

1. Einleitung

Die Evolution der Organismen ist gekennzeichnet durch eine zunehmende Komplexität des ZNS. Diese Komplexität ergibt sich zum einen aus der hohen Anzahl der Neuronen, vor allem aber aus den vielfältigen Verschaltungen, die Neuronen miteinander ausbilden. Das Verschaltungsmuster der Neuronen verläuft dabei nach einem präzise gesteuerten Bauplan, der während der Ontogenese jedes Lebewesens abgerufen wird. Die Erforschung der Mechanismen, die diesen Vorgängen zu Grunde liegen, findet ihren Ursprung in den Untersuchungen von Ramon y Cajal, der grundlegende Erkenntnisse über die Entwicklung und den zellulären Aufbau des Nervensystems gewann (Ramon Y Cajal, 1890; 1906; 1911).

Die Entwicklung des Nervensystem ist durch verschiedene Stadien gekennzeichnet. Sie beginnt mit der frühembryonalen Induktion der Neuralplatte, aus der das Neuralrohr hervorgeht. Es folgt eine Zunahme der Zellzahl durch Proliferation. Durch Teilung von Vorläuferzellen, den Neuroblasten, entstehen bei diesem Vorgang postmitotische Nervenzellen. Die neu gebildeten Nervenzellen gelangen durch Zellmigration zu ihrem Bestimmungsort. Dabei ordnen sich Neuronen in Schichten an, wobei neu gebildete Neuronen die tieferen Schichten älterer Neuronen durchqueren, bevor sie ihren Bestimmungsort erreicht haben. Die Ausbildung von Zellschichten durch zielgerichtete Zellmigration ist ein allgemeines Prinzip bei der Entwicklung des ZNS. Ein gut untersuchtes Beispiel für diese Vorgänge bietet die Entwicklung des zerebralen Kortex, dessen Schichtenbildung bereits von Cajal eingehend beschrieben wurde (Ramon Y Cajal, 1911). Während dieser Wanderung befinden sich die Nervenzellen im engen Kontakt mit radialen Gliazellen, der umgebenden extrazellulären Matrix und anderen Neuronen (Campbell und Götz, 2002). An ihrem Bestimmungsort angelangt, erfolgt die Differenzierung der Zellen, die durch die Bildung von Dendriten und Axonen gekennzeichnet ist. Dabei werden von den auswachsenden Axonen zum Teil große Distanzen überwunden bis sie ihre Zielzellen erreichen. Dort angekommen, beginnt die Ausbildung der Synapsen, die vorerst in großer Überzahl vorkommen, aber durch verschiedene Faktoren in ihrer Anzahl während der Reifung des Nervensystems selektiv verringert werden. Auf der Ebene der Synapsen laufen während der gesamten Lebensdauer dynamische Vorgänge ab, die zu deren Auf- oder Abbau, bzw. deren Modifizierung und Verfeinerung führen. Diese dynamischen Veränderungen erfolgen als Reaktion auf äußere und innere Einflüsse und stellen ein entscheidendes Merkmal höherer, kognitiver Leistungen dar (Kandel et al., 1996).

Es wird deutlich, dass der Zellkommunikation bei diesen Vorgängen eine entscheidende Rolle zukommen muss. Dabei sind eine Vielzahl von Proteinen daran beteiligt, die Zell-Zellerkennung, die Zelladhäsion, sowie die Zellkommunikation zu regulieren. Eine Anzahl verschiedener Proteinfamilien wurde in der Vergangenheit identifiziert, die spezifische Eigenschaften besitzen, um die genannten Vorgänge zwischen Zellen zu ermöglichen. Diese Zelladhäsionsproteine umfassen die Proteinfamilien der Cadherine, Integrine, Selektine und der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF). Mit Ausnahme der Selektine, denen eine wichtige Funktion bei der Adhäsion von Zellen des Immunsystems zukommt, spielen diese Proteinfamilien eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (Brümmendorf und Rathjen, 1996; Sonderegger und Rathjen, 1992; Williams et al., 1994; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

