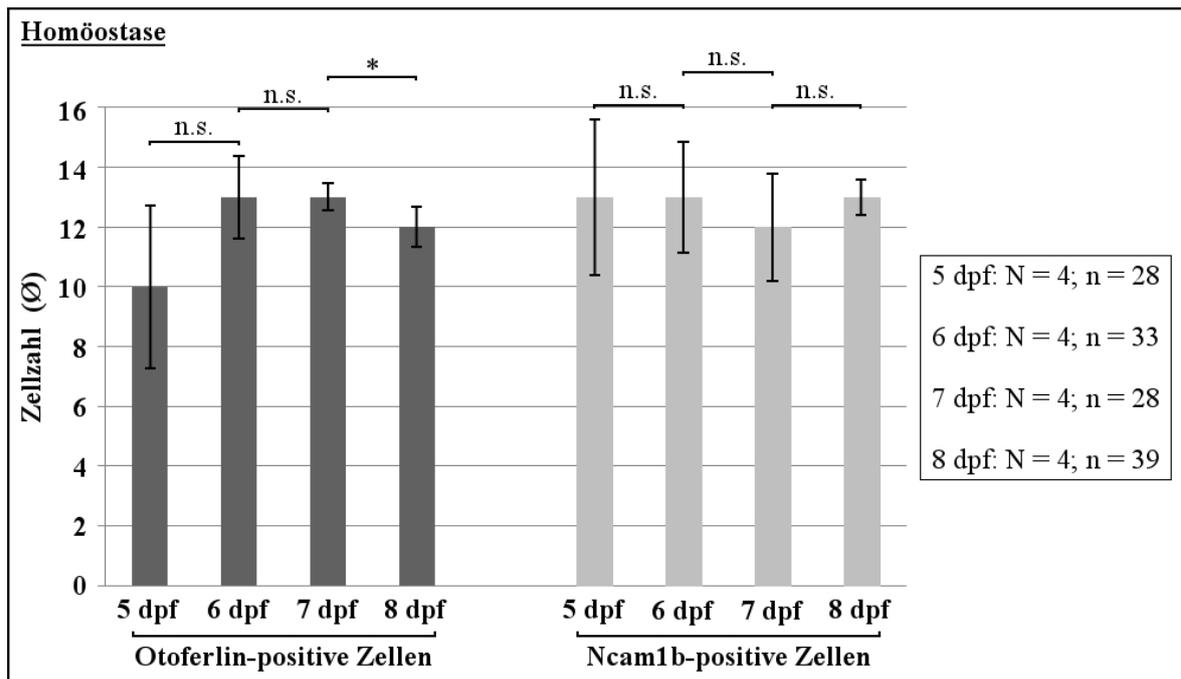
Für das Ncam1-Paralog Ncam1b konnte im Verlauf der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass dieses Protein einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des pSLO nimmt. Ncam1b wird, wie Ncam1a, in unmittelbar abgesetzten undifferenzierten Protoneuromasten in zentralen Zellen exprimiert (Dries 2014). Im Gegensatz zu Ncam1a wird Ncam1b jedoch kontinuierlich auch noch zwischen 5-8 dpf exprimiert (Abb. 3.22, A'-D'). Es ist deutlich zu sehen, dass Ncam1b in den Haarsinneszellen exprimiert wird und dass diese Expression zwischen 5 und 7 dpf gleich stark vorliegt (Abb. 3.22, A'-C'). Zum Zeitpunkt 8 dpf scheint die



**Abbildung 3.22: Expression von Ncam1b in unreifen und differenzierten Haarsinneszellen zwischen 5 und 8 dpf.** A-D''') Konfokale Lateralansicht des dritten primären abgesetzten Neuroblasten (L3) in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)* in verschiedenen Entwicklungsstadien (Vergrößerung: 63x Öl). Rostral befindet sich links, caudal rechts. A-D) Immunhistochemische Färbung von Otofelin, welches in unreifen und differenzierten Haarsinneszellen exprimiert wird. A'-D') Die Antikörperfärbung von Ncam1b, zeigt eine Expression in unterschiedlichen Stadien von Haarsinnes- und Stützzellen. A''-D'') Expression des transgen-markierten ClaudinB in Stütz- und Mantelzellen. A'''-D''') Überlagerung der jeweiligen Einzelkanäle.

Expression von Ncam1b in den Haarsinneszellen zuzunehmen (Abb. 3.22, D'). Dies könnte in Zusammenhang mit der Wanderung der Neuroblasten zur Ventralseite des Embryos oder mit der erneuten Innervierung der sensorischen Zellen durch den Seitenliniennerv stehen.

Die Quantifizierung der Otofelin-exprimierenden Zellen ergibt eine ähnliche durchschnittliche Anzahl an Haarsinneszellen zwischen den Entwicklungstagen 5 dpf bis 8 dpf wie in den Expressionsstudien zu Ncam1a (Abb. 3.23). Durchschnittlich können im untersuchten Zeitraum 12 Haarsinneszellen detektiert werden, jedoch unterliegt insbesondere Tag 5 einer hohen Standardabweichung trotz standardisierter Haltungsbedingungen, was auf die individuelle Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen zurückgeführt werden kann. Auf die einzelnen Entwicklungstagen bezogen, können 5 dpf 9,7 ( $\pm 2,73$ ), 6 dpf 12,79 ( $\pm 1,38$ ), 7 dpf 13,2 ( $\pm 0,45$ ) und 8 dpf 11,9 ( $\pm 0,68$ ) Haarsinneszellen gezählt werden. Die Zahl der Haarsinneszellen im Zeitraum 5-6 dpf ( $p = 0,09$ ) und 6-7 dpf ( $p = 0,59$ ) ändert sich nicht signifikant. Lediglich Tag 8 zeigt eine signifikante Abweichung der Zahl detektierter Haarsinneszellen ( $p = 0,02$ ).



**Abbildung 3.23: Quantifizierung von Ncam1b-exprimierenden Zellen während der Entwicklung von Haarsinneszellen.** Die statistische Auswertung zeigt gerundete Mittelwerte der Anzahl an Haarsinnes- und Ncam1b-exprimierenden Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Auswertung erfolgte am dritten primären abgesetzten Neuromasten L3, durch eine immunhistochemische Färbung von Otoferlin und Ncam1b an *Tg(ClaudinB::lynGFP)*-Embryonen im Zeitraum 5 dpf bis 8 dpf. Die Studentische *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  ergab einen signifikanten Unterschied der Otoferlin-positiven Zellen zwischen 7 dpf und 8 dpf ( $p = 0,02$ ).

Abkürzungen: N: Anzahl der Experimente, n: Anzahl der Embryonen

Die statistische Auswertung der Ncam1b-exprimierenden Zellen zeigt deutlich, dass dieses Ncam1-Paralog eine wichtige Rolle in differenzierten Neuromasten ausübt. Durchschnittlich können 13 Zellen beobachtet werden, welche Ncam1b exprimieren. Auf die jeweiligen Entwicklungstage bezogen können 5 dpf 12,80 ( $\pm 2,61$ ), 6 dpf 12,53 ( $\pm 1,85$ ), 7 dpf 11,96 ( $\pm 1,79$ ) und 8 dpf 13,36 ( $\pm 0,59$ ) Ncam1b-exprimierende Zellen detektiert werden. Der zweiseitige Studentische *t*-Test mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  ergibt keine signifikanten Unterschiede. Die Überlagerung der Einzelkanäle in Abbildung 3.22, A'''-D''' zeigt bereits, dass alle Haarsinneszellen Ncam1b exprimieren. Die Quantifizierung unterstützt diese Vermutung und deutet darauf hin, dass zusätzlich noch 1-2 Stützzellen Ncam1b exprimieren.

### 3.2.3 Regenerierende Haarsinneszellen exprimieren Ncam1b

Haarsinneszellen sind in ihrer Struktur und Funktion im Tierreich hoch konserviert. Dennoch sind nur Fische und Vögel in der Lage, durch Mitose aus den umliegenden Stütz- neue Haarsinneszellen zu bilden. Die Tochterzellen können sich dabei zu Haarsinnes- oder auch Stützzellen entwickeln, wodurch ein lebenslanges Stammzell-Reservoir erhalten bleibt (Stone und Cotanche 2007). Die Einleitung des Regenerationsprozesses unterliegt einer kontrollierten Abfolge von Signalkaskaden, wodurch die Proliferation der im Ruhezustand befindlichen Stützzellen induziert und ihre Differenzierung in eine sensorische Haarsinneszelle durch Expression neuronaler Proteine bewirkt wird (Itoh und Chitnis 2001, Jiang et al. 2014).

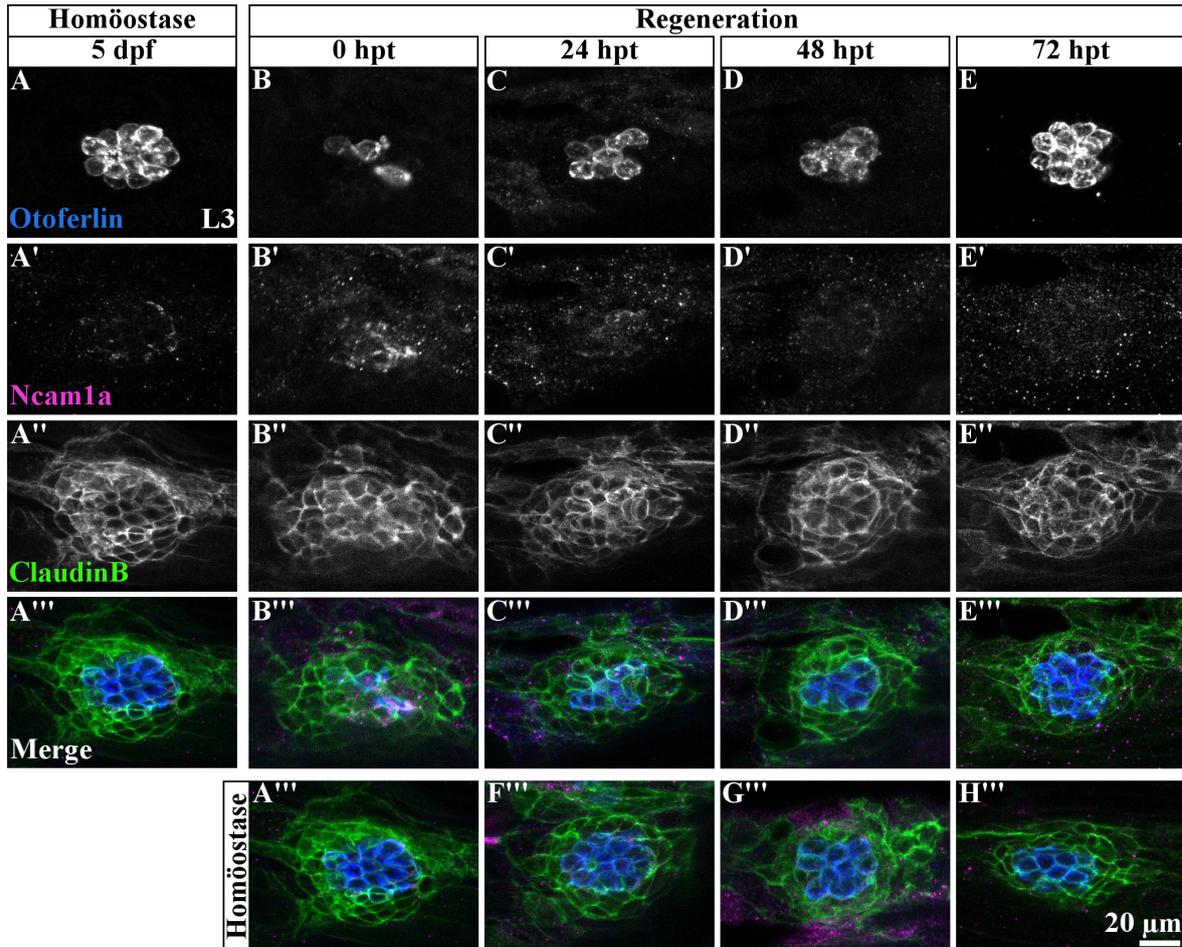
Die sensorischen Haarsinneszellen reagieren bereits in frühen Entwicklungsstadien äußerst sensitiv auf geringe Mengen von Schwermetallen wie Kupfer und im differenzierten Zustand auf Aminoglykoside wie Neomycin (Harris et al. 2003, Hernández et al. 2007). Zur Untersuchung der Regeneration von Haarsinneszellen wurden die Embryonen in der vorliegenden Arbeit zum Entwicklungszeitpunkt 5 dpf für eine Stunde mit einer Neomycin-Lösung (300  $\mu$ M) behandelt, anschließend zu verschiedenen Phasen der Regeneration fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Die Regeneration wurde über 72 hpt (hours post treatment) am dritten primären Neuromasten (L3) dokumentiert, das entspricht einem Alter von 6-8 dpf.

#### Ncam1a wird für die Regeneration von Haarsinneszellen nicht benötigt

Am Beispiel des dritten primären abgesetzten Neuromasten ist gezeigt, dass unmittelbar nach der einstündigen Behandlung mit Neomycin fast alle Haarsinneszellen abgestorben sind (Abb. 3.24, B). Es sind lediglich noch 1-3 Haarsinneszellen zu sehen. Ein vollständiges Absterben ist nur selten zu beobachten, da sehr unreife Zellen noch nicht sensitiv auf Neomycin reagieren (Santos et al. 2006). Es wird vermutet, dass Aminoglykoside, wie Neomycin, über die Transduktionskanäle der Cilien einer Haarsinneszelle in das Zellinnere gelangen und dort mit Eisen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies fördern, wodurch der Zelltod eingeleitet wird. Unreife Haarsinneszellen verfügen noch nicht über Transduktionskanäle, sodass diese keine Aminoglykoside aufnehmen können (Huth et al. 2011).

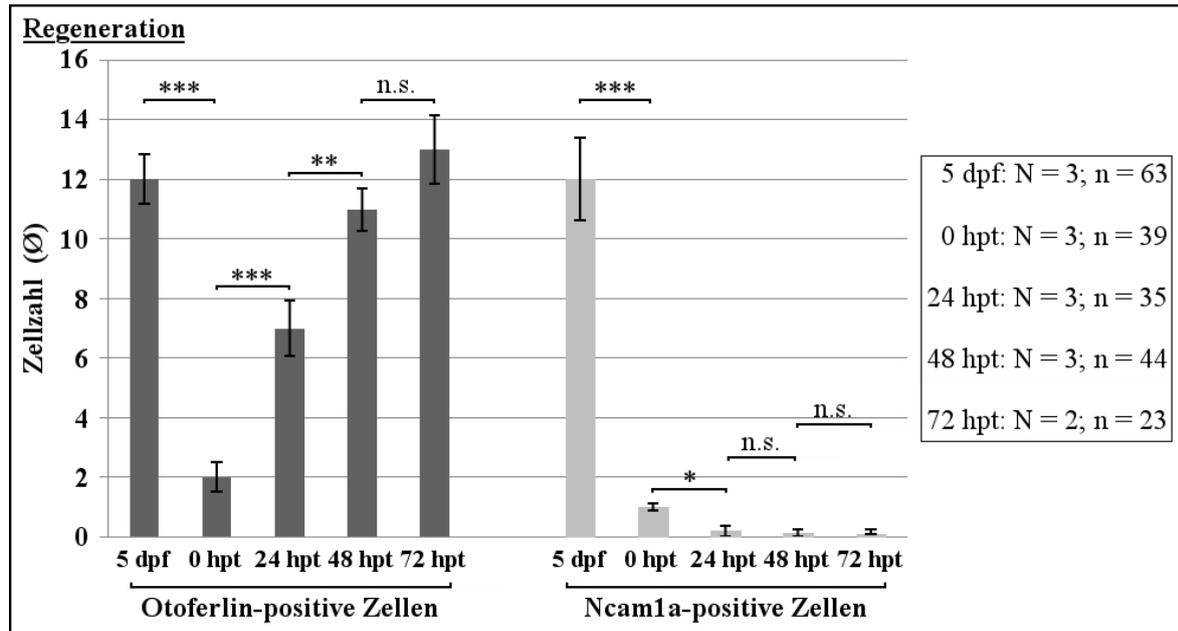
Innerhalb der folgenden 72 Stunden führt die eingeleitete Regeneration zu einem Anstieg der durch Otoferlin detektierten Haarsinneszellen (Abb. 3.24, B-E). Nach Abschluss der Regeneration ist die Anzahl an Haarsinneszellen vergleichbar mit der der Kontrollgruppe an Tag 8 (Abb. 3.20, D-D''' und Abb. 3.24, H''').

Die immunhistochemische Färbung von Ncam1a zeigt zu keinem Zeitpunkt während der Regeneration eine Expression von Ncam1a (Abb. 3.24, C'-E'). Lediglich eine der nicht abgestorbenen Haarsinneszellen exprimiert schwach Ncam1a (Abb. 3.24, B'). Dies entspricht der Situation in unbehandelten Embryonen, welche zum Zeitpunkt 5 dpf noch schwach Ncam1a exprimieren, bevor es rapide herunter reguliert wird.



**Abbildung 3.24: Keine Expression von Ncam1a während der Regeneration von Haarsinneszellen zwischen 0 und 72 hpt.** **B-E''')** Konfokale Lateralansicht des dritten primären abgesetzten Neuro-masten (L3) in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)* in verschiedenen Stadien der Regeneration (Vergrößerung: 63x Öl). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A-E)** Immunhistochemische Färbung von Otoferlin zeigt den Verlust und die Regeneration von Haarsinneszellen. **A'-E')** Keine Expression von Ncam1a während der Regeneration. **A''-E'')** Expression des transgen-markierten ClaudinB in Stütz- und Mantelzellen. **A'''-E''')** Überlagerung der Einzelkanäle. **A-A''' und F'''-H''')** Entwicklung unbehandelter Embryonen aus Abb. 3.20.

