

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin

Forschungsgruppe Entwicklungsneurobiologie

Leiter: Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

**Funktionelle Analyse krankheits - assoziierter Mutationen  
von L1 CAM  
und  
Charakterisierung eines neuen Mitglieds der  
Immunoglobulinsuperfamilie**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Michael Schäfer**

aus Marburg

eingereicht beim Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

Berlin, im Mai 2004

**Gutachter: Prof. Dr. F.G. Rathjen  
Prof. Dr. R. Nitsch**

**Disputation am: 01.07.2004**

# Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Axonale Wegfindung	2
1.2.	Synaptogenese	3
1.3.	Regeneration im adulten ZNS	5
1.4.	L1 CAM und Neurotractin	7
1.5.	L1 CAM	7
1.6.	L1-Mutationen verursachen neurologische Defekte im Menschen	8
1.7.	Molekularbiologie der Mutationen	9
1.8.	Bindungspartner von L1	10
1.9.	Neurotractin	12
1.10.	Funktion und Verteilung von Proteinen der IgLON-Familie	12
1.11.	Subzelluläre Verteilung von IgLON-Proteinen	13
1.12.	Aufgabenstellung	15
2.	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	17
2.1.	Material	17
2.1.1.	Chemikalien	17
2.1.2.	Enzyme	17
2.1.3.	Oligonukleotide	17
2.1.4.	PCR	18
2.1.5.	Plasmide	18
2.1.6.	Bakterienstämme	18
2.1.7.	DNA-Banken	18
2.1.8.	Antikörper	18
2.1.9.	Tiere, Gewebematerial und Zellen:	19
2.1.10.	Zellkultur	19
2.2.	Methoden	19
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1.1.	Kompetente Bakterien, Ligation und Transformation	19
2.2.1.2.	Plasmid-DNA Präparation	20
2.2.1.3.	BAC-DNA Präparation	20
2.2.1.4.	DNA-Sequenzierung	20
2.2.1.5.	PCR	20

2.2.1.6.	Isolierung von DNA-Fragmenten	20
2.2.1.7.	Isolierung genomischer DNA	20
2.2.1.8.	Southern Blot Analyse	21
2.2.2	<b>Biochemische Methoden und immunologische Methoden</b>	21
2.2.2.1.	Proteinexpression in Bakterien	21
2.2.2.2.	Proteinexpression in eukaryontischen Zellen	21
2.2.2.3.	SDS-PAGE und Western Blot Analyse	22
2.2.2.4.	Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose 4B	23
2.2.2.5.	Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern	23
2.2.2.6.	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkulturen und Gewebeproben	23
2.2.2.7.	Enzymatische Deglykosylierung von Proteinen	23
2.2.2.8.	Enzymatische Abspaltung des GPI-Ankers	24
2.2.2.9.	Präparation von Membranfraktionen aus CHO Zellen	24
2.2.2.10.	<b>Affinitätsreinigung von NgCAM aus Plasmamembranen von adultem Hühnerhirn</b>	25
2.2.2.11.	Herstellung von subzellulären Fraktionen aus dem Mausgehirn	25
2.2.3.	<b>Zellkulturtechniken</b>	27
2.2.3.1.	Präparation und Kultivierung primärer Neuronen	27
2.2.3.2.	Herstellung stabil transfizierter CHO Zellen	27
2.2.3.3.	Kokulturen zur Analyse des mNTRA-vermittelten Neuritenauswuchs	28
2.2.3.4.	Streifenassay (in Kooperation mit Nicolai Savaskan)	28
2.2.4.	<i>In vitro</i> Testsystem zur Analyse des Einflusses von L1-Mutanten auf das homophil vermittelte Neuritenwachstum	29
2.2.4.1.	Beschichtung von Petriperm Kulturschalen	29
2.2.4.2.	Präparation und Transfektion primärer Neuronen	29
2.2.4.3.	Quantifizierung der Neuritenlängen	30
2.2.5.	Methode zur Bestimmung der Zelloberflächenexpression von L1 in CHO Zellen	30
2.2.6.	<b>Histologische Methoden</b>	30
2.2.6.1.	<b>Immunhistologie</b>	30
2.2.6.2.	Immunzytologie	31
2.2.6.3.	Nissl-Färbung	31
2.2.7.	Entorhinale Kortexläsion	31