1.1. Axonale Wegfindung

Eine Forschungsrichtung der Entwicklungsneurobiologie beschäftigt sich mit der axonalen Wegfindung. Untersuchungen von Cajal berichten über das geordnete und zielgerichtete Auswuchsverhalten von Axonen bzw. deren motilen Endstrukturen, den Wachstumskegeln. Diese Beobachtungen bildeten die Grundlage für die Chemoaffinitätshypothese, die 1963 von Sperry nach Experimenten im visuellen System von Amphibien formuliert wurde. Die Chemoaffinitätshypothese besagt, dass auswachsende Axone zu Zellen ihrer Umgebung spezifische Affinitäten haben, die ihnen eine Orientierung ermöglichen. Um eine exakte Verschaltung eines auswachsenden Neurons mit einer Zielzelle zu ermöglichen, haben der Wachstumskegel der einen und die Dendriten oder das Soma der anderen Zelle eine Affinität zueinander. Diese wird durch molekulare Marker definiert. In den zurückliegenden Jahren wurde diese Hypothese durch eine Reihe von experimentellen Befunden verfeinert. Dabei konnte eine Vielzahl verschiedener Faktoren identifiziert werden, die einen Einfluss auf die axonale Wegfindung haben. Zu diesen Leitmolekülen gehören Mitglieder von Proteinfamilien der IgSF, Semaphorine, Netrine, Ephrine, Slit-Moleküle und BMPs (*bone morphogenic proteins*) (Sink et al., 2001; Sonderegger und Rathjen, 1992; Flanagan and Vanderhaeghen, 1998; Van Vactor und Flanagan, 1999; Luo et al., 1993; Raper et al., 2000; Schnorrer und Dickson, 2004). Basierend auf Untersuchungen über die Funktion dieser Proteine, wurde ein Modell entworfen, das erklärt wie das axonale Wachstum zu einem zielgerichteten Prozess

mit hoher Genauigkeit umgesetzt wird. Dabei sind auswachsende Axone einer Kombination von anziehenden und abstoßenden Faktoren ausgesetzt, die den Weg des Axons lenken. Diese können löslich sein und über bestimmte Strecken diffundieren, oder werden von Zellen als Oberflächenproteine präsentiert (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Die Integration dieser Signale erfolgt im Wachstumskegel, der seine Umgebung mit Hilfe finger- und lappenförmiger Auswüchse abtastet. Faktoren, die mit diesen motilen Endstrukturen perzeptiert werden, wirken als Leitmoleküle und bewirken entweder eine Richtungsänderung, fortgesetztes Wachstum oder bei Ankunft an den Bestimmungsort, die Knüpfung synaptischer Kontakte. Ein anschauliches Beispiel für diese Vorgänge bietet das Wachstumsverhalten von Axonen im Rückenmark. Auf der ventralen Mittellinie des Rückenmarks von Wirbeltieren befindet sich eine triangelförmige Struktur, die sich aus einer Population spezialisierter Zellen zusammensetzt. Einwachsende kommissurale Axone kreuzen diese Struktur um daraufhin kurz nach Überquerung der Mittellinie ihr Wachstum rostral fortzusetzen. Es wurde herausgefunden, dass Netrin-1 für das Einwachsen der Axone als attraktiver Faktor essentiell ist (Kennedy et al. 1994; Serafini et al. 1994), während die Überquerung der Mittellinie über eine Wechselwirkung der IgSF-Mitglieder Axonin-1, NrCAM und NgCAM reguliert wird (Stoeckli und Landmesser, 1995, 1998; Fitzli et al., 2000). Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die axonale Wegfindung Mechanismen unterliegt, die ein fein abgestimmtes zeitliches und räumliches Zusammenspiel wechselwirkender Proteine voraussetzt.