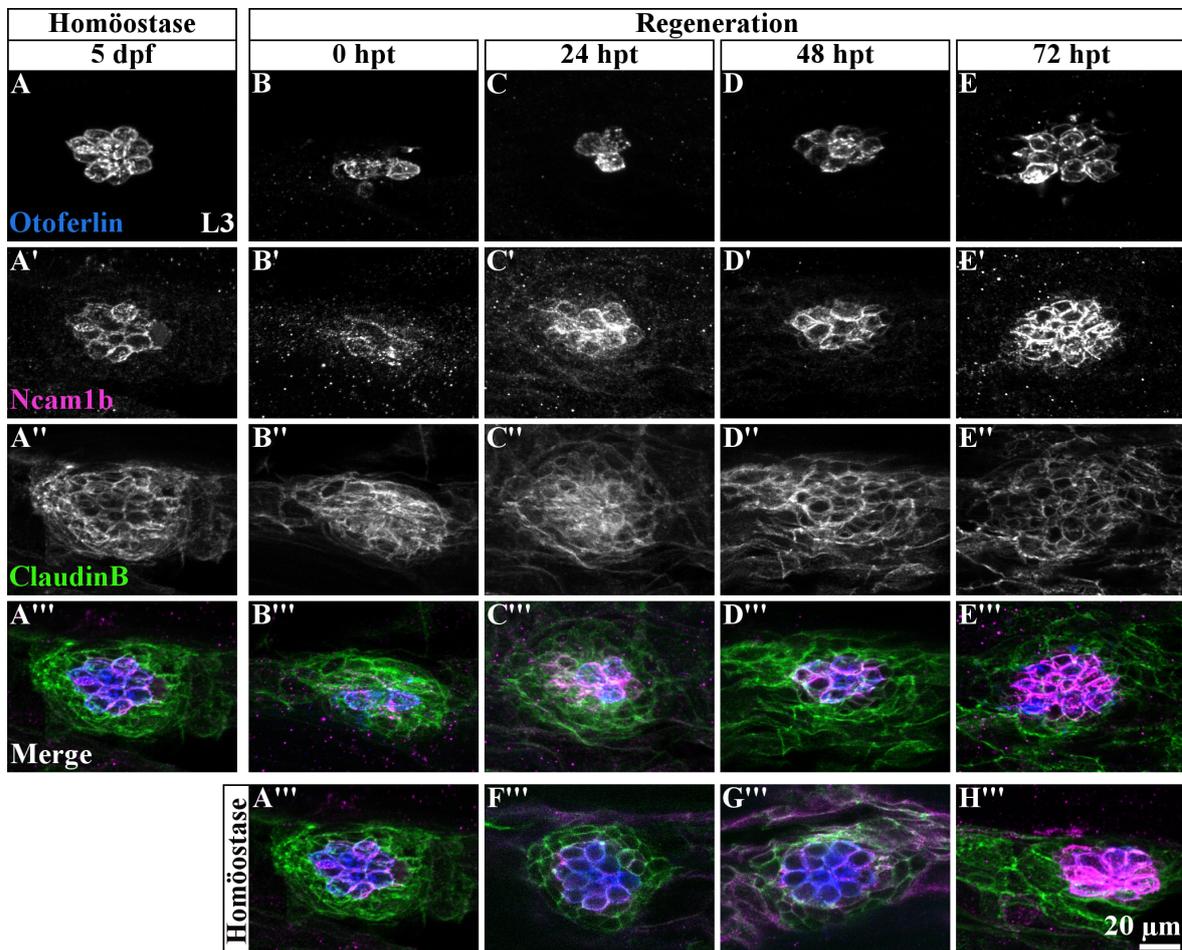
Die Quantifizierung der Regenerationsanalyse zeigt, dass die Konzentration des Neomycins und die Dauer der Behandlung ausreichen um den Zelltod der Haarsinneszellen einzuleiten. Die Regeneration dieser Zellen erfolgt innerhalb von 72 Stunden (Abb. 3.25). Unmittelbar nach der Behandlung können durchschnittlich noch 1,74 ( $\pm 0,51$ ) Haarsinneszellen durch den immunhistochemischen Nachweis von Otoferlin gezählt werden. Dies unterscheidet sich signifikant ( $p = 0,00005$ ) zur unbehandelten Kontrolle (5 dpf). Bereits wenige Stunden nach dem Zelltod wird die Proliferation und Differenzierung der umliegenden Stützzellen eingeleitet, sodass bereits 24 hpt 6,81 ( $\pm 0,91$ ) Haarsinneszellen detektiert werden können. Dies unterscheidet sich signifikant zum Vortag ( $p = 0,001$ ). Die Zahl der Haarsinneszellen steigt 48 hpt weiter an auf 10,99 ( $\pm 0,71$ ) und erreicht 72 hpt eine durchschnittliche Zellzahl von 12,62 ( $\pm 1,62$ ). Die Geschwindigkeit der Differenzierung nimmt im Verlauf der Regeneration ab, was sich an einer Signifikanz von  $p = 0,003$  zwischen 24 hpt und 48 hpt sowie  $p = 0,14$  (n.s.) zwischen 48 hpt und 72 hpt widerspiegelt.



**Abbildung 3.25: Quantifizierung von Ncam1a-positiven Zellen während der Regeneration von Haarsinneszellen.** Die statistische Auswertung zeigt gerundete Mittelwerte der Zahl an Haarsinnes- und Ncam1a-positiven Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Auswertung erfolgte am dritten primären abgesetzten Neuromasten (L3) durch eine immunhistochemische Färbung von Otofelin und Ncam1a an *Tg(ClaudinB::lymGFP)*-Embryonen im Zeitraum 0 hpt bis 72 hpt. 5 dpf stellt die Kontrollgruppe dar. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach der Studentischen *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . *Abkürzungen:* N: Anzahl der Experimente, n: Anzahl der Embryonen

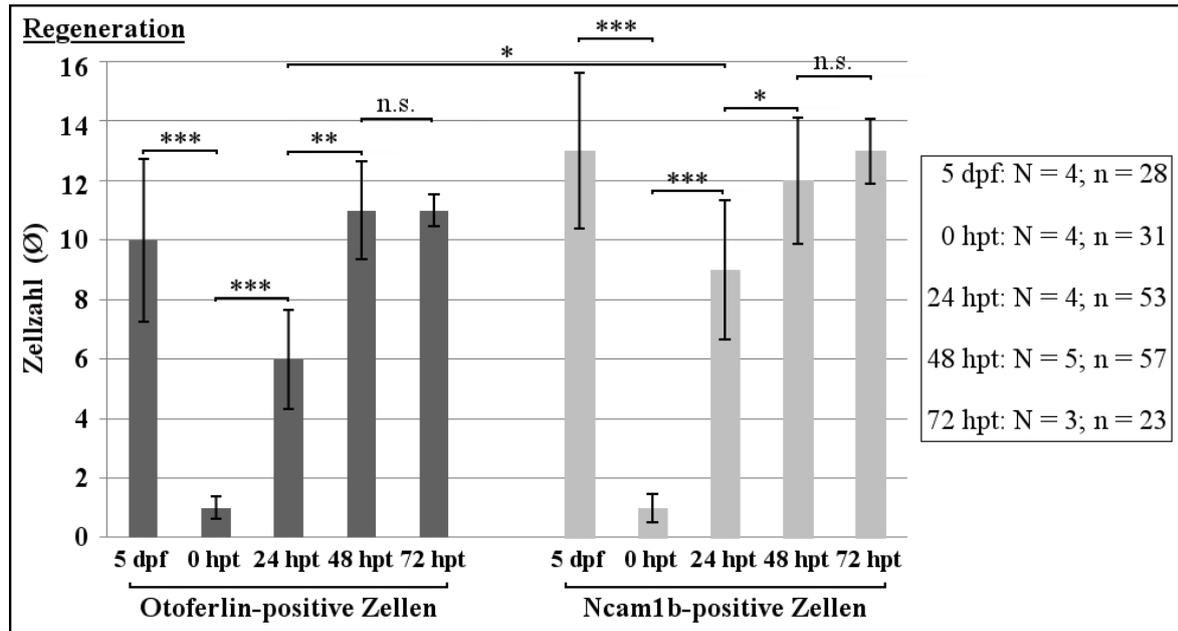
In unbehandelten Embryonen wird Ncam1a ab dem 6. Entwicklungstag nicht mehr in Neuro-masten exprimiert (Abb. 3.20 und Abb. 3.21). Unmittelbar nach dem Absetzen der Neuro-masten lässt sich Ncam1a jedoch noch in den zentralen Zellen nachweisen (Dries 2014). Es könnte daher vermutet werden, dass Ncam1a eine Rolle in unreifen Haarsinneszellen übernimmt und folglich auch während der Regeneration dieser Zellen exprimiert wird. Die statistische Auswertung zeigt jedoch, dass Ncam1a zu keinem Zeitpunkt der Regeneration in Neuromasten exprimiert wird (Abb. 3.25). Unmittelbar nach der Behandlung mit Neomycin können im dritten primären abgesetzten Neuromasten (L3) durchschnittlich nur noch 0,64 ( $\pm 0,10$ ) Zellen detektiert werden, die eine Expression von Ncam1a aufzeigen. In uninjizierten Embryonen zeigen Haarsinneszellen 5 dpf noch eine Expression ( $p=0,0001$ ). Im weiteren Verlauf der Regeneration sind keine Ncam1a-positiven Zellen mehr zu sehen (24 hpt: 0,19 ( $\pm 0,17$ ); 48 hpt: 0,13 ( $\pm 0,11$ ); 72 hpt: 0,1 ( $\pm 0,14$ )). Sehr frühe Stadien von Haarsinneszellen reagieren noch nicht sensitiv auf Aminoglykoside, sodass 0 hpt noch einige wenige Ncam1a-exprimierende Zellen statistisch erfasst werden können, was sich jedoch signifikant innerhalb der ersten 24 Stunden ändert ( $p = 0,02$ ). Zu späteren Zeitpunkten können keine signifikanten Änderungen mehr beobachtet werden (24-48 hpt:  $p = 0,63$  und 48-72 hpt:  $p = 0,58$ ).

### Haarsinneszellen und insbesondere Stützzellen exprimieren Ncam1b während der Regeneration



**Abbildung 3.26: Expression von Ncam1b während der Regeneration von Haarsinneszellen zwischen 0 und 72 hpt. A-H''')** Konfokale Laterallansicht des dritten primären abgesetzten Neuromasten (L3) in der transgenen Zebrafischlinie *Tg(ClaudinB::lynGFP)* in Kontrollembryonen und während der Regenerationsphase (Vergrößerung: 63x Öl). Rostral befindet sich links, caudal rechts. **A-E)** Immunhistochemische Färbung von Otoferlin, zeigt den Verlust von Haarsinneszellen nach Behandlung mit Neomycin und deren Regeneration. **A'-E')** Antikörperdetektion von Ncam1b, welches auch während der Regeneration exprimiert wird. **A''-E'')** Expression des transgen-markierten ClaudinB in Stütz- und Mantelzellen. **A'''-E''')** Überlagerung der Einzelkanäle. **A-A''' und F'''-H''')** Entwicklung unbehandelter Embryonen aus Abb. 3.22.

Ncam1b wird in differenzierten Haarsinnes- und Stützzellen unbehandelter Embryonen exprimiert. Neben der Regeneration der Haarsinneszellen kann auch gezeigt werden, dass Ncam1b während aller dokumentierten Regenerationsphasen exprimiert wird (Abb. 3.26 B-E'''). Unmittelbar nach der Toxinbehandlung können durch Otoferlin noch zwei unreife Haarsinneszellen detektiert werden, welche ebenso Ncam1b exprimieren (Abb. 3.26, B-B'''). Innerhalb der ersten 24 Stunden steigt die Zahl der Otoferlin-exprimierenden Zellen leicht an, wohingegen Ncam1b in deutlich mehr Zellen exprimiert wird (Abb. 3.26, C-C'''). Dies zeigt, dass Ncam1b nicht nur in den Haarsinnes- sondern auch in den umliegenden Stützzellen exprimiert wird. Im weiteren Verlauf der Regeneration nimmt auch die Zahl Ncam1b-exprimierender Haarsinneszellen weiter zu (Abb. 3.26, D-E'''). Die Expression von Ncam1b liegt an Tag 8 ( $\cong$  72hpt) stärker vor. Dies wurde auch in der Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 3.26, E' vgl. H''').

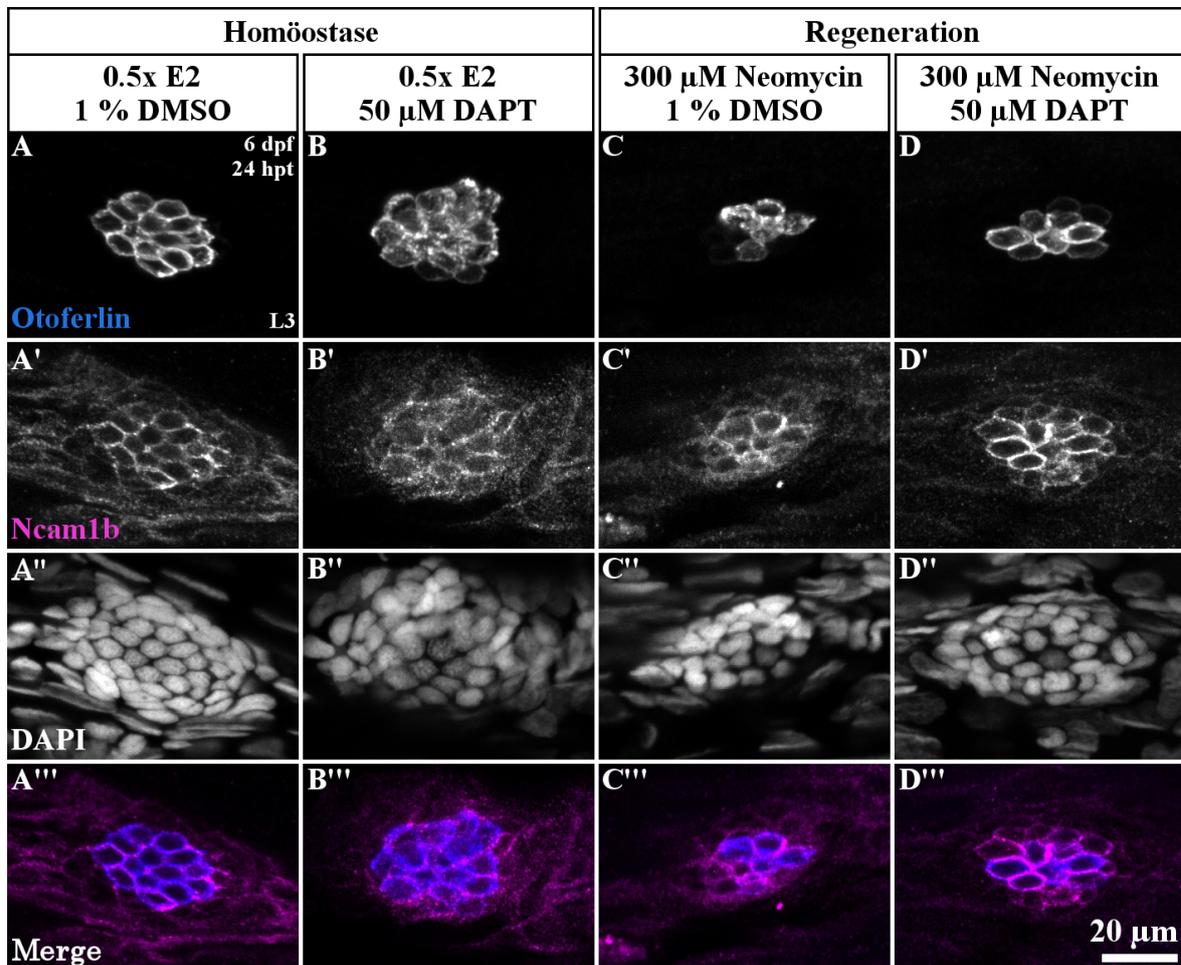


**Abbildung 3.27: Quantifizierung von Ncam1b-exprimierenden Zellen während der Regeneration von Haarsinneszellen.** Die statistische Auswertung zeigt gerundete Mittelwerte der Zahl an Haarsinnes- und Ncam1b-exprimierenden Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Auswertung erfolgte am dritten primären abgesetzten Neuromasten (L3) durch eine immunhistochemische Färbung von Otofelin und Ncam1b an *Tg(ClaudinB::lynGFP)*-Embryonen im Zeitraum 0 hpt bis 72 hpt. Die Kontrolle wird durch 5 dpf dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach der Studentischen *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ . *Abkürzungen:* **N:** Anzahl der Experimente, **n:** Anzahl der Embryonen

Die Quantifizierung zeigt die Regeneration der Haarsinneszellen sowie die erneute Expression von Ncam1b während der Regeneration (Abb. 3.27). Unmittelbar nach der Behandlung mit Neomycin (0 hpt) befinden sich statistisch  $0,55 (\pm 0,38)$  Haarsinneszellen im Neuromasten L3, was sich signifikant zur Kontrollgruppe verhält ( $p = 0,00005$ ). Im Verlauf der Regeneration steigt die Zahl der Haarsinneszellen; sie beträgt 24 hpt  $5,87 (\pm 1,66)$ , 48 hpt  $11,02 (\pm 1,65)$  und 72 hpt  $11,31 (\pm 0,53)$ . Die erfasste Anzahl der Haarsinneszellen zu den jeweiligen Zeitpunkten ist vergleichbar mit der in Abbildung 3.25 dokumentierten Regeneration. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Behandlung erfolgt eine rasche Differenzierung der Haarsinneszellen, die sich signifikant vom Vortag unterscheidet ( $p = 0,0008$ ). Die Differenzierung der Stütz- zu Haarsinneszellen steigt bis 48 hpt weiter signifikant an ( $p = 0,002$ ). Nach 72 hpt ist die Regeneration abgeschlossen und weist keinen signifikanten Unterschied mehr auf ( $p = 0,78$ ).

Haarsinneszellen, die noch nicht sensitiv auf Neomycin reagieren, sterben infolgedessen nicht ab und exprimieren Ncam1b, wodurch sie statistisch erfasst werden können ( $0,58 \pm 0,49$ ). Im Vergleich zur Kontrolle verhält sich dies mit einem *p*-Wert von  $0,00005$  signifikant. Innerhalb der ersten 24 Stunden steigt die Zahl an Ncam1b-exprimierenden Zellen stark an ( $8,59 \pm 2,33$ ). Ein Vergleich der Anzahl Haarsinnes- mit Ncam1b-positiven Zellen zum Zeitpunkt 24 hpt ergibt, dass nach Einleitung der Regeneration mehr Zellen Ncam1b exprimieren, als Haarsinneszellen vorhanden sind ( $p = 0,05$ ). Dies deutet darauf hin, dass Stützzellen Ncam1b exprimieren bevor sie sich differenzieren. Im weiteren Verlauf steigt die Zahl an Ncam1b-positiven Zellen nochmals signifikant an und entspricht den Werten unbehandelter Embryonen ( $12,37 (\pm 2,13, p = 0,04, 48 \text{ hpt})$  und  $12,7 (\pm 1,01, p = 0,78, 72 \text{ hpt})$ ).

### Die Inhibierung des Notch-Signalweges führt zu einer verstärkten Expression von Ncam1b



**Abbildung 3.28: Die Inhibierung des Notch-Signalweges führt zu einer erhöhten Expression von Ncam1b in Stützzellen.** A-D''') Konfokale Lateralansicht des dritten abgesetzten Neuromasten (L3) in normaler Entwicklung und Regeneration nach Zugabe von DMSO oder DAPT (Vergrößerung: 63x Öl). Rostral befindet sich links, caudal rechts. A-D) Expression von Otoferlin in den Haarsinneszellen, die sich durch Zugabe von DAPT nach Neomycin-Behandlung schneller regenerieren. A'-D') Die Antikörperdetektion zeigt, dass nach Zugabe von DAPT mehr Stützzellen Ncam1b exprimieren. A''-D'') DAPI-Färbung. A'''-D''') Überlagerung der jeweiligen Einzelkanäle ohne DAPI.

Die laterale Inhibierung durch den Delta-Notch-Signalweg sorgt in unreifen und in differenzierten Neuromasten für eine kontrollierte Differenzierungsrate von Stützzellen zu Haarsinneszellen. Durch die Bindung der Liganden DeltaA und DeltaD an Notch3 in den Stützzellen, wird in diesen die Expression des Transkriptionsfaktors Atoh1a unterdrückt, wodurch keine Differenzierung möglich ist. Die Bindung von Delta an den Rezeptor Notch führt durch die Gamma-Sekretase zu mehrmaligem Prozessieren des Rezeptors, wodurch dieser aus der Membran gelöst wird und in den Zellkern diffundiert um Zielgene zu aktivieren. Eine Standard-Methode zur Unterdrückung des Notch-Signalweges, ist die Inhibierung der Gamma-Sekretase durch DAPT (Wibowo et al. 2011, Romero-Carvajal et al. 2015). Zur Hemmung des Notch-Signalweges wurden in der vorliegenden Arbeit unbehandelte und Neomycin-behandelte Embryonen für 24 Stunden in 50  $\mu$ M DAPT in 0.5x E2 inkubiert. Als Kontrolle diente 1 % DMSO in 0.5x E2 (Abb. 3.28).