2.2.8.	<b>Methoden zur Generierung defizienter Mäuse</b>	32
2.2.8.2.	Durchmustern einer genomischen Bank	33
2.2.8.3.	Klonierung des Zielvektors	32
2.2.8.4.	Transfektion, Kultivierung und Selektion von ES Zellen	32
2.2.8.5.	Analyse selektierter ES Zellklone	32
2.2.8.6.	Generierung von chimären und Züchtung von mNTRA-defizienter Mäusen	33
2.2.8.7.	Genotypisierung von Mäusen	33
3.	Ergebnisse	34
3.1.	L1 CAM	34
3.1.1.	Analyse der Oberflächenexpression pathologischer L1-Mutanten	35
3.1.2.	Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Funktionsanalyse pathologischer L1 Mutanten	38
3.1.3.	NgCAM induziert als angebotenes Substrat das Neuritenwachstum L1-transfizierter embryonaler Tektum-Neuronen	40
3.1.4.	Die Signalpeptid-Mutante W9S und die nicht-neuronale L1-Isoform $\Delta E2$ bewirken ein vermindertes Neuritenwachstum transfizierter Neurone	42
3.1.5.	Untersuchungen zur Induktion des Neuritenauswuchs durch L1-Mutanten der Gruppe A	43
3.1.6.	Untersuchungen zur Induktion des Neuritenauswuchs durch L1-Mutanten der Gruppe B	46
3.2.	Ergebnisse Neurotractin:	49
3.2.1.	Klonierung von mNTRA aus der Maus	49
3.2.2.	Bestimmung der Genstruktur von mNTRA	51
3.2.3.	Expression von rekombinanten mNTRA	52
3.2.4.	Herstellung und Spezifität der Antiseren gegen mNTRA	53
3.2.5.	Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen von mNTRA	54
3.2.6.	Untersuchung zur Verteilung von mNTRA in der Maus	56
3.2.6.1	Expression von mNTRA in verschiedenen Geweben	56
3.2.6.2.	Expression von mNTRA im embryonalen ZNS	56
3.2.6.3.	Expression von mNTRA während der postnatalen Entwicklung im ZNS der Maus	57
3.2.6.4.	Immunhistologische Untersuchungen zur Verteilung von mNTRA im	59

	Maushirn	
3.2.6.5.	Biochemische Untersuchung der subzellulären Verteilung von mNTRA im ZNS adulter Mäuse	60
3.2.6.6.	Immunzytologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von mNTRA	62
3.2.7.	Untersuchungen zur Funktion von mNTRA	64
3.2.7.1.	Analyse des Neuritenwachstums in Kokulturen von hippocampalen Neuronen und mNTRA-exprimierenden COS-7 Zellen	64
3.2.7.2.	<b>Untersuchungen zur Permissivität von mNTRA im Streifenassay</b>	66
3.2.7.3.	Untersuchungen zur permissiven Wirkung von mNTRA im Vergleich zu PLL / Kollagen	67
3.2.7.4.	Untersuchungen zur permissiven Wirkung von CHO-Membranen + mNTRA im Vergleich zu CHO-Membranen – mNTRA	68
3.2.8.	<b>Immunhistologische Untersuchungen zur Verteilung von mNTRA nach entorhinaler Kortexläsion</b>	71
3.2.8.1.	Quantifizierung der Regulation von mNTRA nach entorhinaler Kortexläsion	76
3.2.9.	Generierung mNTRA-defizienter Mäuse	77
3.2.9.1.	Klonierung des Zielvektors	77
3.2.9.2.	Überprüfung homolog rekombinierter ES Zellklone und mNTRA-defizienter Mäuse mittels PCR und Southern Blot	81
3.2.10	Histologische Analyse mNTRA-defizienter Mäuse	82
4.	Diskussion	83
4.1.	<b>L1 CAM</b>	83
4.1.1.	Oberflächenexpression von L1-Mutanten in CHO Zellen	83
4.1.2.	Etablierung eines Zellkulturmodells zur Analyse der Auswirkungen humanpathogener L1-Mutanten auf das Neuritenwachstum	85
4.1.3.	Auswirkungen der Überexpression von L1-Mutanten der Gruppe A auf das Neuritenwachstum tektaler Neurone	87
4.1.4.	Auswirkungen der Überexpression von L1-Mutanten der Gruppe B auf das Neuritenwachstum tektaler Neurone	88
4.2.	Neurotractin	91
4.2.1.	mNTRA ist ein Mitglied der IgLON-Familie	91
4.2.2.	mNTRA wird entwicklungsabhängig reguliert und zeigt ein restriktives	92

	Expressionsmuster	
4.2.3.	Subzelluläre Verteilung von mNTRA	93
4.2.4.	mNTRA verstärkt das Neuritenwachstum hippokampaler Neuronen	95
4.2.5.	Verteilung und Regulation von mNTRA nach entorhinaler Kortexläsion	97
4.2.6.	Vorläufige Analyse mNTRA-defizienter Mäuse	100
	Zusammenfassung	101
	Summary	103
	Literaturverzeichnis	105
	Abkürzungen	118
	Lebenslauf	120
	Erklärung	121