1.2. Synaptogenese

Ist ein Axon in seinem Zielgebiet angekommen erfolgt die Ausbildung der Synapsen. Eine Synapse formiert sich im klassischen Fall zwischen Wachstumskegeln der Axone und den Dendriten kontaktierter Neuronen. Nach der Initiierung der axo-dendritischen Verknüpfung differenzieren sich die prä- und postsynaptischen Endigungen. Hierbei handelt es sich um einen asymmetrischen Prozess, der die sequentielle Rekrutierung unterschiedlicher Proteine zu den jeweiligen Endigungen beinhaltet. Der Kontakt dieser Strukturen wird durch Zelladhäsionsmoleküle initiiert, woraufhin für die Reifung der Synapsen benötigte Proteine durch vesikulären Transport an die Kontaktstelle gelangen. Die Synapse tritt in Funktion, wenn die membranständigen Vesikel Neurotransmitter freisetzen, die auf der postsynaptischen Endigung an bestimmte Rezeptoren binden. Die Bindung an diese Rezeptoren bewirkt direkt oder indirekt ein Einströmen von Ionen durch Ionenkanäle in die

postsynaptische Endigung, die eine Veränderung des Membranpotentials hervorrufen, was letztlich zu der Ausbildung eines Aktionspotentials führt. Diese Umsetzung eines chemischen in ein elektrisches Signal ermöglicht die Weiterleitung dieser Signale über große Distanzen. Darüber hinaus steuern diese Signale weitere Prozesse in den empfangenen Zellen, die z.B. zu einer Signaltransduktion innerhalb der Zelle führen können und die Produktion verschiedener Proteine einleitet. In der Vergangenheit wurden verschiedene Zelladhäsionssysteme beschrieben, die speziell bei der Reifung von Synapsen eine Rolle spielen. Hierzu gehören das Cadherin-Catenin-System (Fannon und Colman, 1996) und das Neurexin-Neurologin-System (Song et al. 1999). Die Cadherine bilden eine homophile, trans-synaptische Bindung aus. Dabei fungiert Catenin als intrazellulärer Ligand, der mit weiteren intrazellulären Bindungspartnern die Morphologie der postsynaptischen Endigung beeinflusst (Togashi et al. 2000). Die Interaktion von β -Neurexin mit Neurologin ist ein Beispiel für eine heterophile, trans-synaptische Bindung, die zu einer Differenzierung von prä- und postsynaptischen Endigungen führt. Dabei bindet Neurologin an das postsynaptische Protein PSD95, welches bei der Organisation von Signaltransduktions-Proteinen eine zentrale Rolle einnimmt (Irie et al. 1997). Interessanterweise konnte zuletzt gezeigt werden, dass Neurologin-1 ausreicht, um die präsynaptische Differenzierung von Axonen *in vitro* auszulösen (Scheiffele et al. 2000). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die Differenzierung und Reifung von Synapsen über ein bidirektionales Signalsystem gesteuert wird. Eine in diesem Zusammenhang viel beachtete Arbeit über das IgSF-Mitglied SynCAM zeigte auf, dass bereits die Überexpression eines Zelladhäsionsmoleküls mit homophilen Bindungsmechanismus für die Etablierung einer funktionellen Synapse ausreichen kann (Biederer et al. 2002).

Während der letzten Jahre rückte die dynamische Regulation synaptischer Kontakte im ZNS in den Mittelpunkt der Forschung. Mit diesen, als synaptische Plastizität bezeichneten Vorgängen, werden höhere kognitive Vorgänge, wie das Gedächtnis und die Fähigkeit zu lernen ermöglicht. Kennzeichnend für eine solche Plastizität synaptischer Übertragung sind Veränderungen der Morphologie beteiligter Strukturen und der postsynaptischen Signalverarbeitung. Auch für diese Vorgänge konnte eine Beteiligung von Zelladhäsionsmolekülen gezeigt werden. Neben den bereits erwähnten Cadherinen, beeinflussen die IgSF-Mitglieder NCAM und L1 die Langzeitpotenzierung (LTP), die eine zelluläre Basis für bestimmte Formen der Gedächtnisbildung und des Lernens darstellt (Luthi et al., 1994).