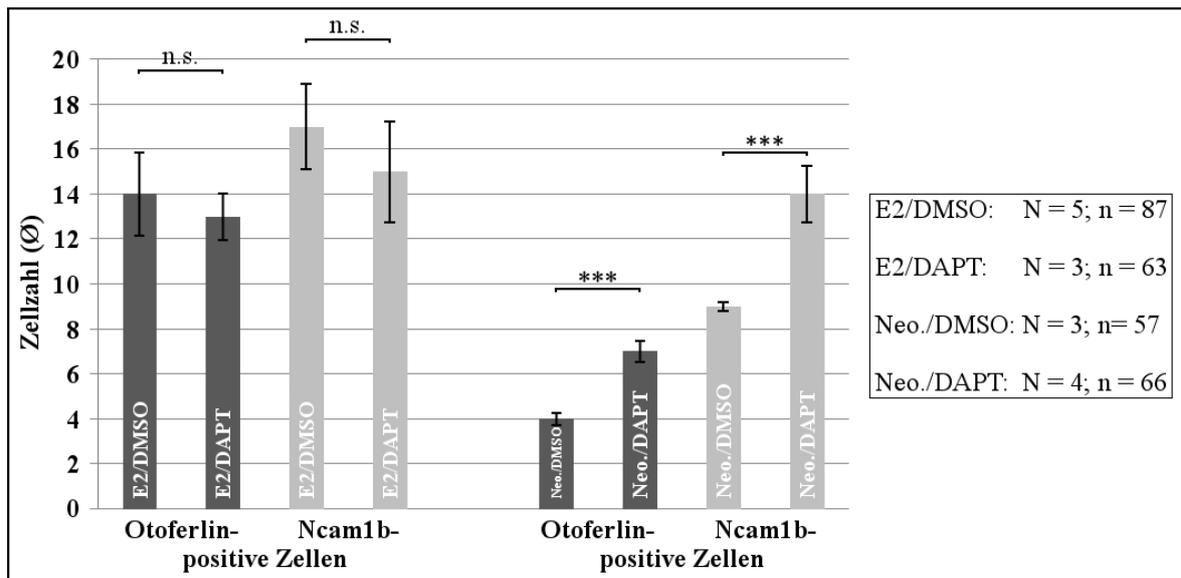
Embryonen, die nicht mit Neomycin behandelt wurden, zeigen in der immunhistochemischen Färbung von Otoferlin keinen Unterschied zwischen DMSO- und DAPT-behandelten Embryonen (Abb. 3.28, A und B). Alle Haarsinnes-, und einige Stützzellen exprimieren in beiden Fällen *Ncam1b* (Abb. 3.28, A' und B'). Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der Homöostase in Abb. 3.22, B-B'').

Die Behandlung mit Neomycin führt zu einem sofortigen Absterben der Haarsinneszellen und zur Einleitung der Regeneration. Nach dem Verlust der Haarsinneszellen wird für wenige Stunden die laterale Hemmung aufgehoben, wodurch sich die ersten funktionsfähigen Haarsinneszellen schnell differenzieren und ihre Funktion aufnehmen können (Jiang et al. 2014). Die zusätzliche Hemmung von Notch durch Zugabe von DAPT setzt die laterale Hemmung für insgesamt 24 Stunden außer Kraft, wodurch sich in kürzerer Zeit mehr Zellen differenzieren können. Dieser Effekt ist in Abbildung 3.28, C und D zu sehen. Embryonen, die für 24 Stunden mit DAPT behandelt wurden (D), zeigen in den ersten 24 Stunden der Regeneration eine höhere Anzahl an Haarsinneszellen als die Kontrollgruppe (C). Die Zahl an *Ncam1b*-exprimierenden Zellen nimmt ebenfalls zu, da sich Stützzellen durch Aufhebung der lateralen Inhibierung vermehrt zu Haarsinneszellen differenzieren (Abb. 3.28, D' und D''').

Die statistische Auswertung der Embryonen, die nicht mit Neomycin, aber mit DAPT behandelt wurden, zeigen, dass eine Hemmung des Notch-Rezeptors weder einen Effekt auf die Zahl an Haarsinneszellen noch auf die der *Ncam1b*-exprimierenden Zellen hat (Abb. 3.29). Embryonen, die für 24 Stunden mit 1% DMSO behandelt wurden zeigen durchschnittlich  $13,94 (\pm 1,85)$  Haarsinnes- und  $16,62 (\pm 1,88)$  *Ncam1b*-positive Zellen. Eine Behandlung mit DAPT (ohne Neomycin) führt in beiden Fällen zu keiner signifikanten Änderung der Zellzahl (Otoferlin-positiv:  $12,62 (\pm 1,03)$ ,  $p = 0,31$ ; *Ncam1b*-positiv:  $15,21 (\pm 2,24)$ ,  $p = 0,37$ ; zweiseitige Studentische *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ ).

Die Behandlung der Embryonen mit Neomycin zum Zeitpunkt 5 dpf und eine anschließende Inkubation mit DMSO (24 Stunden) führt zu  $4,4 (\pm 0,28)$  Haarsinnes- und  $9,06 (\pm 0,20)$  *Ncam1b*-exprimierende Zellen. Dies entspricht einer normalen Regeneration zum Zeitpunkt 24 hpt und ist vergleichbar mit den vorangegangenen Ergebnissen (Abb. 3.27).

Die Hemmung des Notch-Rezeptors führt dazu, dass sich in einem kürzeren Zeitraum mehr Stützzellen differenzieren. Dies wirkt sich zum einen in einer höheren Zahl an Haarsinneszellen ( $6,79 \pm 0,46$ ) und zum anderen in mehr *Ncam1b*-exprimierenden Zellen aus ( $13,49 \pm 1,24$ ) (Abb. 3.29). Dies unterscheidet sich signifikant von der Situation in Embryonen, welche mit DMSO behandelt wurden. Bei Behandlung der Embryonen mit DAPT können 24 Stunden nach Einleitung der Regeneration mehr Haarsinneszellen ( $p = 0,0005$ ) und *Ncam1b*-exprimierende Zellen ( $p = 0,001$ ) beobachtet werden, als in der Kontrollgruppe. Die hohe Zahl an *Ncam1b*-exprimierenden Stützzellen zeigt deutlich, dass *Ncam1b* für die Differenzierung zur Haarsinneszelle benötigt wird.



**Abbildung 3.29: Statistische Auswertung von Ncam1b-exprimierenden Zellen während der Regeneration von Haarsinneszellen bei gleichzeitiger Hemmung der lateralen Inhibierung.** Die Quantifizierung zeigt gerundete Mittelwerte der Zahl an Haarsinnes- und Ncam1b-exprimierenden Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Auswertung erfolgte am dritten primären abgesetzten Neuromasten L3, durch eine immunhistochemische Färbung gegen Otofelin und Ncam1b zum Zeitpunkt 24 hpt. Der Haarsinneszellen-Toxizitäts Test erfolgte mit einer 300  $\mu$ M Neomycin-Lösung. Die Hemmung des Delta-Notch-Signalweges wurde durch 50  $\mu$ M DAPT induziert. Die Signifikanzberechnung erfolgte nach der Studentschen *t*-Verteilung mit einem Schwellenwert der Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ .

Diese Untersuchungen zur Funktion der Ncam1-Paralogen in Strukturen des differenzierten pSLO zeigen, dass Ncam1b nicht nur für die Entwicklung des pSLO sondern auch für dessen Reifung und Regeneration von besonderer Bedeutung ist. Differenzierte Haarsinneszellen und Stützzellen exprimieren Ncam1b bis mindestens Entwicklungstag 8 und sie zeigen eine erneute Expression von Ncam1b während der dreitägigen Regeneration.

Die Expression von Ncam1b in den Stützzellen lässt vermuten, dass Ncam1b eine entscheidende Funktion in der Differenzierung dieser Zellen zu Haarsinneszellen übernimmt. Da nicht alle Stützzellen Ncam1b exprimieren, ist anzunehmen, dass es sich bei den Ncam1b-exprimierenden um direkte Vorläuferzellen der Haarsinneszellen handelt. Die Experimente zur Hemmung des Delta-Notch-Signalweges unterstützen diese Vermutung, da sich nach Aufhebung der lateralen Inhibierung nicht nur die Anzahl an Haarsinneszellen erhöht sondern auch die der Ncam1b-exprimierenden Stützzellen.



## 4 Diskussion

Die Entwicklung und Differenzierung neuronaler Strukturen sowie die adulte Plastizität erfordern eine streng regulierte Abfolge verschiedener Signalwege in den Nervenzellen. Der Auswuchs von Neuriten, ihre Faszikulation und insbesondere die Wegfindung der neuronalen Wachstumskegel beruhen auf vielseitigen Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Nervenzellen aber auch mit der extrazellulären Matrix. Das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM1 und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor FGFR1 werden verstärkt auf der Oberfläche neuronaler Wachstumskegel exprimiert und nehmen Einfluss auf das Wachstum der Axone und deren Wegfindung (Williams et al. 1994a).

Die embryonale und die adulte Neurogenese beruhen auf der kollektiven Migration und Differenzierung von Zellclustern. Ein leicht zugängliches Modellsystem für die Migration von Zellzusammenschlüssen und deren Differenzierung zu neuronalen Strukturen stellt das posteriore Seitenlinienorgan (pSLO) des Zebrafischs dar. Das aus bis zu 100 Zellen bestehende und migrierende Primordium setzt in periodischen Abständen Zellcluster entlang des horizontalen Myoseptums ab, welche sich während der Embryogenese zu motosensorischen Neuromasten differenzieren, Umgebungsreize aufnehmen und diese über bipolare Nervenzellen auf das auditive System projizieren (Alexandre und Ghysen 1999). Die *Ncam1*-Paraloge des Zebrafischs sowie *Fgfr1a* werden in teils überlappenden Bereichen in Strukturen des pSLO exprimiert und beeinflussen maßgeblich dessen Entwicklung und Funktion (Aman et al. 2011, Heiny 2012, Dries 2014). Die molekulare Grundlage auf der die *Ncam1*-Paraloge die Entwicklung des pSLO beeinflussen sollte in der vorliegenden Arbeit genauso untersucht werden wie die Funktion von *Ncam1a* und *Ncam1b* während der Regeneration des differenzierten pSLO.

### 4.1 *Ncam1b* nimmt Einfluss auf den *Fgfr1a*-Signalweg

Ein *Knockdown* von *ncam1b* führt zu einer stark veränderten Entwicklung des pSLO, bei der das deutlich verkleinerte Primordium eine verlangsamte Migration aufzeigt; es kommt zu einem Migrationsstopp oder einem Umkehren des Primordiums (Abb. 3.1, B). Die Bildung und Absetzung von Protoneuromasten ist in den Morphanten eingeschränkt. In seltenen Fällen kann ein abgesetzter Protoneuromast beobachtet werden, jedoch zerfällt er innerhalb weniger Stunden (Heiny 2012, Dries 2014). Ein *Knockdown* von *ncam1a* wirkt sich hingegen schwächer auf die Entwicklung des pSLO aus. Das unveränderte Primordium migriert langsamer, erreicht zeitverzögert die Schwanzspitze und setzt während der Migration Protoneuromasten ab (Abb. 3.1, C). Die bereits zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse deuten eine Subfunktionalisierung der *Ncam1*-Paraloge an. Sie werden durch die vorliegende Arbeit nicht nur phänotypisch sondern auch auf molekularer Ebene bestätigt.

#### 4.1.1 Ncam1b beeinflusst die Zellproliferation primordialer Zellen

Die Primordiengröße im sich entwickelnden pSLO wird durch zwei Faktoren reguliert: der Anzahl der in der *Trailing-Zone* befindlichen Protoneuromasten und die damit einhergehende zyklische Proliferation. Nach der Entlassung eines Protoneuromasten nimmt die Proliferationsrate im Primordium zu, bis genügend Zellen für eine erneute apikale Konstriktion (Formierung von Protoneuromasten) zur Verfügung stehen (Aman et al. 2011).

Die hier beschriebenen Proliferationsstudien in *ncam1b*-Morphanten zeigen eine deutlich reduzierte Teilungsrates primordialer Zellen. Ein *Knockdown* von *ncam1a* führt hingegen zu keiner veränderten Proliferation (Abb. 3.2 und Abb. 3.3). Dies bestätigt die Beobachtungen vorausgegangener Funktionsstudien von *Ncam1a*, bei welchen Primordien nach *ncam1a-Knockdown* lediglich eine verlangsamte Migration zeigen, jedoch Protoneuromasten ausbilden können (Dries 2014). Eine nicht veränderte Proliferation entspricht der normalen Primordiengröße dieser Morphanten und deren Möglichkeit Protoneuromasten zu formieren und abzusetzen. Die reduzierte Protoneuromasten-Anzahl in *ncam1a*-Morphanten ist somit vermutlich nur eine Folge der verlangsamten Migration und nicht durch eine reduzierte Proliferation verursacht. Die phänotypischen Merkmale eines *ncam1b-Knockdowns* stehen hingegen in direktem Zusammenhang mit einer reduzierten Teilung der primordialen Zellen. Die stark reduzierte Zellteilung spiegelt die ebenfalls stark reduzierte Primordiengröße und Anzahl der abgesetzten Protoneuromasten wider. In einer normalen Entwicklung besteht das Primordium nach der Abspaltung von der sensorischen Plakode aus durchschnittlich 100 Zellen; es bildet durch zyklische Proliferation und Absetzung der Protoneuromasten ein embryonales pSLO aus 200-250 Zellen (Gompel et al. 2001, Berghaus 2015; von mir betreute Bachelorarbeit). Primordien von *ncam1b*-Morphanten bestehen hingegen nur aus etwa 60 Zellen, die ausreichen um die apikale Konstriktion der Protoneuromasten (einmalig) einzuleiten (Berghaus 2015). In einigen wenigen Fällen wird ein Protoneuromast entlang des horizontalen Myoseptums abgesetzt. Zeitrafferaufnahmen zeigen jedoch, dass dieser innerhalb weniger Stunden fragmentiert, sodass statistisch keine Protoneuromasten erfasst werden können (Heiny 2012, Dries 2014). Die fehlende Proliferation der primordialen Zellen führt vermutlich dazu, dass das embryonale pSLO (200-250 Zellen) nicht vervollständigt werden kann.

Die Fragmentierung der Protoneuromasten könnte ein Sekundäreffekt der fehlenden Proliferation darstellen. Eine reduzierte Zellteilungsrate führt zunächst zu weniger epithelialen Zellen, die an der apikalen Konstriktion beteiligt sein können. Des Weiteren sind die Zellen der abgesetzten Protoneuromasten nicht in der Lage zu proliferieren, was schlussendlich zu einer Eliminierung des Stammzell-Reservoirs oder einer fehlenden Differenzierung zu Gunsten des Reservoirs führen muss (Romero-Carvajal et al. 2015). Eine fehlende Differenzierung würde zum Verlust der Funktion führen, wodurch es zur Einleitung des Zelltodes kommen könnte und das Zellcluster zerfällt. Untersuchungen des Apoptose-Markers p53 könnten Auskunft darüber geben, ob in den abgesetzten Protoneuromasten der Zelltod eingeleitet wird.

*Ncam1b* kann homophile und heterophile Interaktionen eingehen, welche die Zelladhäsion fördern (Schober 2016). Es wäre denkbar, dass ein Fehlen von *Ncam1b* die Zelladhäsion herabsetzt und dass dies zur Fragmentierung des Protoneuromasten führt. Der Zellzusammenhalt der epithelialen Zellen eines Protoneuromasten wird jedoch nicht ausschließlich durch *Ncam1b*

reguliert. Matsuda und Chitnis (2010) zeigen, dass n- und e-Cadherin, die in einem spezifischen Muster mit Beginn der apikalen Konstriktion exprimiert werden, an der Zelladhäsion der Protoneuromasten beteiligt sind. Die im Zentrum eines Protoneuromasten liegende Zelle exprimiert n-Cadherin, wohingegen in den direkt umliegenden Zellen sowohl n- als auch e-Cadherin vorliegt. Die äußerste Zellschicht exprimiert hingegen nur e-Cadherin. Dies ermöglicht homophile Interaktionen der jeweiligen Cadherine und eine spezifische Zelladhäsion der verschiedenen Zellschichten. Ncam1b wird nur in den zentralen Zellen der Protoneuromasten exprimiert, weshalb eine durch homophile Wechselwirkungen vermittelte Zelladhäsion eine verminderte Rolle beim Zusammenhalt des Neuromasten spielen dürfte. Heterophile Interaktionen von Ncam1b, mit z.B. Fgfr1a, könnten hingegen einen größeren Einfluss auf die zelladhäsiven Eigenschaften in (Proto)-Neuromasten nehmen.

#### 4.1.2 Das Primordium von *ncam1b*-Morphanten weist eine Musterung auf

Das Primordium des pSLO wird morphologisch und funktionell in zwei Bereiche unterteilt: die Wnt-dominierende *Leading-Zone* und die Fgfr1a-aktive *Trailing-Zone*. Der Wnt-abhängige Transkriptionsfaktor Lef1 induziert in den pseudomesenchymalen Zellen der *Leading-Zone* die Zellproliferation, wohingegen der Fgfr1a-Signalweg in der *Trailing-Zone* die apikale Konstriktion der Protoneuromasten einleitet (Lecaudey et al. 2008, Gamba et al. 2010, Valdivia et al. 2011, Breau et al. 2013, Agarwala et al. 2015). Da Lef1 als Proliferationsmarker gehandelt wird, wäre zu erwarten gewesen, dass die reduzierte Zellteilungsrate in den *ncam1b*-Morphanten auf einer reduzierten Lef1-Expression basiert. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden. In *ncam1b*-Morphanten wird nach wie vor *lef1* exprimiert, das nicht mehr länger nur in der *Leading-Zone* sondern auch in der *Trailing-Zone* detektiert werden kann (Abb. 3.4). Diese Beobachtungen lassen sich zunächst nicht mit einer reduzierten Zellteilungsrate in Einklang bringen, da Lef1 als Schlüsselprotein für die primordiale Zellproliferation gilt.

Die Aktivität der Signalwege Wnt und Fgfr1a erfolgt in einem antagonistisch wirkenden *Feedback Loop*. Wnt exprimiert den Fgfr1a-Inhibitor Sef und Fgfr1a führt zur Expression des Wnt-Inhibitors Dkk. Die Aktivität des Fgfr1a wird in der *Leading-Zone* durch Sef gehemmt, wodurch die Expression von Fgfr1a in diesem Bereich minimiert wird (Aman et al. 2011). Es wäre nun zu erwarten gewesen, dass das vergrößerte Wnt-Aktivitätszentrum in *ncam1b*-Morphanten zu einer reduzierten *fgfr1a*-Expression führt. Dies war jedoch nicht zu beobachten; *fgfr1a* wurde nach wie vor in der *Trailing-Zone* exprimiert (Abb. 3.5). Somit erfolgt in den Primordien von *ncam1b*-Morphanten weiterhin eine Musterung durch die Signalwege Wnt und Fgfr1a mit einem vergrößerten Überlappungsbereich der Signalwege.

Der Wnt-Signalweg führt zur Expression der Fgf-Liganden Fgf3 und Fgf10. Die Bindung der Fgf-Liganden an Fgfr1a ist für die Einleitung der Formierung von Protoneuromasten essentiell (Lecaudey et al. 2008, Ernst et al. 2012). Da *ncam1b*-Morphanten einen Protoneuromasten formieren können und hierfür der Fgf-Fgfr1a-vermittelte Signalweg aktiv sein muss, ist davon auszugehen, dass weder Fgf3 und Fgf10 die Proliferation einleiten können noch Lef1 alleine zur Initiierung ausreicht.

### 4.1.3 Keine Fgfr1a-Signaltransduktion in *ncam1b*-Morphanten

Die bis hierher beschriebenen Ergebnisse deuten zum einen darauf hin, dass es neben der Wnt-induzierten auch eine Fgfr1a-induzierte Proliferation primordialer Zellen geben muss und dass diese nicht durch die Fgf-Liganden Fgf3 und 10 reguliert wird. Aufgrund des gemeinsamen Expressionsmusters und der phänotypischen Veränderungen nach Morpholino-*Knockdown* wäre *Ncam1b* ein potentieller Bindungspartner von Fgfr1a und könnte auf diese Weise, unabhängig von den Fgf-Liganden, Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors und die Zellproliferation innerhalb des Primordiums nehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurden *in situ* Hybridisierungen des Fgfr1a-Zielgens *erm* zur Überprüfung der Fgfr1a-Aktivität durchgeführt. *Erm* ist außerdem an der embryonalen Zellproliferation und -differenzierung in Säugern beteiligt (Liu et al. 2003, Akagi et al. 2015). In der *Trailing-Zone* von uninjizierten Embryonen kann *erm* nachgewiesen werden, wohingegen in *ncam1b*-Morphanten keine Expression in diesem Bereich zu sehen ist (Abb. 3.6). Die statistische Auswertung zeigt deutlich, dass durch den Verlust von *Ncam1b* eine reduzierte Fgfr1a-Aktivität hervorgerufen wird (Abb. 3.7). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Expression von *Erm* in Abhängigkeit von *Ncam1b* steht und vermutlich durch die *Ncam1b*-Fgfr1a-Interaktion aktiviert wird. Des Weiteren könnte *Erm* die Proliferation beeinflussen. Die Vermutung, dass Fgfr1a in der Zellproliferation primordialer Zellen eine Rolle spielt wird durch Studien bestätigt, bei denen die Aktivität des Fgfr1a durch das ATP-Analogon SU5402 gehemmt wird (Aman et al. 2011). Diese Hemmung führt zu einer reduzierten Zellteilungsrate und zeigt, dass der Wnt-abhängige Transkriptionsfaktor *Lef1* alleine nicht ausreicht um die Proliferation im Primordium zu induzieren. Dies erklärt, weshalb nach einem *Knockdown* von *ncam1b* trotz der vorhandenen *Lef1*-Expression keine Proliferation primordialer Zellen beobachtet werden kann.

Bislang ist bekannt, dass im Zebrafisch die Expression von *Erm* durch die Bindung von Fgf8 und zu einem geringen Anteil durch Fgf3 an Fgfr1a während der frühen Embryonalentwicklung induziert wird (Raible und Brand 2001, Roehl und Nüsslein-Volhard 2001). Im Primordium werden die Fgf-Liganden Fgf3 und Fgf10 exprimiert (Aman und Piotrowski 2008), jedoch ist keine Expression von *Erm* zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Expression von *Erm* im Primordium durch die Bindung von *Ncam1b* an Fgfr1a reguliert wird.

Im Rahmen der hier gezeigten Untersuchungen wurden keine *Knockdown*-Studien von *erm* durchgeführt, sodass nur darüber spekuliert werden kann, ob *Erm* tatsächlich als Co-Initiator der Zellproliferation fungiert. Dies gilt es in weiteren Untersuchungen zu zeigen. Jedoch untermauern die reduzierte Fgfr1a-Aktivität und die reduzierte Zellproliferation in *ncam1b*-Morphanten die bereits durch Aman et al. (2011) postulierte Involvierung des Fgfr1a-Signalweges in die Zellproliferation des Primordiums. Mit *Erm* wird nun erstmals ein Kandidat des Fgfr1a-Signalweges vorgeschlagen, der neben dem Wnt-abhängigen Transkriptionsfaktor *Lef1* Einfluss auf die Zellteilungsrate nehmen könnte und der Regulierung von *Ncam1b* unterliegt.

## 4.2 Ncam1b-vermittelte Fgfr1a-Signaltransduktion

Eine Regulierung der Fgfr1a-Aktivität durch Ncam1b setzt eine Interaktion dieser Proteine voraus, in deren Folge Fgfr1a phosphoryliert wird. Neben den aufgezeigten Veränderungen auf molekularer Ebene spricht auch das überlappende Expressionsmuster von Ncam1b und Fgfr1a für eine Interaktion. Fgfr1a wird wie Ncam1b verstärkt in der *Trailing-Zone* und zusätzlich schwach in der *Leading-Zone* exprimiert.

In Säugern führt die Bindung von NCAM1 an FGFR1 zur Phosphorylierung von Tyrosin 766 des Rezeptors, wodurch PLC $\gamma$  rekrutiert und u.a. der Auswuchs von Neuriten durch erhöhten Calciumeinstrom stimuliert wird (Williams et al. 1994a, Williams et al. 1994c). Eine mögliche Interaktion erfolgt dabei durch die zweite Fibronektin (FN)-Domäne von NCAM1 mit dem C-terminalen Bereich der dritten Ig-Domäne von FGFR1 (Kiselyov et al. 2003, Aonurm-Helm et al. 2010, Christensen et al. 2011). Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion der Ncam1-Paraloge mit Fgfr1a, wurden deshalb Splice-Varianten des Fgfr1a im C-terminalen Bereich der dritten Ig-Domäne gewählt.

### Die Ncam1-Paraloge interagieren mit Fgfr1a

Aus dem Zebrafischtranskriptom konnten in der vorliegenden Arbeit zwei Splice-Isoformen der C-terminalen Ig-3 Domäne von Fgfr1a isoliert werden: Fgfr1a-IIIb und Fgfr1a-IIIc (Abb. 3.9). Die Aminosäuresequenz des Exon 7, welches für den C-terminalen Bereich codiert, zeigt lediglich eine Homologie von 47 % zwischen den isolierten Splice-Varianten.

Fgfr1a-IIIb wurde zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten (24 hpf, 48 hpf, 3 dpf, 7 dpf) isoliert, was auf eine hohe Transkriptionsrate während der Embryonalentwicklung schließen lässt. Dahingegen konnte die Isoform IIIc nur aus jungen Embryonen (24 hpf) isoliert werden. Scholpp et al. (2004) zeigen Fgfr1a-IIIc ebenfalls in sehr frühen Entwicklungsstadien (ab 8 hpf), wodurch sich vermuten lässt, dass diese Splicevariante eine Funktion in der frühen Embryonalentwicklung übernimmt. Jedoch konnte Scholpp et al. (2004) Fgfr1a-IIIc mittels RT-PCR auch in älteren Entwicklungsstadien nachweisen (bis 48 hpf).

Die spezifische Expression und Lokalisation der Splice-Varianten konnte *in vivo* nicht gezeigt werden. Das Exon 7 codiert nur 147 bp (IIIb) bzw. 144 bp (IIIc) mit einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 50 %. Die Sondenmarkierung reichte somit nicht aus, um das jeweilige Expressionsmuster durch *in situ* Hybridisierungen zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

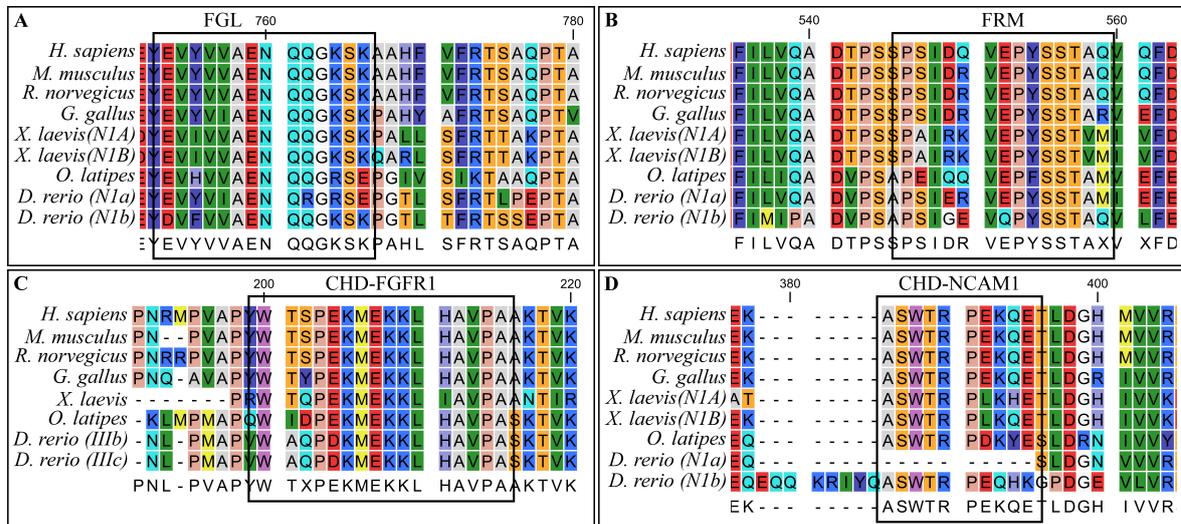
Die Zellkulturexperimente und Bead-Aggregationsstudien zeigen, dass die Ncam1-Paraloge unterschiedlich mit den Fgfr1a-Isoformen interagieren. Ncam1b kann Wechselwirkungen sowohl mit Fgfr1a-IIIb als auch mit -IIIc eingehen (Abb. 3.11, Abb. 3.14 und Abb. 3.17). Eine Bindung von Ncam1a kann hingegen nur mit Fgfr1a-IIIb beobachtet werden (Abb. 3.12, Abb. 3.14 und Abb. 3.17). Fehlt der C-terminale Bereich der Ig-3 Domäne von Fgfr1a, so erfolgt weder eine Interaktion mit Ncam1b noch mit Ncam1a (Abb. 3.13 und Abb. 3.14).

Die schwache Bindung von Ncam1a und Fgfr1a-IIIb wurde *in vitro* beobachtet. Es ist daher möglich, dass diese Bindung, trotz des nur partiell überlappenden Expressionsmusters, auch *in vivo* erfolgt. Ncam1a wird sowohl in der *Trailing-* als auch der *Leading-Zone* exprimiert und könnte theoretisch mit Fgfr1a interagieren. Sicher ist dahingegen, dass diese Interaktion weder

die Expression von Erm noch die Zellproliferation oder die apikale Konstriktion beeinflusst. Glykosylierungen können Protein-Protein-Wechselwirkungen beeinflussen. Ncam1 kann durch die Sialyltransferasen St8SiaII und St8SiaIV polysialyliert vorliegen (Langhauser et al. 2012). Die Anheftung von polySia führt zur Ionisierung von Ncam1 und zur Ausbildung von Hydrathüllen, die eine Interaktion blockieren können (Rutishauser 2008). Die Transfektion der membrangebundenen Proteine erfolgte in *CHO-K1*-Zellen, die Ncam1 polysialylieren können (Schober 2016). Die Synthese der löslichen Proteine erfolgte hingegen in *CHO-2A10* Zellen die aufgrund einer Mutation des *st8siaIV*-Gens keine Polysialinsäure bilden können (Eckhardt et al. 1995). Somit wurde Ncam1 in den gezeigten Overlay-Assays in beiden Formen eingesetzt: membrangebundenes, polysialyliertes Ncam1 und lösliches, nicht polysialyliertes Ncam1. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Bindungsverhalten zu Fgfr1a beobachtet werden. Demnach scheint polySia keine Auswirkungen auf die Interaktion von Ncam1b mit Fgfr1a bzw. Ncam1a mit Fgfr1a zu haben.

Glykosylierungen können auch das Bindungsverhalten von Fgfr1a beeinflussen. Die synthetisierten löslichen Fgfr1a-Proteine zeigen in Western-Blot-Analysen ein Molekulargewicht von 130 kDa statt 75 kDa (Abb. 2.2). Dies könnte durch (N)-Glykosylierungen in *CHO*-Zellen hervorgerufen werden (Duchesne et al. 2006). Diese Modifikation beeinflusst jedoch nur die Bindung von FGF2-HSPG, sodass keine hemmende Wirkung auf eine Interaktion mit Ncam1 erwartet wird (Duchesne et al. 2006). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Overlay-Assays bekräftigen die Vermutung, dass die Glykosylierung des Fgfr1a keine Auswirkungen auf die Bindung mit Ncam1 hat. Sowohl die membrangebundenen Fgfr1a-Isoformen als auch die löslichen Formen verhalten sich identisch zueinander.

## 4.2.1 Die Erkennungs-, Binde- und Interaktionsstelle von NCAM1 und FGFR1

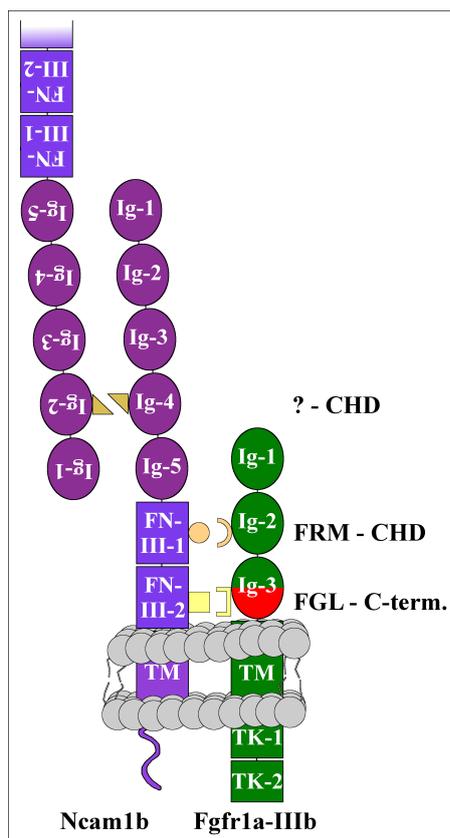


**Abbildung 4.1: NCAM1 und FGFR1 codieren mehrere Interaktionsstellen. A)** Die zweite Fibronectin-Domäne (FN) von NCAM1 exprimiert den *FG Loop* (FGL), der mit dem C-terminalen Bereich der Ig-3 Domäne des FGFR1 in Wechselwirkung tritt. **B)** Das *FGF receptor activation motif* (FRM) wird im Bereich der ersten FN-Domäne von NCAM1 exprimiert und interagiert mit der CHD-FGFR1. **C)** Die *CAM Homology Domain* (CHD) des FGFR1 befindet sich in der Ig-2 Domäne des Rezeptors. **D)** Die CHD von NCAM1 wird durch das VASE-Exon der Ig-4 Domäne codiert. Eine direkte FGFR1-Bindestelle für die CHD-NCAM1 ist nicht bekannt.

Die Bindungen der Ncam1-Paraloga an die Fgfr1a-Isoformen machen deutlich, dass das Exon 7 bei der Interaktion involviert ist und die Aminosäuresequenz dieses Exons die Affinität von Fgfr1a zu Ncam1b bzw. Ncam1a beeinflusst. Fehlt das Exon 7, erfolgt keine Wechselwirkung zwischen Ncam1 und Fgfr1a.

Die Bindedomäne, mit der NCAM1 an den C-terminalen Bereich der Ig-3 Domäne des FGFR1 bindet, liegt in der zweiten Fibronectin-Domäne (FN) und wird als *FG Loop* (FGL) bezeichnet (Abb. 4.2) (Kiselyov et al. 2003, Aonurm-Helm et al. 2010). Diese Aminosäure-Abfolge ist hoch konserviert und wird von Ncam1a und Ncam1b codiert (Abb. 4.1, A). Da beide Ncam1-Paraloga diese Domäne exprimieren, kann der *FG Loop* nicht für die unterschiedlichen Affinitäten von Ncam1a und Ncam1b verantwortlich sein. Jedoch kann der unterschiedliche C-terminale Bereich der Ig-3 Domäne des Fgfr1a verschieden stark durch die *FGL*-Domäne der Ncam1-Paraloga gebunden werden, sodass der *FG Loop* eine höhere Affinität zu Fgfr1a-IIIb als zu Fgfr1a-IIIc aufweist. Die unterschiedliche Affinität des *FG Loops* von NCAM1 zu den Isoformen FGFR1-IIIb und -IIIc wurde bereits für Säuger beschrieben und unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse (Christensen et al. 2011).

Neben dem *FG Loop* werden in Säugern zwei weitere Interaktionsstellen von NCAM1 und FGFR1 beschrieben. Dabei handelt es sich um das *FGF receptor activation motif* (FRM) und die *CAM Homology Domain* (CHD) (Williams et al. 1994a, Doherty und Walsh 1996, Kiselyov et al. 2003, Anderson et al. 2005). Die ebenfalls hoch konservierte FRM-Domäne wird im Bereich der ersten FN-Domäne von NCAM1 exprimiert (Kiselyov et al. 2003) und ist in der Aminosäuresequenz von Ncam1a und Ncam1b enthalten (Abb. 4.1, B). Die FRM-Domäne



**Abbildung 4.2: Modell zur Interaktion von Ncam1b und Fgfr1a-IIIb.**

Der *FG Loop* von Ncam1b interagiert mit dem C-terminalen Bereich der Ig-3 von Fgfr1a-IIIb. Fehlt dieser Bereich (Fgfr1a w/o Exon 7) oder weist eine andere Aminosäuresequenz auf (Fgfr1a-IIIc), so wird die Interaktion gehemmt bzw. abgeschwächt. Eine weitere Wechselwirkung kann durch die Domänen *FGF receptor activation motif* (FRM) und *CAM Homology Domain* (CHD) vermittelt werden. Eine *trans*-homophile Bindung von Ncam1b kann durch Bindung der CHD von Ncam1b die Ncam1b-Fgfr1a-IIIb Interaktion stabilisieren.

von NCAM1 tritt mit der CHD-Domäne des FGFR1 in Wechselwirkung (Abb. 4.2). Der Fgf-Rezeptor codiert die CHD im Bereich der Ig-2 Domäne (Williams et al. 1994a) und ist in den isolierten Splice-Varianten Fgfr1a-IIIb und -IIIc enthalten (Abb. 4.1, C). Da sowohl Ncam1a und Ncam1b als auch Fgfr1a-IIIb und -IIIc über die entsprechenden Domänen verfügen, kann die unterschiedliche Bindungsaffinität der Ncam1-Paraloga mit den Fgfr1a-Isoformen nicht auf der FRM-CHD-Interaktion beruhen.

Die CHD-Domäne wird nicht nur durch FGFR1 exprimiert, sondern ist mit einer ähnlichen Aminosäure-Abfolge auch in der Proteinsequenz von NCAM1 zu finden (Abb. 4.1, D). Dort wird sie durch das VASE-Exon der Ig-4 Domäne von NCAM1 codiert (Williams et al. 1994a). Obwohl FGFR1 und NCAM1 diese homologe Domäne exprimieren, ist eine CHD-CHD-Interaktion aufgrund sterischer Hinderung nicht möglich (Kiselyov et al. 2003, Anderson et al. 2005, Li et al. 2010, Christensen et al. 2011). Der CHD von NCAM1 steht also keine passende Interaktionsstelle des FGFR1 gegenüber. Es wird vielmehr angenommen, dass die CHD von NCAM1 durch homophile Interaktionen gebunden vorliegt und infolgedessen eine Bindung von FGFR1 begünstigt (Abb. 4.2) (Anderson et al. 2005, Kochoyan et al. 2008).

Ncam1b exprimiert das VASE-Exon und enthält folglich die CHD. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch für Ncam1a kein VASE-Exon und somit keine CHD gefunden werden (Abb. 4.1, D). Die fehlende CHD von Ncam1a könnte die verringerte Bindungsaffinität erklären.