1.3. Regeneration im adulten ZNS

Neurodegenerative Krankheiten gewinnen im Zuge der ansteigenden Lebenserwartung in den Industrieländern immer mehr an Bedeutung. Zusätzlich sind Schädel-Hirn- und Rückenmarksverletzungen als Folge von Verkehrsunfällen ein häufig zu behandelndes Krankheitsbild. Daher sind die zellulären und molekularen Regulationsvorgänge, die zur De- oder Regeneration von Neuronen führen, Gegenstand intensiver neurobiologischer Grundlagenforschung. Im adulten ZNS findet in der Regel keine axonale Regeneration und Wiederherstellung verletzter und unterbrochener Verbindungsbahnen statt (Horner und Gage, 2000). Trotz der limitierten axonalen Regeneration ist das Gehirn in der Lage durch plastische Veränderungen auf solche Verletzungen zu reagieren. Hierbei handelt es sich um eine Kompensation verloren gegangener Synapsen, aber auch um Aussprossung von axonalen Kollateralen durch unverletzte Neuronen, beides Prozesse, die an der Restrukturierung deafferentierter, denervierter Hirnregionen beteiligt sind (Nadler und Cotman, 1980 [104], 1980 [105]; Steward und Vinsant, 1983; Deller et al., 1995 [39], 1995 [40]). Hierbei kommt den Gliazellen eine wichtige Funktion zu. Nach einer Verletzung des ZNS erfolgt eine als reaktive Gliose bezeichnete Aktivierung von Astrozyten. Dabei kommt es zu einer charakteristischen Vergrößerung des Zellkörpers (Hypertrophie) und zur Expression verschiedener Proteine wie N-CAM, N-Cadherin, Integrinen, Laminin, NGF (*neuronal growth factor*) und Mitgliedern der Proteoglykane (Clarke et al., 2001; McKeon et al., 1999; Haas et al., 1999; Ridet et al., 1998). Gemeinsam mit Meningealzellen bilden Astrozyten eine Narbe um verletzte Regionen des ZNS, die ein Hindernis für die Reinnervation darstellt (Shearer et al., 2003). Die verschiedenen Proteine, die von Astrozyten in dieser Phase exprimiert werden, beeinflussen die Permissivität dieser Zellen bzw. deren Umgebung für axonales Wachstum. Dabei zeigten Untersuchungen *in vitro*, dass neonatale Astrozyten ein gutes Substrat für Neuritenauswuchs darstellen, deren Permissivität aber mit der Länge der Kultivationsdauer abnimmt, was mit der Abnahme der Expression von wachstumsfördernden Molekülen wie Integrinen, N-CAM und N-Cadherin einhergeht (Smith et al. 1993). Durch Blockierung dieser Proteine mit Antikörpern zeigte sich eine geringere Permissivität behandelter Astrozyten (Neugebauer et al. 1988; Smith et al. 1990). Aktuelle Untersuchungen widmen sich vermehrt Strategien, die Permissivität geschädigter Hirnregionen *in vivo* durch Blockierung oder Abspaltung funktioneller Bereiche zu beeinflussen. Dadurch konnten einige Mitglieder der Proteoglykane als eine Ursache für die Inhibition axonalen Wachstums in

verletzten Hirnregionen identifiziert werden (McKeon et al., 1999; Asher et al., 2000). Weiterhin konnte durch selektive Inhibition Myelin-assoziiierter Proteine wie NogoA und MAG gezeigt werden, dass im Rückenmark erwachsener Ratten eine axonale Regeneration nach Durchtrennung des Rückenmarks möglich ist (Schnell und Schwab, 1990; Brösamle et al., 2000; Papadopoulos et al., 2002; Sicotte et al., 2003). Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass die Balance verschiedener permissiver und nicht-permissiver Komponenten das Auswachsen von Axonen und somit die Regenerationsfähigkeit nach Schädigung des ZNS bestimmen.