Für die publizierten und hier aufgezeigten möglichen Interaktionsstellen konnte noch nicht zweifelsfrei bestimmt werden, ob diese tatsächlich alle gemeinsam an einer NCAM1-FGFR1-Interaktion beteiligt sind. Die Inhibierung einer einzelnen Bindestelle führt jedoch stets zum Abbruch des Neuritenwachstums oder zum Zelltod von Nervenzellen. Somit scheinen alle drei Bindestellen gemeinsam an der Interaktion beteiligt zu sein (Williams et al. 1994a, Kiselyov et al. 2003, Aonurm-Helm et al. 2010).

Ncam1b und die Fgfr1a-Isoformen erfüllen alle Kriterien für eine mögliche Interaktion. Die gezeigten Zellkulturexperimente erlauben jedoch nur eine homophile Bindung in *cis* und nicht in *trans*. Bei einer Interaktion in *cis* kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die CHD von Ncam1b involviert ist. Dennoch legen die Experimente nahe, dass *in vitro* homophil

gebundenes Ncam1b in *cis* ausreicht, um Fgfr1a zu binden. Ob dies auch zu einer effizienten Fgfr1a-Signaltransduktion führt, muss in künftigen Studien untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre die exogene Zugabe von Ncam1b-Protein, sodass eine homophile Interaktion in *trans* gewährleistet ist.

Die gezeigten Bead-Aggregations-Assays, die homophile Wechselwirkungen in *cis* und *trans* erlauben, deuten darauf hin, dass homophile Ncam1b-Interaktionen die Bindung von Fgfr1a begünstigen. Fgfr1a-IIIb interagiert mit Ncam1b und bildet innerhalb des Großclusters kleine homophile Kleincluster aus (Abb. 3.17). Diese homophile Wechselwirkung von Fgfr1a-IIIb wird bei einer Inkubation mit humanem Fc nicht beobachtet (Abb. 3.16). Es wäre denkbar, dass die durch homophile Ncam1b-Interaktionen gebildete *Zipper*-Struktur die Bindung von Fgfr1a-IIIb erleichtert.

Ncam1a bildet in den gezeigten Bead-Aggregations-Assays ebenfalls homophile Interaktionen in *cis* und *trans* aus, jedoch sind hier nur wenige Interaktionen mit Fgfr1a-IIIb zu sehen. Dies unterstützt die Vermutung, dass die fehlende CHD von Ncam1a zu einer anderen Konformation der *Zipper-Struktur* führt und somit die Bindungsaffinität für Fgfr1a-IIIb und -IIIc verringert wird (Abb. 3.17). Um in künftigen Experimenten einen vollständigen Eindruck von der Komplexität der Ncam1-Fgfr1a-Interaktion zu erhalten, müssen die einzelnen Bindestellen blockiert und die an einer homophilen Ncam1-Interaktion beteiligten Ig-Domänen in *cis* und *trans* bestimmt werden.

#### 4.2.2 Ncam1b reguliert die Expression des Chemokin-Rezeptors Cxcr7b

Muskelzellen entlang des horizontalen Myoseptums sezernieren homogen den Chemokinliganden Cxcl12a. Dieser wird durch die Chemokin-Rezeptoren Cxcr4b und Cxcr7b des Primordiums erkannt, internalisiert und verarbeitet. Cxcr4b, das im gesamten Primordium, jedoch verstärkt in der *Leading-Zone* exprimiert wird, bindet den Liganden und aktiviert eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade. In der *Trailing-Zone*, dem Expressionsort des Cxcr7b, wird Cxcl12a durch Cxcr7b gebunden, internalisiert und für den signallosen Abbau markiert. Dadurch entsteht im Bereich des Primordiums ein Cxcl12a-Gradient mit erhöhter Konzentration am caudalen Ende, in dessen Richtung das Primordium migriert (Donà et al. 2013).

*in situ* Hybridisierungen an uninjizierten Embryonen und *ncam1b*-Morphanten zeigen keine Expressions-Unterschiede von *cxcr4b* und *cxcl12a* (Abb. 3.18). *in situ* Hybridisierungen von *cxcr7b* führen hingegen zu einem deutlich anderen Ergebnis. *ncam1b*-Morphanten weisen im Vergleich mit uninjizierten Embryonen nur eine sehr schwache Expression des Rezeptors auf. Die CXC-vermittelte gerichtete Migration findet während vielen embryonalen Prozessen statt. Beispielsweise wird die Migration neuronaler Vorläuferzellen im Hippocampus durch Cxcl12a gesteuert und Cxcl12a durch Cxcr4b und Cxcr7b internalisiert (Abe et al. 2018). Dies trifft auch auf die Migration der Urkeimzellen und die Migration neutrophiler Granulozyten zu (Raz und Reichman-Fried 2006, Boldajipour et al. 2008, Elks et al. 2011). In all diesen Prozessen wird bei Verlust des Rezeptors Cxcr7b ein Migrationsstopp ausgelöst, der durch den Verlust der Polarität in den migrierenden Zellen entsteht.

Diese Situation spiegelt sich auch in den *ncam1b*-Morphanten wider. Durch die fehlende Expression von Cxcr7b wird kein Cxcl12a-Gradient ausgebildet, wodurch es zum Polaris-

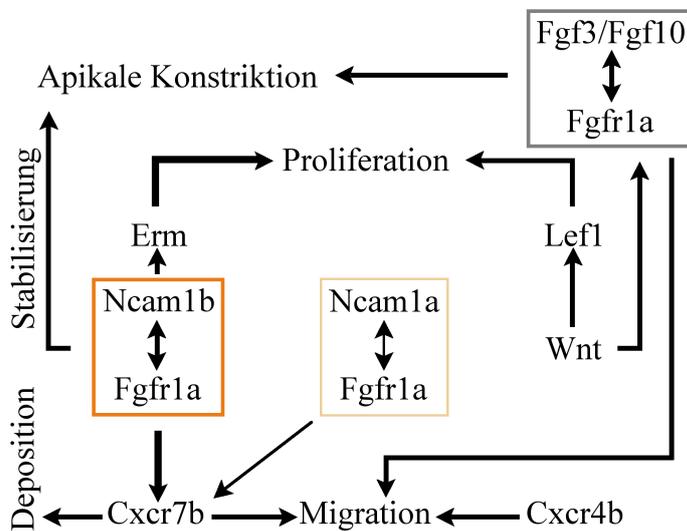
tionsverlust des Primordiums kommt. Dieser Effekt zeigt sich auch in *cxcr7b*-Mutanten, in denen eine gerichtete Migration unterbleibt (Donà et al. 2013). Die genaue Regulation der Cxcr7b-Expression ist noch nicht vollständig verstanden. Bislang ist bekannt, dass das Wnt-abhängige Hoxb8a die Expression von Cxcr7b hemmt (Breau et al. 2013). Die Aktivierung und Inhibierung des Cxcr7b muss jedoch neben Hoxb8a noch durch weitere Faktoren beeinflusst werden.

Der Antagonist von Wnt in der Entwicklung des pSLO ist Fgfr1a. Dieser kann in seiner Aktivität durch Wnt gehemmt werden, wodurch eine Expression von Cxcr7b ausbleibt. Studien, in denen die Fgfr1a-Aktivität durch SU5402 gehemmt wird, führen zu einem Verlust der Cxcr7b-Expression, da die Wnt-Aktivität und somit die Expression des Fgfr1a-Inhibitors Sef zunimmt (Aman und Piotrowski 2008). Eine Hemmung des Wnt-Signalweges durch Überexpression von Dkk führt hingegen zu einer Expression von Cxcr7b im gesamten Primordium, vermutlich aufgrund einer erweiterten Fgfr1a-Aktivität (Breau et al. 2013).

Diese Studien lassen vermuten, dass die Expression von Cxcr7b in Zusammenhang mit der Aktivität von Fgfr1a steht. Eine Hemmung des Wnt-Signalweges bedeutet, dass es zu keiner Expression der Fgf-Liganden Fgf3 und Fgf10 kommen kann. Wird die Expression von Cxcr7b tatsächlich durch Fgfr1a reguliert, so kann es sich dabei nicht um eine Fgf-vermittelte Fgfr1a-Signaltransduktion handeln. Als möglicher Aktivator der Cxcr7b-Expression käme eine Ncam1b-vermittelte Fgfr1a-Signalkaskade in Frage. Cxcr7b kommt wie Fgfr1a und Ncam1b in der *Trailing-Zone* von Primordien vor und könnte durch eine Bindung von Fgfr1a mit Ncam1b exprimiert werden.

Eine Hemmung des Wnt-Signalweges erhöht vermutlich die Expression von Fgfr1a in der *Leading-Zone*. Es wäre somit von Interesse, die Expression von Ncam1b bei gleichzeitiger Wnt-Inhibierung zu beobachten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Würde sich die Expression von Ncam1b in diesem Fall nicht ändern, müsste ein weiterer regulierender Faktor die Cxcr7b-Expression beeinflussen. Ein möglicher Kandidat hierfür wäre Ncam1a, das in den gezeigten Zellkulturexperimenten schwache Bindungen mit Fgfr1a-IIIb eingehen kann. Ncam1a, das im gesamten Primordium vorkommt, könnte bei einer Hemmung von Wnt in der *Leading-Zone* mit Fgfr1a interagieren und die Cxcr7b-Expression beeinflussen. Gleichzeitig könnte Ncam1a die Expression von Cxcr7b in der *Trailing-Zone* unterstützen. Diese Vermutung lässt sich aus der Beobachtung ableiten, dass Primordien auch in *ncam1b*-Morphanten eine, wenn auch stark verlangsamte, Migration zeigen. Da Primordien in *cxcr7b*-Mutanten keinerlei Migration aufweisen (Donà et al. 2013), wäre anzunehmen, dass die Migration in *ncam1b*-Morphanten ausbleibt, sofern Ncam1b als einziger Aktivator der Cxcr7b-Expression agiert.

### 4.2.3 Modell zum Mechanismus und zur Funktion der Ncam1-vermittelten Fgfr1a-Signalkaskade in der Entwicklung des pSLO



**Abbildung 4.3: Schema der Ncam1-Fgfr1a-Interaktion und deren Einfluss auf die Entwicklung des pSLO.** Die unterschiedlich dicken Pfeile symbolisieren den unterschiedlich starken Einfluss der verschiedenen Signalwege.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Ncam1b mit Fgfr1a interagiert, die Expression des Transkriptionsfaktors Erm reguliert und die Zellproliferation im Primordium beeinflusst (Abb. 4.3). Letztere wird ebenfalls durch den Wnt-abhängigen Transkriptionsfaktor Lef1 reguliert (Aman et al. 2011). Eine Hemmung von Wnt und somit von Lef1 führt jedoch nur zu einer leicht verminderten Zellproliferation (Aman et al. 2011). Eine Inhibierung von Fgfr1a führt hingegen zu einer stärkeren Reduktion der Zellteilungsrate. Daraus ergibt sich, dass der Fgfr1a-Signalweg

die Zellproliferation stärker beeinflusst als der Wnt-Signalweg, obwohl beide Signalzentren für eine effiziente Zellteilungsrate benötigt werden (Abb. 4.3). Da bei einer Hemmung von Wnt auch die Fgf-Liganden Fgf3 und Fgf10 gehemmt werden, die Proliferation jedoch erhalten bleibt, kann die Fgfr1a-vermittelte Zellteilung nicht durch Bindung der Fgf-Liganden erfolgen. Daraus lässt sich ableiten, dass die Ncam1b-vermittelte Fgfr1a-Signalkaskade (möglicherweise durch Expression von Erm) und das Wnt-abhängige Lef1 die Proliferation primordialer Zellen regulieren.

Die Morphologie des Primordiums und Zeitrafferaufnahmen von *ncam1b*-Morphanten deuten darauf hin, dass das verkleinerte Primordium nach wie vor in der Lage ist, einige wenige Protoneuromasten auszubilden. Lecaudey et al. (2008) und Ernst et al. (2012) zeigen, dass die Bildung von Protoneuromasten durch die Aktivität des Fgf-Fgfr1a-Signalweges eingeleitet wird. Eine Doppelmutation von *fgf3/fgf10* führt zu einem Verlust der apikalen Konstriktion, wodurch die Formierung von Protoneuromasten ausbleibt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass Ncam1b zwar die strukturelle Integrität und Funktionalität der abgesetzten Protoneuromasten beeinflusst, jedoch keinen Einfluss auf die apikale Konstriktion nimmt. Da in *ncam1b*-Morphanten die Protoneuromasten innerhalb weniger Stunden fragmentieren, kann Ncam1b in diesem Zusammenhang für mehrere Funktionen in Frage kommen: die Ncam1b-vermittelte Stabilität, die Ncam1b-Fgfr1a-vermittelte Zellproliferation in (Proto)-Neuromasten sowie deren Deposition und Differenzierung (s. hierzu auch 4.3.2).

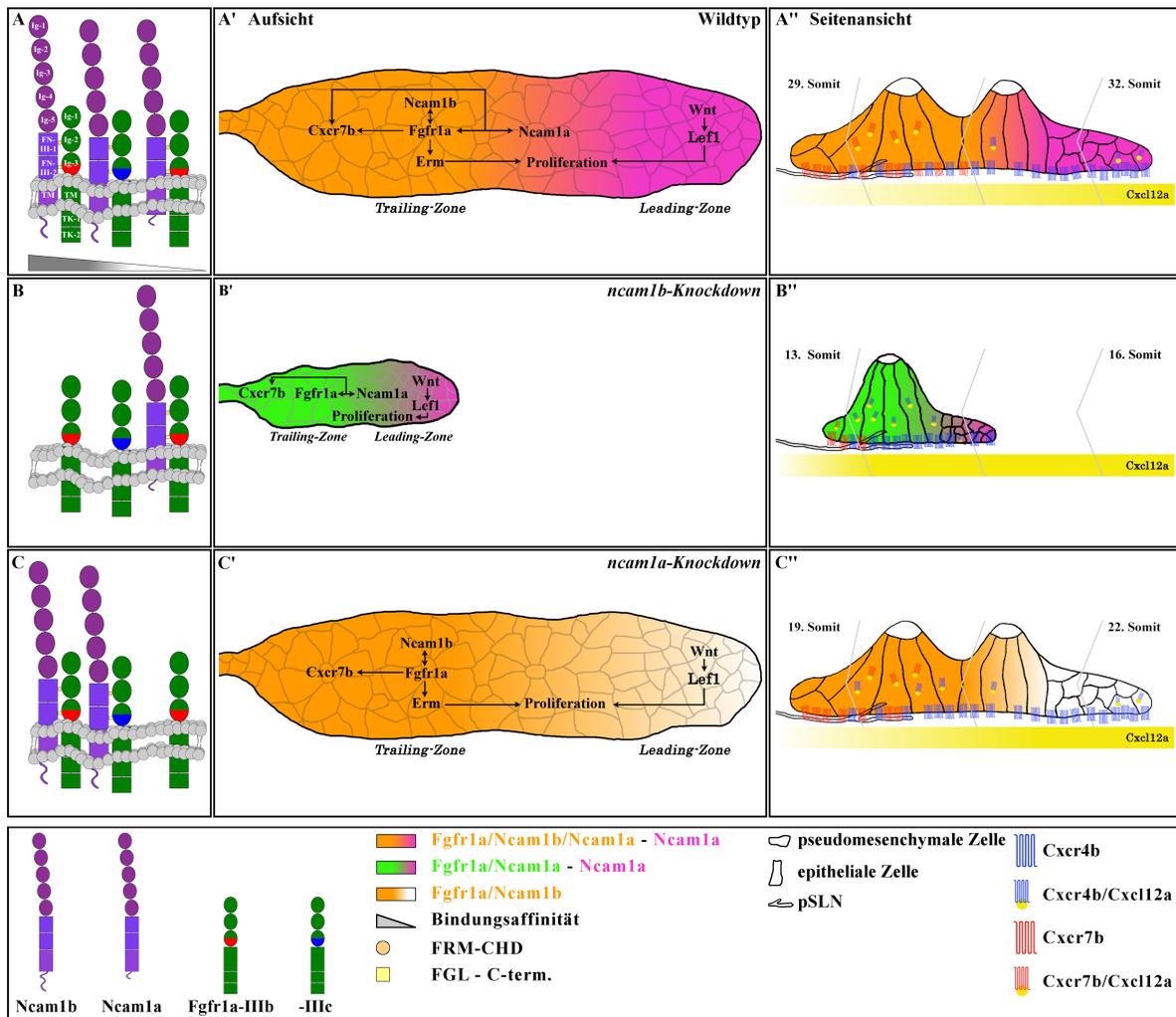
*ncam1b*-Morphanten weisen ein weiteres phänotypisches Merkmal auf: das Primordium ist nicht mehr in der Lage, entlang des horizontalen Myoseptums bis zur Schwanzspitze zu migrieren. Die Faktoren, welche die Expression von Cxcr7b regulieren, sind bislang noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Ncam1b die

Cxcr7b-Expression beeinflusst und dies vermutlich durch eine Ncam1b-vermittelte Fgfr1a-Aktivität erfolgt. Neben Ncam1b könnte auch eine Ncam1a-vermittelte Fgfr1a-Signalkaskade zur Expression von Cxcr7b führen. Breau et al. (2012) und Dalle Nogare et al. (2014) beschreiben, dass die Wnt-abhängige Expression der Liganden Fgf3/10 in der *Leading-Zone* eine anziehende Wirkung auf die Fgfr1a-exprimierenden Zellen der *Trailing-Zone* ausübt, wodurch das Primordium polarisiert wird. Demnach erhalten die Zellen der *Trailing-Zone* eine Präferenz in Richtung *Leading-Zone*, wodurch die Migration des Zellclusters in Richtung caudal gefördert wird. Diese chemo-attraktive Wirkung der Fgf-Liganden reicht jedoch nicht für eine vollständige Migration bis zur Schwanzspitze aus und wirkt somit nur unterstützend.

Die aus den Ergebnissen abgeleiteten Hypothesen zur Funktion von Ncam1b und Ncam1a während der Entwicklung des pSLO sind in Abbildung 4.4 zusammengefasst:

Ncam1b interagiert *in vitro* mit Fgfr1a. Die Affinität des *FG Loops* (FGL) von Ncam1b zur Splice-Variante Fgfr1a-IIIb ist dabei höher als zur Isoform Fgfr1a-IIIc (A). Ncam1a interagiert schwach und ausschließlich mit Fgfr1a-IIIb, was vermutlich auf die fehlende *CAM Homology Domain* (CHD) zurückzuführen ist. Das Primordium von Wildtyp-Embryonen wird in eine *Leading-* und eine *Trailing-Zone* unterteilt (A'). Ncam1a wird in beiden Zonen homogen exprimiert, wohingegen Ncam1b nur in der *Trailing-Zone* auftritt. Die *Leading-Zone* bildet etwa ein Drittel des Primordiums und wird durch den Wnt-Signalweg dominiert. Die rostral gelegene *Trailing-Zone* wird durch die Aktivität des Fgfr1a reguliert. Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ncam1b mit Fgfr1a interagiert und die Zellproliferation beeinflusst. Dabei könnte Erm, als Zielprotein des Ncam1b-vermittelten Fgfr1a-Signalweges, als Initiator der Proliferation dienen. Die Proliferation wird durch den Wnt-abhängigen Transkriptionsfaktor Lef1 unterstützt. Die Interaktion von Ncam1b mit Fgfr1a reguliert außerdem die Expression von Cxcr7b und nimmt damit direkten Einfluss auf die Migration des Primordiums. Dieses erreicht bei einer normalen Entwicklung den 32. Somiten in der Schwanzspitze (A''). Cxcr7b wird im Bereich der *Trailing-Zone* exprimiert, internalisiert dort den Liganden Cxcl12a und baut diesen signallos ab. Cxcr4b, das die höchste Konzentration im Bereich der *Leading-Zone* aufweist, bindet ebenfalls den Liganden und aktiviert eine G-Protein-gekoppelte Signalkaskade. Infolgedessen wird das Primordium polarisiert und wandert in Richtung der erhöhten Cxcl12a-Konzentration. Ncam1a kann in der *Trailing-Zone* schwache Wechselwirkungen mit Fgfr1a eingehen und unterstützt in diesem Modell die Expression von Cxcr7b.

Bei einem *Knockdown* von *ncam1b* kann nur noch Ncam1a mit Fgfr1a in Wechselwirkung treten (B). Das Primordium von *ncam1b*-Morphanten zeigt einen deutlich verkleinerten Phänotyp, kann jedoch noch in eine *Leading-* und eine *Trailing-Zone* unterteilt werden (B'). Die fehlende Interaktion von Ncam1b mit Fgfr1a führt zu einer ausbleibenden Expression von Erm und einer nicht vorhandenen Proliferation (B'). Die alleinige Expression von Lef1 reicht nicht aus, um die Zellteilung einzuleiten. Dies führt zu einer reduzierten Protoneuromastenbildung, wodurch Primordien von *ncam1b*-Morphanten maximal einen Protoneuromasten ausbilden können. Die Konzentration des Chemokinrezeptors Cxcr7b ist in *ncam1b*-Morphanten reduziert, wodurch die Polarisation schwächer ausgeprägt ist und die Migration langsamer verläuft. Infolgedessen stellt das Primordium die Migration zwischen dem 13. und 16. Somiten ein (B'').



**Abbildung 4.4: Modell zur Funktion der Ncam1-Paralogen in der Entwicklung des pSLO.** A-A'') Wildtyp. B-B'') *ncam1b*-Morphanten. C-C'') *ncam1a*-Morphanten. Die Ncam1b-vermittelte Fgfr1a-Signalkaskade in der *Trailing-Zone* beeinflusst die Zellproliferation durch Expression des Transkriptionsfaktors Erm und nimmt direkten Einfluss auf die Migration und Absetzung der Protoneuromasten durch Regulierung des Chemokinrezeptors Cxcr7b. Eine Ncam1a-vermittelte Fgfr1a-Signaltransduktion könnte die Cxcr7b-Expression unterstützen.

Die Ncam1a-vermittelte Expression von Cxcr7b reicht aus, um die Migration einzuleiten, jedoch nicht um sie zu vollenden.

Bei einer fehlenden Bindung von Ncam1a und Fgfr1a (C) zeigt das Primordium eine normale Größe und kann ebenfalls in eine *Leading-* und eine *Trailing-Zone* unterteilt werden (C'). *ncam1a*-Morphanten weisen eine normale Expression von Erm auf und zeigen keine Beeinträchtigung der Zellproliferation. Somit können die Primordien mehrere Protoneuromasten ausbilden (C''). Die Expression von Cxcr7b ist geringfügig reduziert, jedoch reicht die Ncam1b-vermittelte Cxcr7b-Expression aus, sodass das Primordium die Schwanzspitze zeitverzögert erreicht.

### 4.3 Ncam1b beeinflusst die Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen

Ncam1a und Ncam1b verfolgen während der Entwicklung des pSLO verschiedene Funktionen. Ncam1b ist an essentiellen Prozessen wie der Zellproliferation, Migration und Absetzung der Protoneuromasten beteiligt. Ncam1a scheint hingegen nur eine untergeordnete Funktion bei der Primordienmigration und der Absetzung der Protoneuromasten zu übernehmen. Die Differenzierung der Protoneuromasten zu motosensorischen Neuromasten ist ein weiterer Entwicklungsprozess, der den Fischen zeitlebens ermöglicht Umgebungsreize aufzunehmen und zu verarbeiten. Die sensorischen Haarsinneszellen der Neuromasten werden hierfür durch den lateralen Seitenliniennerv innerviert und Axone auf das auditorische System projiziert (Alexandre und Ghysen 1999). Die Funktion der Ncam1-Paraloge, insbesondere von Ncam1b, endet nicht mit der Ausdifferenzierung der Neuromasten. Reife Neuromasten oder solche die sich in der Regeneration befinden exprimieren Ncam1b.

#### 4.3.1 Differenzierte Neuromasten exprimieren Ncam1b, aber kein Ncam1a

Die Expression spezifischer (neuronaler) Proteine induziert die Differenzierung der drei Zelltypen der Neuromasten: Haarsinnes-, Stütz- und Mantelzellen. In den abgesetzten, unreifen Protoneuromasten werden die Ncam1-Paraloge in wenigen zentralen Zellen zu gleichen Teilen exprimiert (Dries 2014). In diesem Stadium befinden sich die Zellcluster noch im nahezu undifferenzierten Zustand, lediglich 1-2 Haarsinneszellvorläufer können detektiert werden. Innerhalb 72 Stunden nimmt die Differenzierung zu und zum Entwicklungszeitpunkt 5 dpf weisen die primären Neuromasten eine Vielzahl differenzierter Haarsinneszellen auf.

Ncam1a tritt 5 dpf nur noch schwach in Haarsinneszellen auf, wohingegen Ncam1b im gesamten Untersuchungszeitraum (5-8 dpf) in allen Haarsinnes- und einigen Stützzellen exprimiert wird (Abb. 3.20 und 3.22). Dies deutet ein weiteres Mal auf eine Subfunktionalisierung der Paraloge hin, da die Expression von Ncam1a abnimmt. Dies lässt vermuten, dass Ncam1a keine entscheidenden Funktionen in reifen Neuromasten übernimmt.

In der *Trailing-Zone* von Primordien befinden sich während der Migration stets 2-3 Protoneuromasten, wobei der reifste Protoneuromast am rostralen Ende liegt. Dieser beginnt bereits in der *Trailing-Zone* mit der Expression neuronaler Markerproteine wie Zath1 (Itoh und Chitnis 2001), Sox2 (Hernández et al. 2007) und n-Cadherin (Matsuda und Chitnis 2010) sowie des Chemokinrezeptors Cxcr7b (Aman und Piotrowski 2008). Die Expression dieser Proteine kennzeichnet den reifen Protoneuromast für dessen Absetzung entlang des Migrationsweges. Zu diesem Zeitpunkt exprimiert der Protoneuromast sowohl Ncam1a als auch Ncam1b (Dries 2014). Unter Berücksichtigung der Rolle von Ncam1b und vermutlich auch Ncam1a bei der Expression von Cxcr7b wäre es denkbar, dass die Ncam1-Paraloge in Protoneuromasten mit Fgfr1a interagieren, die Expression von Cxcr7b initiieren und den Protoneuromasten zur Absetzung kennzeichnen. Bereits abgesetzte Protoneuromasten exprimieren zunächst weiterhin Cxcr7b, Ncam1a und Ncam1b. Obwohl keine Langzeitstudien zur Expression von Cxcr7b vorliegen, ist anzunehmen, dass die Expression mit zunehmender Differenzierung der Zellen abnimmt und dies mit der Abnahme der Ncam1a-Expression korrelieren könnte.

Ncam1b, das bis zum Entwicklungstag 8 und darüber hinaus (nicht gezeigt) in den Neuromasten exprimiert wird, scheint nicht nur in der Entwicklung sondern auch im adulten pSLO von Bedeutung zu sein. Unabhängig vom Differenzierungsgrad exprimieren alle Haarsinneszellen eines Neuromasten zu jedem untersuchten Zeitpunkt Ncam1b. Die statistische Auswertung des Expressionsmusters von Ncam1b zeigt, dass die Anzahl der Ncam1b-exprimierenden Zellen höher liegt, als die Anzahl der Haarsinneszellen (Abb. 3.23). Daraus ergibt sich, dass alle Haarsinneszellen und zusätzlich 1-2 umliegende Stützzellen Ncam1b exprimieren. Dies lässt vermuten, dass Ncam1b an der Differenzierung von einer Stützzelle zur Haarsinneszelle beteiligt ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, die zeigen, dass der neuronale Differenzierungsprozess bereits in den Stützzellen eingeleitet wird, bevor spezifische Haarsinneszellmarker exprimiert werden (Hernández et al. 2007). Stützzellen, die sich unmittelbar vor der Differenzierung befinden, beginnen mit der Expression des neuronalen Stammzellmarkers Sox2 und kennzeichnen diese Zellen zum Verlassen des Zellzyklus und zur Differenzierung. Ncam1b, als neuronales Zelladhäsionsmolekül, wäre ein denkbarer Kandidat der ebenso wie Sox2 (Hernández et al. 2007), Zath1 (Itoh und Chitnis 2001) oder n-Cadherin (Matsuda und Chitnis 2010) als neuronales Molekül in den Stützzellen exprimiert wird und in diesen den Differenzierungsprozess einleitet. Doppelfärbungen von Sox2 und Ncam1b könnten zeigen, dass es sich bei den Ncam1b-exprimierenden Stützzellen um direkte Haarsinneszellen-Vorläufer handelt. Sox2 wird bereits in noch proliferierenden Stützzellen exprimiert. Als neuronales Markerprotein würde Ncam1b somit nicht in allen Sox2-exprimierenden Zellen erwartet werden, sondern nur in solchen, die den Zellzyklus bereits verlassen und als postmitotische Zelle einen neuronalen Charakter annehmen.

#### 4.3.2 Ncam1b wird in regenerierenden Neuromasten exprimiert

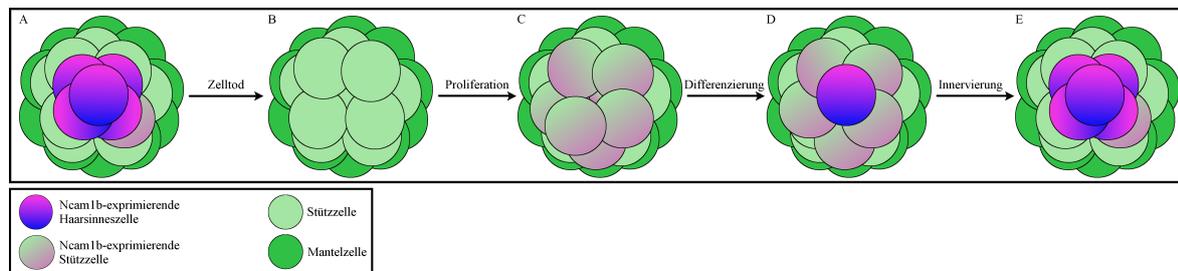
Die Haarsinneszellen der Neuromasten stellen aufgrund ihrer human-homologen Struktur und Funktion ein geeignetes Modellsystem dar, um die Regenerationsfähigkeit dieser Zellen in Fischen und Amphibien zu untersuchen. Bereits geringe Mengen an Schwermetallen oder Aminoglycoside reichen sowohl in Säugern als auch in Fischen aus, Haarsinneszellen abzutöten. Jedoch können Fische diese zeitlebens innerhalb weniger Stunden regenerieren.

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass Ncam1a mit Ende des fünften Entwicklungstages nicht mehr in Neuromasten exprimiert wird, überrascht es nicht, dass auch während der Regeneration keine Expression von Ncam1a zu sehen ist (Abb. 3.24). Die Regeneration wurde für 72 Stunden anhand der zunehmenden Differenzierung von Haarsinneszellen beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Ncam1a keine Funktion in der Differenzierung der Haarsinneszellen ausübt. Es erscheint daher immer wahrscheinlicher, dass die Expression von Ncam1a während der Absetzung der Protoneuromasten hauptsächlich mit der Regulierung und Expression von Cxcr7b in Zusammenhang steht.

Ganz anders verhält sich die Expression von Ncam1b. Wenige Stunden nach dem Absterben der Haarsinneszellen ist Ncam1b verstärkt in Stützzellen lokalisiert (Abb. 3.26). Nach der Regeneration wird Ncam1b, wie während der Entwicklung des pSLO, in Haarsinnes- und Stützzellen exprimiert. Das bestärkt die Vermutung, dass Ncam1b eine Rolle in der Differen-

zierung und Funktion von Haarsinneszellen spielt. Von besonderem Interesse ist hierbei, dass in den ersten 24 Stunden der Regeneration verstärkt Ncam1b-exprimierende Stützzellen vorliegen (Abb. 3.27), wodurch die Hypothese, dass Ncam1b für die Differenzierung notwendig ist, untermauert wird. Die Hemmung der lateralen Inhibierung durch DAPT unterstützt diese Vermutung ebenfalls. Die Inhibierung des Notch-Rezeptors führt dazu, dass die Regeneration der Haarsinneszellen schneller erfolgt, indem sich mehr Stützzellen differenzieren. In Folge der Hemmung des Notch-Rezeptors exprimieren mehr Stützzellen Ncam1b (Abb. 3.29). Dies bekräftigt ein weiteres Mal die Vermutung, dass Ncam1b für die Differenzierung einer Stützzelle in eine Haarsinneszelle benötigt wird. Ncam1b könnte hierbei unmittelbar vor der Differenzierung in der Stützzelle hochreguliert werden, diese zur Differenzierung kennzeichnen und die Expression weiterer neuronaler Marker induzieren.

#### 4.3.3 Modell zur Funktion von Ncam1b während der Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen



**Abbildung 4.5: Modell zur Funktion von Ncam1b während der Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen.** Ncam1b wird in Stützzellen exprimiert, die vor der Differenzierung zu Haarsinneszellen stehen. Die Expression von Ncam1b in den Haarsinneszellen wird zur Aufrechterhaltung des neuronalen Charakters der sensorischen Zellen benötigt und dient möglicherweise als Lenkungsmolekül für die auswachsenden Axone des posterioren Seitenliniennervs.

Die Subfunktionalisierung der Ncam1-Paraloge im Zebrafisch spiegelt sich nicht nur während der Entwicklung des pSLO wider, sondern auch in dessen differenziertem Zustand. Ncam1a wird in reifen Neuromasten nicht mehr exprimiert. Ncam1b kommt hingegen auch in differenzierten Haarsinnes- und Stützzellen vor. Auf Grundlage der hier beschriebenen Ergebnisse lässt sich ein Modell aufstellen, in dem Ncam1b bei der Differenzierung, Innervierung und Aufrechterhaltung des neuronalen Charakters der Haarsinneszellen eine Rolle spielt (Abb. 4.5). Reife Neuromasten exprimieren in allen Haarsinnes- und einigen wenigen Stützzellen Ncam1b (Abb. 4.5, A). Der vollständige Verlust der Haarsinneszellen führt zum kurzzeitigen Verlust von Ncam1b (B). Mit Beginn der Regeneration wird die Proliferation in den Stützzellen induziert und Ncam1b verstärkt exprimiert (C). Ncam1b-exprimierende Zellen differenzieren sich schließlich zu Haarsinneszellen (D), welche die Expression von Ncam1b aufrechterhalten (E). Im differenzierten Zustand könnte Ncam1b als Lenkungsmolekül für den Seitenliniennerv agieren, der die Haarsinneszellen innerviert. Axonale Wachstumskegel exprimieren auf ihrer Oberfläche FGFR1 (Walsh und Doherty 1997). Nachdem in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Ncam1b und Fgfr1a miteinander interagieren, wäre es denkbar, dass eine solche Interaktion auch im differenzierten System auftritt und auf diese Weise die Wegfindung der Axone des Seitenliniennervs beeinflusst.

## 4.4 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von Ncam1b in der Entwicklung, Differenzierung und Regeneration des posterioren Seitenlinienorgans (pSLO) aufgezeigt. Neben der Beschreibung phänotypischer Veränderungen nach einem *Knockdown* von *ncam1b* wurden molekulare Wechselwirkungen aufgezeigt, die diesen Prozessen unterliegen. Demnach interagiert Ncam1b mit den Splice-Varianten Fgfr1a-IIIb und -IIIc, nimmt infolgedessen Einfluss auf die Zellproliferation primordialer Zellen durch den Transkriptionsfaktor Erm und reguliert die Migration des Primordiums durch Steuerung des Chemokinrezeptors Cxcr7b. Die Ergebnisse zeigen außerdem eine deutliche Subfunktionalisierung der Ncam1-Paraloge, wonach Ncam1a nur eine schwache Interaktion mit Fgfr1a-IIIb aber nicht mit -IIIc eingeht und keinen Einfluss auf die Erm-Expression oder Zellproliferation nimmt. Die divergenten Funktionen der Ncam1-Paraloge spiegeln sich auch in der Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen wider, bei denen Ncam1b in hohem Maße beteiligt zu sein scheint.

Ncam1b zeigt eine unterschiedliche Bindungsaffinität zu den Splicevarianten Fgfr1a-IIIb und -IIIc. Es wäre denkbar, dass sich diese Interaktion nicht nur in der Affinität zueinander unterscheidet, sondern auch zu einem unterschiedlichen *Signalling* führt. Immunpräzipitationsstudien in Kombination mit Western-Blot-Analysen könnten Aufschluss darüber geben, welche Signale durch eine Interaktion von Ncam1b mit den unterschiedlichen Isoformen aktiviert werden. Im Fokus des Interesses stehen dabei pPLC $\gamma$ , pErk1/2 oder pScr, da diese die Zellproliferation und -adhäsion beeinflussen (Francavilla et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit werden für die Fgf-vermittelte und die Ncam1b-vermittelte Fgfr1a-Signalkaskade unterschiedliche funktionelle Ziele postuliert. Um sicherzustellen, dass die Fgf-vermittelte apikale Konstriktion in den *ncam1b-Morphanten* gewährleistet ist und dass diese unabhängig von Ncam1b reguliert wird, könnten Expressionstudien der Fgf-Fgfr1a Zielgene wie z.B. *pea3* oder *zo-1* durchgeführt werden.

Ncam1b wurde als ein neuronaler Marker identifiziert, der entscheidend in die Differenzierung und Regeneration von Haarsinneszellen eingreift. Es wäre von großem Interesse die Regeneration nach Verlust von Ncam1b zu untersuchen. Hierbei dürfte Ncam1b jedoch nur temporär inhibiert werden, da ansonsten eine gestörte Entwicklung des pSLO auftritt. Dient Ncam1b auch als Lenkungsmolekül für auswachsende Axone des Seitenliniennervs, so könnte ein Verlust von Ncam1b zu Wegfindungsfehler der Axone führen, die durch axonale Expressionsstudien dokumentiert werden könnten. Des Weiteren wären Langzeitstudien bis zum 21. Entwicklungstag von Bedeutung. Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung und Innervierung des pSLO vollständig abgeschlossen. Ob Ncam1b zeitlebens in den Neuromasten oder nur noch temporär nach dem Absterben von Haarsinneszellen exprimiert wird könnte Aufschluss darüber geben, ob Ncam1b nur für die Initiierung oder auch für die Aufrechterhaltung des neuronalen Charakters von Bedeutung ist.