Ein wichtiges Tiermodell zur Untersuchung der funktionellen Regeneration nach Schädigungen des ZNS ist die Läsion des entorhinalen Kortex bei Nagern, die eine partielle Denervierung des Hippokampus bewirkt (Matthews et al., 1976; Kelley und Steward, 1997; Savaskan und Nitsch, 2001). Die Organisation der Innervierung des Hippokampus ist von relativ einfacher Struktur. Die wichtigsten Afferenzen sind der entorhinale-hippokampale Fasertrakt, die kommissuralen/assoziativen (C/A) Fasern und septale Fasern. Abbildung 1 gibt einen Überblick über das Verschaltungsmuster afferenter und efferenter Fasersysteme im Hippokampus. Bei der Läsion des entorhinalen Kortex werden die Verbindungen entorhinaler Kortexafferenzen zum Gyrus dentatus operativ zerstört, was zu einer nahezu vollständigen Denervierung dieser Region führt. Dies wird durch den Verlust von bis zu 90 % aller Synapsen innerhalb der äußeren Molekularschicht des Gyrus dentatus verdeutlicht. Als Reaktion auf diese Deafferenzierung kommt es zu einer schichtenspezifischen Aussprossung der beschriebenen Fasersysteme, die zur Ausbildung neuer Synapsen führt (Cotman et al., 1981; Steward und Vinsant, 1983; Deller et al., 2000; Savaskan und Nitsch, 2001). Physiologische Untersuchungen zeigten, dass diese Regenerationserscheinungen zu einer teilweisen funktionellen Wiederherstellung der zuvor deafferenzierten, äußeren Molekularschicht führen (Clusmann et al., 1994; Kelley und Steward, 1997). Da es sich hierbei in erster Linie um einen axonalen Wachstumsprozess handelt, wurde dieses Modell häufig angewandt, um die Verteilung neurotropher Faktoren und axonaler Leitmoleküle zu untersuchen. Darüber hinaus müssen Faktoren in dem Zielgebiet aussprossender Axone präsent sein, die bei der Synaptogenese eine Rolle spielen. Die Identifikation dieser Faktoren und der Mechanismen die zur Axonsprossung führen stellen eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Behandlung traumatischer und degenerativer Erkrankungen dar.