## 5 Literaturverzeichnis

- Abe P., Wüst H. M., Arnold S. J., van de Pavert S. A., Stumm R., 2018**, CXCL12-mediated feedback from granule neurons regulates generation and positioning of new neurons in the dentate gyrus, *Glia*, PMID: 29537098
- Agarwala S., Duquesne S., Liu K., Boehm A., Grimm L., Link S., König S., Eimer S., Ronneberger O., Lecaudey V., 2015**, Amotl2a interacts with the Hippo effector Yap1 and the Wnt/ $\beta$ -catenin effector Lef1 to control tissue size in zebrafish, *eLIFE*, PMID: 26335201
- Akagi T., Kuure S., Uranishi K., Koide H., Costanzini F., Yokota T., 2015**, ETS-related Transcription Factors ETV4 and ETV5 Are Involved in Proliferation and Induction of Differentiation-associated Genes in Embryonic Stem (ES) Cells, *The Journal of Biological Chemistry*, 290:22460-22473, PMID: 26224636
- Albach C., Damoc E., Denzinger T., Schachner M., Przybylski M., Schmitz B., 2004**, Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378:1129-1135, PMID: 14658030
- Alexandre D., Ghysen A., 1999**, Somatotopy of the lateral line projection in larval zebrafish, *PNAS*, 96:7558-7562, PMID: 10377454
- Aman A., Piotrowski T., 2008**, Wnt/ $\beta$ -Catenin and Fgf Signaling Control Collective Cell Migration by Restricting Chemokine Receptor Expression, *Developmental Cell*, 15:749-761, PMID: 19000839
- Aman A., Nguyen M., Piotrowski T., 2011**, Wnt/ $\beta$ -catenin dependent cell proliferation underlies segmented lateral line morphogenesis, *Review, Developmental Biology*, 349:470-482, PMID: 20974120
- Aman A., Piotrowski T., 2011**, Cell-cell signaling interactions coordinate multiple cell behaviors that drive morphogenesis of the lateral line, *Cell Adhesion & Migration*, 5:499-508, PMID: 22274715
- Amoureux M.-C., Coulibaly B., Chinot O., Loundou A., Metellus P., Rougon G., Figarella-Branger D., 2010**, Polysialic Acid Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-NCAM) is an adverse prognosis factor in glioblastoma, and regulates olig2 expression in glioma cell lines, *Review, BMC Cancer*, 10:91, PMID: 20219118
- Anderson A. A., Kendal C. E., Garcia-Maya M., Kenny A. V., Morris-Triggs S. A., Wu T., Reynolds R., Hohenester E., Saffell J. L., 2005**, A peptide from the first fibronectin domain of NCAM acts as an inverse agonist and stimulates FGF receptor activation, neurite outgrowth and survival, *Journal of Neurochemistry*, 95:570-583, PMID: 16135080

- Aonurm-Helm A., Berezin V., Bock E., Zharkovsky A., 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, *Brain Research*, 1309:1-8, PMID: 19909731
- Armelin H. A., 1973**, Pituitary Extracts and Steroid Hormones in the Control of 3T3 Cell Growth, *PNAS*, 70:2702-2706, PMID: 4354860
- Atkins A. R., Osborne M. J., Lashuel H., A., Edelman G. M., Wright P. E., Cunningham B. A., Dyson H. J., 1999**, Association between the first two immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM, *FEBS Letters*, 451:162-168, PMID: 10371158
- Atkinson P. J., Huarcaya Najaroo E., Sayyid Z. N., Cheng A. G., 2015**, Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences, *The Company of Biologists*, 142:1561-1571, PMID: 25922522
- Babina I. S., Turner N. C., 2017**, Advances and challenges in targeting FGFR signalling in cancer, *Review, Nature*, 17:318-332, PMID: 28303906
- Baker C. V. H., Bronner-Fraser M., 2001**, Vertebrate Cranial Placodes I. Embryonic Induction, *Developmental Biology*, 232:1-61, PMID: 11254347
- Berghaus K., 2015**, Der Einfluss von Ncam1b auf die Entwicklung und Funktion des primären posterioren Seitenlinienprimordiums in *Danio rerio*, *Bachelorarbeit*, KIT
- Blaser H., Reichman-Fried M., Castanon I., Dumstrei K., Marlow F. L., Kawakami K., Solnica-Krezel L., Heisenberg C.-P., Raz E., 2006**, Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells: A Role for Myosin Contraction and Cytoplasmic Flow, *Developmental Cell*, 11:613-627, PMID: 17084355
- Boldajipour B., Mahabaleswar H., Kardash E., Reichman-Fried M., Blaser H., Minina S., Wilson D., Xu Q., Raz E., 2008**, Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration, *Cell*, 132:463-473, PMID: 18267076
- Bonfanti L., 2006**, PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis, *Review, Progress in Neurobiology*, 80:129-164, PMID: 17029752
- Bork P., Holm L., Sander C., 1994**, The Immunoglobulin Fold, Structural Classification, Sequence Patterns and Common Core, *Review, Journal of Molecular Biology*, 242:309-329, PMID: 7932691
- Breau M. A., Wilson D., Wilkinson D. G., Xu Q., 2012**, Chemokine and Fgf signalling act as opposing guidance cues in formation of the lateral line primordium, *Development*, 139:2246-2253, PMID: 22619392
- Breau M. A., Wilkinson D. G., Xu Q., 2013**, A Hox gene controls lateral line cell migration by regulating chemokine receptor expression downstream of Wnt signaling, *PNAS*, 110:16892-16897, PMID: 24082091

- Burns J. M., Summers B. C., Wang Y., Melikian A., Berahovich R., Miao Z., Penfold M. E. T., Sunshine M. J., Littman D. R., Kuo C. J., Wei K., McMaster B. E., Wright K., Howard M. C., Schall T. J., 2006, A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development, *The Journal of Experimental Medicine*, 203:2201-2213, PMID: 16940167
- Bussmann J., Raz E., 2015, Chemokine-guided cell migration and motility in zebrafish development, *Review, EMBO*, 34:1309-1318, PMID: 25762592
- Carrillo S. A., Anguita-Salinas C., Peña O. A., Morales R. A., Muñoz-Sánchez S., Muñoz-Montecinos C., Paredes-Zúñiga S., Tapia K., Allende M. L., 2016, Macrophage Recruitment Contributes to Regeneration of Mechanosensory Hair Cells in the Zebrafish Lateral Line, *Journal of Cellular Biochemistry*, 117:1880-1889, PMID: 26755079
- Chen A., Haines S., Maxson K., Akeson R. A., 1994, VASE Exon Expression Alters NCAM-Mediated Cell-Cell Interactions, *Journal of Neuroscience*, 38:483-492, PMID: 7815468
- Chen P., Zindy F., Abdala C., Liu F., Li X., Roussel M. F., Segil N., 2003, Progressive hearing loss in mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor Ink4d, *Nature Cell Biology*, 5:442-446, PMID: 12717441
- Christensen C., Berezin V., Bock E., 2011, Neural cell adhesion molecule differentially interacts with isoforms of the fibroblast growth factor receptor, *NeuroReport*, 22:727-732, PMID: 21876469
- Coombs S., Bleckmann H., Fay R. R., Popper A. N., 2013, *The Lateral Line System*, Springer, ISBN: 978-1-4614-8851-4 (ebook)
- Cunningham B. A., Hemperly J. J., Murray B. A., Prediger E. A., Brackenbury R., Edelman G. M., 1987, Neural Cell Adhesion Molecule: Structure, Immunoglobulin Like Domains, Cell Surface Modulation, and Alternative RNA Splicing, *Science*, 236:799-806, PMID: 3576199
- Dalle Nogare D., Somers K., Rao S., Matsuda M., Reichman-Fried M., Raz E., Chitnis A. B., 2014, Leading and trailing cells cooperate in collective migration of the posterior lateral line primordium, *The Company of Biologists*, 141:3188-3196, PMID: 25063456
- Dambly-Chaudière C., Cubedo N., Ghysen A., 2007, Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1, *BMC Developmental Biology*, 7:23, PMID: 17394634
- David N. B., Sapède D., Saint-Etienne L., Thisse C., Thisse B., Dambly-Chaudière C., Rosa F. M., Ghysen A., 2002, Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1, *PNAS*, 99:16297-16302, PMID: 12444253

- Denaxa M., Chan C.-H., Schachner M., Parnavelas J. G., Karagogeos D., 2001**, The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system, *Development*, 128:4635-4644, PMID: 11714688
- Dietzsch M., 2008**, Die Familie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle im Zebrafisch: Expressionsmuster, Funktion und Glykosylierung, *Dissertation*, Universität Karlsruhe
- Doherty P., Walsh F. S., 1996**, CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth, *Review, Molecular and Cellular Neuroscience*, 8:99-111, PMID: 8954625
- Donà E., Barry J. D., Valentin G., Quirin C., Khmelinskii A., Kunze A., Durdu S., Newton L. R., Fernandez-Minan A., Huber W., Knop M., Gilmour D., 2013**, Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient, *Nature*, 503:285-289, PMID: 24067609
- Dries R., 2014**, Neuronale Zelladhäsionsmoleküle und ihre Glycanmodifikationen in der Entwicklung des Seitenlinienorgans von *Danio rerio*, *Masterarbeit*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
- Duchesne L., Tissot B., Rudd T. R., Dell A., Fernig D. G., 2006**, N-Glycosylation of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Regulates Lignad and Heparan Sulfate Co-receptor Binding, *The Journal of Biological Chemistry*, 281:27178-27189, PMID: 16829530
- Durdu S., Iskar M., Revenu C., Schieber N., Kunze A., Bork P., Schwab Y., Gilmour D., 2014**, Luminal signalling links cell communication to tissue architecture during organogenesis, *Nature*, 515:120-124, PMID: 25337877
- Dyckgraaf S., 1933**, Untersuchungen über die Funktion der Seitenorgane an Fischen, Zoologisches Institut der Universität München
- Eckhardt M., Mühlenhoff M., Bethe A., Koopman J., Frosch M., Gerardy-Schahn R., 1995**, Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1, *Nature*, 373:715-718, PMID: 7854457
- Edelman G. M., Chuong C.-M., 1982**, Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice, *PNAS*, 79:7036-7040, PMID: 6960362
- Elks P. M., Loynes C. A., Renshaw S. A., 2011**, Measuring inflammatory cell migration in the zebrafish, *Methods in Molecular Biology*, 769:261-275, PMID: 21748682
- Ernst S., Liu K., Agarwala S., Moratscheck N., Ender Avci M., Dalle Nogare D., Chitnis A. B., Ronneberger O., Lecaudey V., 2012**, Shroom3 is required downstream of FGF signalling to mediate proneuromast assembly in zebrafish, *Development*, 139:4571-4581, PMID: 23136387
- Francavilla C., Cattaneo P., Berezin V., Bock E., Ami D., de Marco A., Christofori G., Cavallaro U., 2009**, The binding of NCAM to FGFR1 induces a specific cellular response mediated by receptor trafficking, *Journal of Cell Biology*, 187:1101-1116, PMID: 20038681

- 
- Galuska S. P., Rollenhagen M., Kaup M., Eggers K., Oltmann-Norden I., Schiff M., Hartmann M., Weinhold B., Hildebrandt H., Geyer R., Mühlhoff M., Geyer H., 2010**, Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain, *PNAS*, 107:10250-10255, PMID: 20479255
- Gamba L., Cubedo N., Lutfalla G., Ghysen A., Dambly-Chaudière C., 2010**, *lef1* Controls Patterning and Proliferation in the Posterior Lateral Line System of Zebrafish, *Developmental Dynamics*, 239:3163-3171, PMID: 20981829
- Gascon E., Vutskits L., Kiss J. Z., 2007**, Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: From synapses to integration of new neurons, *Brain Research Reviews*, 56:101-118, PMID: 17658613
- Gennarini G., Hirn M., Deagostini-Bazin H., Goridis C., 1984**, Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM, *European Journal of Biochemistry*, 142:65-73, PMID: 6745268
- Ghysen A., Dambly-Chaudière C., 2007**, The lateral line microcosmos, *Genes & Development*, 21:2118-2130, PMID: 17785522
- Gilmour D. T., Maischein H.-M., Nüsslein-Volhard C., 2002**, Migration and Function of a Glial Subtype in the Vertebrate Peripheral Nervous System, *Neuron*, 34:577-588, PMID: 12062041
- Gompel N., Cubedo N., Thisse C., Thisse B., Dambly-Chaudière C., Ghysen A., 2001**, Pattern formation in the lateral line of zebrafish, *Mechanisms of Development*, 105:69-77, PMID: 11429283
- Goodyear R. J., Legan P. K., Christiansen J. R., Xia B., Korchagina J., Gale J. E., Warchol M. E., Corwin J. T., Richardson G. P., 2010**, Identification of the Hair Cell Soma-1 Antigen, HCS-1 as Otoferlin, *JARO*, 11:573-586, PMID: 20809368
- Goo-Lee S., Huang M., Obholzer N. D., Sun S., Li W., Petrillo M., Dai P., Zhou Y., Cotanche D. A., Megason S. G., Li H., Chen Z.-Y., 2016**, Myc and Fgf Are Required for Zebrafish Neuromast Hair Cell Regeneration, *PLoS ONE*, 11:21 Seiten, PMID: 27351484
- Gower H. J., Barton C. H., Elsom V. L., Thompson J., Moore S. E., Dickson G., Walsh F. S., 1988**, Alternative Splicing Generates a Secreted Form of N-CAM in Muscle and Brain, *Cell*, 55:955-964, PMID: 3203385
- Grocott T., Tambalo M., Streit A., 2012**, The peripheral sensory nervous system in the vertebrate head: A gene regulatory perspective, *Developmental Biology*, 370:3-23, PMID: 22790010
- Groth C., Lardelli M., 2002**, The structure and function of vertebrate Fibroblast Growth Factor Receptor 1, *International Journal of Developmental Biology*, 46:393-400, PMID: 12141425

- Gupta S. K., Pillarisetti K., Thomas R. A., Aiyar N., 2001**, Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1 $\alpha$ : implications for development of selective CXCR4 antagonists, *Immunology Letters*, 78:29-34, PMID: 11470148
- Haas P., Gilmour D., 2006**, Chemokine Signaling Mediates Self-Organizing Tissue Migration in the Zebrafish Lateral Line, *Developmental Cell*, 10:673-680, PMID: 16678780
- Haines L., Neyt C., Gautier P., Keenan D. G., Bryson-Richardson R. J., Hollway G. E., Cole N. J., Currie P. D., 2004**, Met and Hgf signaling controls hypaxial muscle and lateral line development in the zebrafish, *Development*, 131:4857-4869, PMID: 15342468
- Harpaz Y., Chothia C., 1994**, Many of the Immunoglobulin Superfamily Domains in Cell Adhesion Molecules and Surface Receptors Belong to a New Structural Set Which is Close to That Containing Variable Domains, *Journal of Molecular Biology*, 238:528539, PMID: 8176743
- Harris J. A., Cheng A. G., Cunningham L. L., MacDonald G., Raible D. W., Rubel E. W., 2003**, Neomycin-Induced Hair Cell Death and Rapid Regeneration in the Lateral Line of Zebrafish (*Danio rerio*), *JARO*, 04:219-234, PMID: 12943374
- He H.-T. Barbet J., Chaix J.-C., Goridis C., 1986**, Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule, *The EMBO Journal*, 5:2489-2494, PMID: 3780668
- Heiland P. C., Griffith L. S., Lange R., Schachner M., Hertlein B., Traub O., Schmitz B., 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, *European Journal of Cell Biology*, 75:97-106, PMID: 9548367
- Heiny S., 2012**, Untersuchungen zur Funktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM während der Entwicklung des Seitenlinienorgans in *Danio rerio*, *Masterarbeit*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
- Hemperly J. J., Edelman G. M., Cunningham B. A., 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, *PNAS*, 83:9822-9826, PMID: 3467341
- Hernández P. P., Olivari F. A., Sarrazin A. F., Sandoval P. C., Allende M. L., 2007**, Regeneration in Zebrafish Lateral Line Neuromasts: Expression of the Neural Progenitor Cell Marker Sox2 and Proliferation-Dependent and -Independent Mechanisms of Hair Cell Renewal, *Developmental Neurobiology*, 67:637-654, PMID: 17443814

- 
- Hernández V. M., Hegeman D. J., Cui Q., Kelder D. A., Fiske M. P., Glajch K. E., Pitt J. E., Huang T. Y., Justice N. J., Chan C. S., 2015**, Parvalbumin<sup>+</sup> Neurons and Npas1<sup>+</sup> Neurons Are Distinct Neuron Classes in the Mouse External Globus Pallidus, *Journal of Neuroscience*, 35:11830-11847, PMID: 26311767
- Hinderlich S., Stäsche R., Zeitler R., Reutter W., 1997**, Purification and Characterization of UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase/N-Acetylmannosamine Kinase, *Journal of Biological Chemistry*, PMID: 9305887
- Hobbs R. M., Silva-Vargas V., Groves R., Watt F. M., 2004**, Expression of Activated MEK1 in Differentiating Epidermal Cells Is Sufficient to Generate Hyperproliferative and Inflammatory Skin Lesions, *Journal of Investigative Dermatology*, 123:503-515, PMID: 15304090
- Hofer B., 1908**, Studien über die Hautsinnesorgane der Fische - Die Funktion der Seitenorgane bei den Fischen, *Berichte der königlichen Bayerischen Biologischen Versuchstation München*, 1:115-164
- Horstkorte R., Schachner M., Magyar J. P., Vorherr T., Schmitz B., 1993**, The Fourth Immunoglobulin-like Domain of NCAM Contains a Carbohydrate Recognition Domain for Oligomannosidic Glycans Implicated in Association with L1 and Neurite Outgrowth, *Journal of Cell Biology*, PMID: 8509458
- Hudspeth A. J., 1989**, How the ear's works work, *Review, Nature*, 341:397-404, PMID: 2677742
- Huth M. E., Ricci A. J., Cheng A. G., 2011**, Mechanisms of Aminoglycoside Ototoxicity and Targets of Hair Cell Protection, *Review, International Journal of Otolaryngology*, 19 Seiten, PMID: 22121370
- Itoh M., Chitnis A. B. 2001**, Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts, *Mechanisms of Development*, 102:263-266, PMID: 11287207
- Jiang L., Romero-Carvajal A., Haug J. S., Seidel C. W., Piotrowski T., 2014**, Gene-expression analysis of hair cell regeneration in the zebrafish lateral line, *PNAS*, 111:1383-1392, PMID: 24706903
- Johnson D. E., Lu J., Chen H., Werner S., Williams L. T., 1991**, The Human Fibroblast Growth Factor Receptor Genes: a Common Structural Arrangement Underlies the Mechanisms for Generating Receptor Forms That Differ in Their Third Immunoglobulin Domain, *Molecular Cellular Biology*, 11:4627-4634, PMID: 1652059
- Johnson D. E., Williams L. T., 1992**, Structural and Functional Diversity in the FGF Receptor Multigene Family, *Advances in Cancer Research*, 60:1-41, PMID: 8417497
- Jørgensen O.S., Bock E., 1974**, Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis, *Journal of Neurochemistry*, 23:879-80, PMID: 4430927
- Kadmon G., Kowitz A., Altevogt P., Schachner M., 1990**, The Neural Cell Adhesion Molecule N-CAM Enhances L1-dependent Cell-Cell Interactions, *Journal of Cell Biology*, 110:193-208, PMID: 2295682