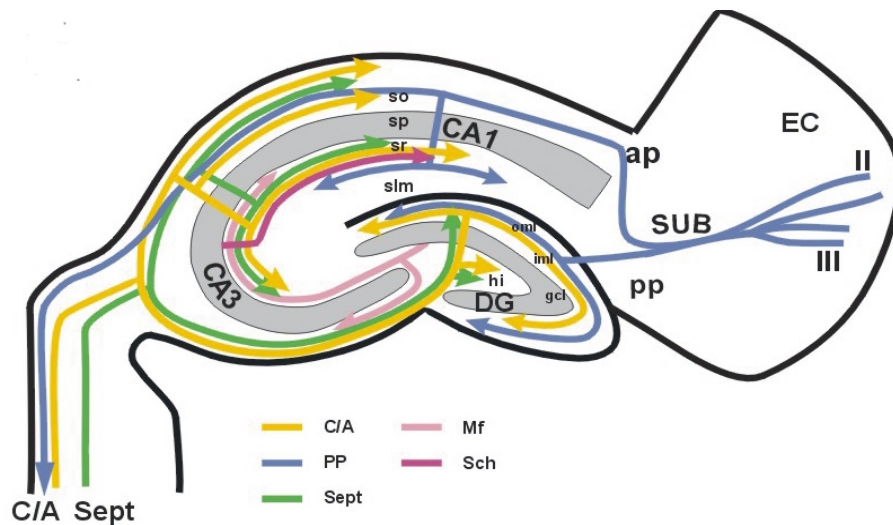


Abbildung 1: Der Hippokampus und seine wichtigsten afferenten und efferenten Nervenbahnen. In blau sind ipsilaterale Afferenzen (pp und ap) dargestellt, die von Pyramiden- und Sternzellen der Schichten II/III des entorhinalen Kortex in die äußere Molekularschicht und ins Stratum lacunosum des Cornu Ammonis (CA) projizieren. Die gelb gefärbte C/A Projektion endet in der inneren Molekularschicht (iml) des Gyrus dentatus. Die septale Projektion (Sept) endet in verschiedenen CA-Regionen, dem Hilus und der inneren und äußeren Molekularschicht. Fasersysteme, die Regionen innerhalb des Hippokampus verbinden, sind die Schafferschen Kollateralen (Sch) und die Moosfasern (MF). Diese Abbildung wurde entnommen aus Skutella und Nitsch, (2001).

1.4. L1 CAM und Neurotractin

Nachdem ich einen Überblick über die Entwicklung des Nervensystems und der Bedeutung daran beteiligter Moleküle bei Vorgängen im adulten ZNS gegeben habe, möchte ich nun genauer auf die beiden IgSF-Proteine eingehen, deren Untersuchung Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

1.5. L1 CAM

L1 CAM ist das namensgebende Gründermittglied der L1-Unterfamilie der IgSF. Diese Zelladhäsionsmoleküle besitzen eine homologe Domänenstruktur, die bei den Wirbeltieren aus 6 Immunoglobulineinheiten, 5 Fibronectin-ähnlichen Domänen, einer Transmembran-

domäne, sowie einer stark konservierten intrazellulären Domäne besteht. Innerhalb der Wirbeltiere sind vier Vertreter der L1-Familie beschrieben: L1, Neurofascin, NrCAM und CHL1 (Rathjen und Schachner, 1984; Rathjen et al., 1987a; Volkmer et al., 1996; Holm et al., 1996). Diese vier Vertreter leiten sich vermutlich phylogenetisch von einem gemeinsamen Vorfahren ab. In Genomen verschiedener Arthropoden wurde nur eine Form von L1 identifiziert, so könnten die vier L1-Mitglieder, ähnlich wie es für andere Genfamilien berichtet wurde, durch sequentielle Genomduplikation entstanden sein (Hortsch et al., 2000). Allen L1-Mitgliedern gemeinsam ist eine Beteiligung an der Entwicklung des Nervensystems. Ihre Funktion besteht im allgemeinen in der Vermittlung von Zell-Zellkontakten im Nervensystem. Dort sind sie außerdem an Prozessen wie Zellmigration, Myelinisierung, axonalem Wachstum und axonaler Wegfindung beteiligt (Rathjen et al., 1987a; Lemmon et al., 1989; Chang et al., 1987; Brümmendorf et al., 1998; Brümmendorf und Rathjen, 1996; Hortsch et al., 1996). Die L1-Mitglieder werden aber auch von einigen nicht-neuronalen Zelltypen exprimiert, so wurde für L1 und NrCAM eine Expression in transformierten, metastierenden Krebszellen nachgewiesen (Primiano et al. 2003; Conacci-Sorrell et al. 2002).

1.6. L1-Mutationen verursachen neurologische Defekte im Menschen

Eine wichtige Rolle spielt L1 während der Entwicklung des ZNS und hierbei insbesondere während der Entwicklung axonaler Trakte, wie dem Rückenmark, dem Pyramidaltrakt oder dem Hirnbalken (Corpus Callosum), der die beiden Hemisphären miteinander verbindet. Darüber hinaus gibt es Hinweise für eine Beteiligung von L1 bei Lern- und Gedächtnisvorgängen, sowie bei der Regeneration neuronaler Verbindungen nach traumatischen Hirnschädigungen (Aubert et al. 1998; Law et al., 2003).