- Kauppinen J., Mäntyjärvi R., Katila M.-L., 1999**, *Mycobacterium malmoeense*-Specific Nested PCR Based on a Conserved Sequence Detected in Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints, *Journal of Clinical Microbiology*, 37:1454-1458, PMID: 10203504
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., Schilling T. F., 1995**, Stages of Embryonic Development of the Zebrafish, *Developmental Dynamics*, 203:253-310, PMID: 8589427
- Kiselyov V. V., Berezin V., Maar T. E., Soroka V., Edvardsen K., Schousboe A., Bock E., 1997**, The First Immunoglobulin-like Neural Cell adhesion Molecule (NCAM) Domain Is Involved in Double-reciprocal Interaction with the Second Immunoglobulin-like NCAM Domain and in Heparin Binding, *Journal of Biological Chemistry*, 272:10125-10134, PMID: 9092558
- Kiselyov V. V., Skladchikova G., Hinsby A. M., Jensen P. H., Kulahin N., Soroka V., Pedersen N., Tsetlin V., Poulsen F. M., Berezin V., Bock E., 2003**, Structural Basis for a Direct Interaction between FGFR1 and NCAM and Evidence for a Regulatory Role of ATP, *Structure*, 11:691-701, PMID: 12791257
- Kiselyov V. V., Soroka V., Berezin V., Bock E., 2005**, Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR, *Journal of Neurochemistry*, 94:1169-1179, PMID: 16045455
- Kochoyan A., Poulsen F. M., Berezin V., Bock E., Kiselyov V. V., 2008**, Structural basis for the activation of FGFR by NCAM, *Protein Science*, 17:1698-1705, PMID: 18593816
- Laemmli U., 1970**, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685, PMID: 5432063
- Langhauser M., Ustinova J., Rivera-Milla E., Ivannikov D., Seidl C., Slomka C., Finne J., Yoshihara Y., Bastmeyer M., Bentrop J., 2012**, Ncam1a and Ncam1b: Two carriers of polysialic acid with different functions in the developing zebrafish nervous system, *Glycobiology*, 22:196-209, PMID: 21890892
- Lecaudey V., Cakan-Akdogan G., Norton W. H. J., Gilmour D., 2008**, Dynamic Fgf signaling couples morphogenesis and migration in the zebrafish lateral line primordium, *Development*, 135:2695-2705, PMID: 18599504
- Ledent V., 2002**, Postembryonic development of the posterior lateral line in zebrafish, *Development*, 129:597-604, PMID: 11830561
- Lee P. L., Johnson D. E., Cousens L. S., Fried V. A., Williams L. T., 1989**, Purification and Complementary DNA Cloning of a Receptor for Basic Fibroblast Growth Factor, *Science*, 245:57-60, PMID: 2544996
- Leydig F., 1868**, Ueber Organe eines sechsten Sinnes: zugleich als Beitrag zur Kenntniss des feineren Baues der Haut bei Amphibien und Reptilien, Druck von Blochmann & Sohn, Signatur: 8229634 4 Zool. 221 sh 8229634 4 Zool. 221 sh

- 
- Li S., Bock E., Berezin V., 2010**, Neuritogenic and Neuroprotective Properties of Peptide Agonists of the Fibroblast Growth Factor Receptor, *International Journal of Molecular Sciences*, 11:2291-2305, PMID: 20640153
- Little E. B., Edelmann G. M., Cunningham B. A., 1998**, Palmitoylation of the Cytoplasmic Domain of the Neural Cell Adhesion Molecule N-CAM Serves as an Anchor to Cellular Membranes, *Cell Adhesion and Communication*, 6:415-430, PMID: 10223357
- Liu Y., Jiang H., Crawford H. C., Hogan B. L. M., 2003** Role for ETS domain transcription factors Pea3/Erm in mouse lung development, *Developmental Biology*, 261:10-24, PMID: 12941618
- López-Schier H., Hudspeth A. J., 2006**, A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells, *PNAS*, 103:18615-18620, PMID: 17124170
- Löwenheim H., Furness D. N., Kil J., Zinn C., Gültig K., Fero M. L., Frost D., Gummer A. W. Roberts J. M., Rubel E. W., Hackney C. M., Zenner H.-P., 1999**, Gene disruption of p27<sup>Kip1</sup> allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of Corti, *PNAS*, 96:4084-4088, PMID: 10097167
- Lush M., Piotrowski T., 2014**, ErbB expressing Schwann cells control lateral line progenitor cells via non-cell-autonomous regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin, *eLIFE*, 27 Seiten, PMID: 24642408
- Mackie K., Sorkin B. C., Nairn A. C., Greengard P., Edelmann G. M., Cunningham B. A., 1989**, Identification of Two Protein Kinases That Phosphorylate the Neural Cell-Adhesion Molecule, N-CAM, *Journal of Neuroscience*, 9:1883-1896, PMID: 2542481
- Malhotra J. D., Tsiotra P., Karagogeos D., Hortsch M., 1998**, Cis-activation of L1-mediated Ankyrin Recruitment by TAG-1 Homophilic Cell Adhesion, *Journal of Biological Chemistry*, 273:33354-33359, PMID: 9837910
- Marx M., Rivera-Milla E., Stummeyer K., Gerardy-Schahn R., Bastmeyer M., 2007**, Divergent evolution of the vertebrate polysialyltransferase Stx and Pst genes revealed by fish-to-mammal comparison, *Developmental Biology*, 306:560-571, PMID: 17462622
- Matsuda M., Chitnis A. B., 2010**, Atoh1a expression must be restricted by Notch signaling for effective morphogenesis of the posterior lateral line primordium in zebrafish, *Development*, 137:3477-3487, PMID: 20876657
- Maurer M. F., Garrigues U., Jaspers S. R., Meengs B., Rixon M. W., Stevens B. L., Lewis K. B., Julien S. H., Bukowski T. R., Wolf A. C., Hamacher N. B., Snively M., Dillon S. R., 2012**, Generation and characterization of human anti-human IL-21 neutralizing monoclonal antibodies, *mAbs*, 4:69-83, PMID: 22327431
- Metcalfe W. K., Kimmel C. B., Schabtach E., 1985**, Anatomy of the Posterior Lateral Line System in Young Larvae of the Zebrafish, *The Journal of Comparative Neurology*, 233:377-389, PMID: 3980776

- Milev P., Maurel P., Häring M., Margolis R. K., Margolis R. U., 1996, Tag-1/Axonin-1 Is a High-affinity Ligand of Neurocan, Phosphacan/Protein-tyrosine Phosphatase- $\xi/\beta$ , and N-CAM, *Journal of Biological Chemistry*, 271:15716-15723, PMID: 8663515
- Mizuno T., Kawasaki M., Nakahira M., Kagamiyama H., Kikuchi Y., Okamoto H., Mori K., Yoshihara Y., 2001, Molecular Diversity in Zebrafish NCAM Family: Three Members with Different VASE Usage and Distinct Localization, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18:119-130, PMID: 11461158
- Naumann U., Cameroni E., Pruenster M., Mahabaleshwar H., Raz E., Zerwes G., Rot A., Thelen M., 2010, CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11, *PLoS ONE*, 11:5 Seiten, PMID: 20161793
- Nechiporuk A., Raible D. W., 2008, FGF-Dependent Mechanosensory Organ Patterning in Zebrafish, *Science*, 320:1774-1777, PMID: 18583612
- Nikaido M., Navajas Acedo J., Hatta K., Piotrowski T., 2017, Retinoic acid is required and Fgf, Wnt, and Bmp signaling inhibit posterior lateral line placode induction in zebrafish, *Developmental Biology*, 431:215-225, PMID: 28923486
- Oh S., Shin S., Janknecht R., 2012, ETV1, 4 and 5: An Oncogenic Subfamily of ETS Transcription Factors, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826:1-12, PMID: 22425584
- Ornitz D. M., Itoh N., 2015, The Fibroblast Growth Factor Signaling pathway, *Review, WIREs Developmental Biology*, 4:215-266, PMID: 25772309
- Paschke K. A., Lottspeich F., Stuermer C. A. O., 1992, Neurolin, a Cell Surface Glycoprotein on Growing Retinal axons in the Goldfish Visual System, Is Reexpressed during Retinal Axonal Regeneration, *Journal of Cell Biology*, 117:863-875, PMID: 1577862
- Pickles J. O., Corey D. P., 1992, Mechano-electrical transduction by hair cells, *Trends Neuroscience*, 15:254-259, PMID: 1381121
- Pinto-Teixeira F., Viader-Llargués O., Torres-Mejía E., Turan M., González-Gualda E., Pola-Morell L., López-Schier H., 2015, Inexhaustible hair-cell regeneration in young and aged zebrafish, *The Company of Biologist*, 4:903-909, PMID: 26002931
- Pujol-Matí J., López-Schier H., 2013, Developmental and architectural principles of the lateral-line neural map, *Frontiers in Neural Circuits*, 7:9 Seiten, PMID: 23532704
- Raible F., Brand M., 2001, Tight transcriptional control of the ETS domain factors Erm and Pea3 by Fgf signaling during early zebrafish development, *Mechanisms of Development*, 107:105-117, PMID: 11520667
- Ranheim T. S., Edelman G. M., Cunningham B. A., 1996, Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains, *PNAS*, 93:4071-4075, PMID: 8633018
- Rao Y., Wu X.-F., Gariépy J., Rutishauser U., Siu C.-H., 1992, Identification of a Peptide Sequence Involved in Homophilic Binding in the Neural Cell Adhesion Molecule NCAM, *Journal of Cell Biology*, 118:937-949, PMID: 1380002

- 
- Raz E., Reichman-Fried M., 2006**, Attraction rules: germ cell migration in zebrafish, *Current Opinion in Genetics & Development*, 16:355-359, PMID: 16806897
- Roehl H., Nüsslein-Volhard C., 2001**, Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling, *Current Biology*, 11:503-507, PMID: 11413000
- Romero-Carvajal A., Navajas Acedo J., Jiang L., Kozlovskaja-Gumbriene A., Alexander R., Li H., Piotrowski T., 2015**, Regeneration of Sensory Hair Cells Requires Localized Interactions between the Notch and Wnt Pathways, *Cell Press*, 34:267-282, PMID: 26190147
- Rutishauser U., Hoffman S., Edelman G. M., 1982**, Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue, *PNAS*, 79:685-689, PMID: 6952220
- Rutishauser U., 2008**, Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system, *Review, Nature Review Neuroscience*, 9:26-35, PMID: 18059411
- Saffell J. L., Walsh F. S., Doherty P., 1994**, Expression of NCAM Containing VASE in Neurons Can Account for a Developmental Loss in Their Neurite Outgrowth Response to NCAM in a Cellular Substratum, *Journal of Cell Biology*, 125:427-436, PMID: 8163558
- Santos F., MacDonald G., Rubel E. W., Raible D. W., 2006**, Lateral line hair cell maturation is a determinant of aminoglycoside susceptibility in zebrafish (*Danio rerio*), *Hearing Research*, 213:25-33, PMID: 16459035
- Sapède D., Gompel N., Dambly-Chaudière C., Ghysen A., 2002**, Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line, *Development*, 129:605-615, PMID: 11830562
- Sarrazin A. F., Nuñez V. A., Sapède D., Tassin V., Dambly-Chaudière C., Ghysen A., 2010**, Origin and Early Development of the Posterior Lateral Line System of Zebrafish, *Journal of Neuroscience*, 30:8234-8244, PMID: 20554875
- Schnaar R. L., Gerardy-Schahn R., Hildebrandt H., 2014**, Sialic acids in the brain: Gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration, *Physiological Reviews*, 94:461-518, PMID: 24692354
- Schober M., 2016**, Neuronale Zellerkennungsmoleküle: Interaktionen und Polysialylierung in der motoneuronalen Entwicklung des Zebrafischs, *Dissertation*, Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
- Scholpp S., Groth C., Lohs C., Lardelli M., Brand M., 2004**, Zebrafish *fgfr1* is a member of the *fgf8* synexpression group and is required for *fgf8* signalling at the midbrain-hindbrain boundary, *Development Genes and Evolution*, 214:285-295, PMID: 15221377
- Small S. J., Shull G. E., Santoni M.-J., Akeson R., 1987**, Identification of a cDNA Clone That Contains the Complete Coding Sequence for a 140-kD Rat NCAM Polypeptide, *Journal of Cell Biology*, 105:2335-2345, PMID: 3680385
- Small S. J., Haines S. L., Akeson R. A., 1988**, Polypeptide Variation in an N-CAM Extracellular Immunoglobulin-like Fold is Developmentally Regulated through Alternative Splicing, *Neuron*, 1:1007-1017, PMID: 2483093

- Soroka V., Kolkova K., Kastrup J. S., Diederichs K., Breed J., Kiselyov V. V. Poulsen F. M., Larsen I. K., Welte W., Berezin V., Bock E., Kasper C., 2003**, Structure and Interactions of NCAM Ig1-2-3 Suggest a Novel Zipper Mechanism for Homophilic Adhesion, *Structure*, 10:1291-1301, PMID: 14527396
- Stenonis N., 1664**, De muscalis et glandulis observationum specimen cum epistolisduabus anatomicis; de anatome rajae (zitiert durch Leydig 1868)
- Stone J., Cotanche D. A., 2007**, Hair cell regeneration in the avian auditory epithelium, *Review, The International Journal of Developmental Biology*, 51:633-647, PMID: 17891722
- Storms S. D., Anvekar V. M., Adams L. D., Murray B. A., 1996**, Heterophilic NCAM-Mediated Cell Adhesion to Proteoglycans from Chick Embryonic Brain Membranes, *Experimental Cell Research*, 223:385-394, PMID: 8601415
- Storms S. D., Rutishauser U., 1998**, A Role for Polysialic Acid in Neural Cell Adhesion Molecule Heterophilic Binding to Proteoglycans, *Journal of Biological Chemistry*, 273:27124-27129, PMID: 9765230
- Summerton J., Weller D., 1997**, Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties, *Review, Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7:187-195, PMID: 9212909
- Thiery J.-P., Brackenbury R., Rutishauser U., Edelman G. M., 1977**, Adhesion among Neural Cells of the Chick Embryo II. Purification and Characterization of a Cell Adhesion Molecule from Neural Retina, *The Journal of Biological Chemistry*, 252:6841-6845, PMID: 893446
- Valdivia L. E., Young R. M., Hawkins T. A., Stickney H. L., Cavodeassi F. Schwarz Q., Pullin L. M., Villegas R., Moro E., Argenton F., Allende M. L., Wilson S. W., 2011**, Lef1-dependent Wnt/ $\beta$ -catenin signalling drives the proliferative engine that maintains tissue homeostasis during lateral line development, *Development*, 138:3931-3941, PMID: 21862557
- Vandepoele K., De Vos W., Taylor J. S., Meyer A., Van de Peer Y., 2003**, Major events in the genome evolution of vertebrates: Paraneome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates, *PNAS*, 101:1638-1643, PMID: 14757817
- Venero Galanternik M. V., Kramer K. L., Piotrowski T., 2015**, Heparan Sulfate Proteoglycans Regulate Fgf Signaling and Cell Polarity during Collective Cell Migration, *Cell Reports*, 10:414-428, PMID: 25600875
- Wai Wong C., Dye D. E., Coombe D. R., 2011**, The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis, *International Journal of Cell Biology*, 2012:9 Seiten, PMID: 22272201
- Walmod P. S., Kolkova K., Berezin V., Bock E., 2004**, Zippers Make Signal: NCAM-mediated Molecular Interactions and Signal Transduction, *Review, Neurochemical Research*, 29:2015-2035, PMID: 15662836

- 
- Walsh F. S., Doherty P., 1997**, Neural Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily: Role in Axon Growth and Guidance, *Review, Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 13:425-456, PMID: 9442880
- Wibowo I., Pinto-Teixeira F., Satou C., Higashijima S., López-Schier H., 2011**, Compartmentalized Notch signaling sustains epithelial mirror symmetry, *Development*, 138:1143-1152, PMID: 21343366
- Wiedemann M., Trueb B., 2000**, Characterization of a Novel Protein (FGFRL1) from Human Cartilage Related to FGF Receptors, *Genomics*, 69:275-279, PMID: 11031111
- Williams E. J., Doherty P., Turner G., Reid R. A., Hemperly J. J., Walsh F. S., 1992**, Calcium Influx into Neurons Can Solely Account for Cell Contact-dependent Neurite Outgrowth Stimulated by Transfected L1, *Journal of Cell Biology*, 119:883-892, PMID: 1429842
- Williams E. J., Furness J., Walsh F. S., 1994a**, Activation of the FGF Receptor Underlies Neurite Outgrowth Stimulated by L1, N-CAM, and N-Cadherin, *Neuron*, 13:583-594, PMID: 7917292
- Williams E. J., Walsh F. S., Doherty P., 1994b**, The Production of Arachidonic Acid Can Account for Calcium Channel activation in the Second Messenger Pathway Underlying Neurite Outgrowth Stimulated by NCAM, N-Cadherin, and L1, *Journal of Neurochemistry*, PMID: 8113807
- Williams E. J., Furness J., Walsh F. S., Doherty P., 1994c**, Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF, *Development*, 120:1685-1693, PMID: 8050374
- Wong J. M. Y., Kusdra L., Collins K., 2002**, Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage, *Nature Cell Biology*, 4:731-736, PMID: 12198499
- Wong C. W., Dye D. E., Coombe D. R., 2011**, The Role of Immunoglobulin Superfamily Cell Adhesion Molecules in Cancer Metastasis, *Review, International Journal of Cell Biology*, 9 Seiten, PMID: 22272201
- Wu Z. L., Zhang L., Yabe T., Kuberant B., Beeler D. L., Love A., Rosenberg R. D., 2003**, The Involvement of Heparan Sulfate (HS) in FGF1/FGFR1 Signaling Complex, *Journal of Biological Chemistry*, 278:17121-17129, PMID: 12604602
- Yang X., Steinberg F., Zhuang L., Bessey R., Trueb B., 2016**, Receptor FGFRL1 does not promote cell proliferation but induces cell adhesion, *Journal of Molecular Medicine*, 38:30-38, PMID: 27220341
- Yayon A., Klagsbrun M., Esko J. D., Leder P., Ornitz D. M., 1991**, Cell Surface, Heparin-like Molecules Are Required for Binding of Basic Fibroblast Growth Factor to Its High Affinity Receptor, *Cell*, 64:841-848, PMID: 1847668

- Yu P., Wilhelm K., Dubrac A., Tung J. K., Alves T. C., Fang J. S., Xie Y., Zhu J., Chen Z., De Smet F., Zhang J., Jin S.-W., Sun L., Sun H., Kibbey R. G., Hirschi K. K., Hay N., Carmeliet P., Chittenden T. W., Eichmann A., Potente M., Simons M., 2017**, FGF-dependent metabolic control of vascular development, *Nature*, 545:224-228, PMID: 28467822
- Yuan C. J., Quioco J. M. D., Kim A., Wee S., Mandyam C. D., 2011**, Extended access methamphetamine decreases immature neurons in the hippocampus which results from loss and altered development of neural progenitors without altered dynamics of the S-phase of the cell cycle, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 100:98-108, PMID: 21855565
- Zhang X., Mernaugh G., Yang D.-H., Gewin L., Srichai M. B., Harris R. C., Iturregui J. M., Melson R. D., Kohan D. E., Abrahamson D., Fässler R., Yurchenco P., Pozzi A., Zent R., 2009**,  $\beta 1$  integrin is necessary for ureteric bud branching morphogenesis and maintenance of collecting duct structural integrity, *Development and Disease*, 136:3357-3366, PMID: 19710172

## Danksagung

Abschließend möchte ich all denjenigen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Prof. Martin Bastmeyer danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut anzufertigen. Das entgegengebrachte Vertrauen und die damit verbundenen Freiheiten ermöglichten es mir, eigene Ideen zu entwickeln und Projekte selbstständig zu gestalten.

Prof. Véronique Orian-Rousseau danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein größter Dank gilt Dr. Joachim Bentrop. Danke für die stetige Unterstützung und Förderung meines wissenschaftlichen Denkens und Handelns. Die vertrauensvolle Basis sowie Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Kerstin Weber danke ich für eine helfende Hand im Labor und das stetige Interesse am Fortschritt meiner Arbeit.

Dr. Franco Weth danke ich für viele zielführende Ratschläge und anregende Diskussionen.

Meinen Arbeits- und insbesondere Bürokollegen danke ich für eine tolle Atmosphäre und die immer tatkräftige Unterstützung.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Tatjana Piotrowski danke ich für die unkomplizierte und schnelle Bereitstellung der Plasmide für Cxcr7b und Cxcl12a/Sdf1a.

Der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Meinen Freunden, insbesondere Frédérique Graf und Christine Müller, danke ich für die moralische Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern Gabriele und Hans Dries sowie meinem Bruder Manuel Dries danken, ohne deren liebevolle und tatkräftige Unterstützung das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