Die große Bedeutung dieses Proteins für die Entwicklung des Nervensystems spiegelt sich darin wieder, dass Mutationen im L1-Gen für eine variantenreiche Erbkrankheit des Menschen verantwortlich sind. Hierbei handelt es sich um eine rezessive, X-chromosomale und damit ausschließlich bei Männern auftretende neurologische Krankheit. Dem variablen Krankheitsbild zufolge wurde das Syndrom unabhängig voneinander als X-chromosomaler Hydrocephalus, MASA-Syndrom, SPG1 (spastic paraplegia type 1) oder CRASH-Syndrom beschrieben (Rosenthal et al., 1992; Jouet et al., 1994; Vits et al., 1994). Im folgenden werde ich die für die einzelnen Syndrome zusammenfassende Bezeichnung CRASH-Syndrom

verwenden, die als Akronym für Corpus Callosum agenesis, retardation, aphasia, spastic paraplegia, hydrocephalus steht (Fransen et al., 1995).

Diese Krankheit kann bei Erkrankten zu spastischer Lähmung, Hydrocephalus und geistiger Zurückgebliebenheit führen. Das CRASH-Syndrom zeigt eine hohe Variabilität des Krankheitsbildes, die selbst bei Erkrankten innerhalb einer Familie zu beobachten ist. Neugeborene, die einen Hydrocephalus aufweisen oder nach der Geburt entwickeln, haben eine geringe Lebenserwartung. Als Grund für die im Übermaß vorhandene Hirnflüssigkeit, sowie die vergrößerten zerebralen Ventrikel wird eine Verengung des Aquaeductus cerebri angesehen, die eine physiologische Zirkulation des Liquors verhindern kann. Die Lebenserwartung und Schwere der Krankheit scheint trotz der angesprochenen Variabilität abhängig zu sein von der Art und Position der Mutation. Bestimmte Mutationen verursachen eine hohe Säuglingssterblichkeit, wogegen Träger anderer Mutationen keine reduzierte Lebenserwartung aufweisen. Es liegt nahe, dass die Position der Mutationen auf Proteinebene, die spätere Funktion entscheidend beeinflussen können. Aus diesem Grund können Untersuchungen über die Art der Funktionsbeeinträchtigung wertvolle Hinweise über die molekularen Mechanismen liefern, die einer korrekten Funktion des L1-Proteins zugrunde liegen.

1.7. Molekularbiologie der Mutationen

Das L1-Gen setzt sich aus 29 Exons zusammen, von denen 28 translatiert werden können. Zwei Mini-Exons (Exon 2 und 27) wurden identifiziert, die für eine Neuronen-spezifische Isoform kodieren. Exon 2 kodiert für eine Region, die für die homophile Interaktion von L1 wichtig ist, während Exon 27 für den intrazellulären Transport von L1 in das Axon und den Wachstumskegel verantwortlich ist (De Angelis et al., 2001; Kamiguchi et al. 1998).

Es sind über 140 verschiedene, pathogene Mutationen des L1 Proteins bekannt (<http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/11/>). Diese können zu einem Translationsabbruch oder zu einer Verschiebung des Leserasters führen. Die häufigste Art der Mutation ist die *missense*-Mutation, dabei kommt es zum Austausch einzelner Basen, was zum Einbau einer anderen, „unsinnigen“ Aminosäure führt (Abb. 2). Diese Mutationen können sich abhängig von der Position und Identität der veränderten Aminosäure auf unterschiedliche Weise auf die Funktion des Proteins auswirken. Mutationen in extrazellulären Domänen führen im Vergleich zu Mutationen der intrazellulären Domäne zu einem schwerwiegenderem

Krankheitsbild (Bateman et al., 1996; Michaelis et al., 1998; Yamasaki et al. 1997). Diese Mutationen sind von besonderem Interesse um die molekularen Bindungsmechanismen, sowie die an den Interaktionen beteiligten Domänen, des L1-CAMs zu identifizieren (De Angelis et al., 1999). Eine besonders starke Ausprägung des CRASH-Syndroms mit früher Sterblichkeit bewirken Mutationen, bei denen das L1-Protein nicht oder nur in zu geringem Maße an die Zelloberfläche der exprimierenden Zellen transportiert wird (De Angelis et al., 2002). Für die homo- bzw. heterophile Interaktion von L1 ist die Verfügbarkeit des Proteins an der Zelloberfläche jedoch Voraussetzung. Einige der untersuchten Mutationen betreffen für die Domänenstruktur wichtige Schlüsselpositionen (Bateman et al., 1996). Diese Mutationen könnten eine fehlerhafte Faltung des Proteins bewirken, was zu einer Degradierung und somit zu einer reduzierten oder fehlenden Oberflächenexpression führen würde. Darüber hinaus verhindern einige Mutationen eine vollständige Glykosylierung des Proteins. Diese Mutanten scheinen einer Degradierung zu entgehen und zeigen eine Akkumulation in verschiedenen zytoplasmatischen Kompartimenten (Moulding et al., 2000; De Angelis et al. 2002).

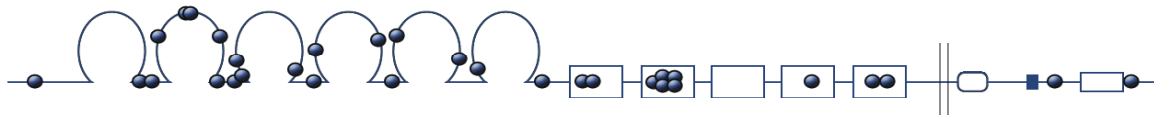


Abbildung 2: Domänenmodell für L1. Ig-ähnliche Domänen sind als Schleifen, Fibronectin III-ähnliche Domänen als Rechtecke dargestellt. Die Plasmamembran wird durch zwei parallel verlaufende Striche symbolisiert, während funktionelle Bereiche der zytoplasmatischen Domäne durch verschiedene Symbole dargestellt sind. Die eingesetzten Kreise stellen die Positionen verschiedener humanpathogener *missense*-Mutationen dar.

1.8. Bindungspartner von L1

L1 ist ein Protein das homophil bindet und komplexe heterophile Interaktionen mit einer Vielzahl anderer Moleküle einzugehen vermag. Für die extrazellulären Domänen wurden Bindungen in der *cis*- und *trans*-Ebene festgestellt, wobei die *trans*-Interaktion die

Wechselwirkung von Zelloberflächenproteinen zwischen zwei Zellen und die Interaktion von Zelloberflächenproteinen in derselben Zelle als *cis*-Interaktion bezeichnet wird. So erfolgt die homophile Interaktion zwischen zwei L1-Molekülen in *trans* (Lemmon et al., 1989), während sich z.B. die heterophile Interaktion mit den IgSF-Mitgliedern TAX-1/Axonin/F11 in derselben Zelle, in der *cis*-Ebene beobachtet wird (Buchstaller et al., 1996). Eine Kombination dieser Bindungsmechanismen bestimmt z.B. das Auswuchsverhalten von dorsalen Wurzelganglien-Neuronen, ein im Rückenmark lokalisierter Neuronentyp. Bei ihnen wird durch eine homophile L1 Interaktion in *trans*, sowie einer heterophilen Interaktion zwischen NgCAM und Axonin-1 in *cis* das Auswuchsverhalten gesteuert (Kunz et al., 1998). Spätere Studien über das Bindungsverhalten von L1-Proteinen, bei denen einzelne Domänen deletiert wurden, zeigten welche Domänen für diese homo- bzw. heterophilen Bindungen verantwortlich sind (De Angelis et al., 2002). Neben der Bindung zu Axonin-1/TAX-1 wurden weitere Bindungspartner der extrazellulären Domänen von L1 identifiziert. Hierzu gehören z.B. weitere IgSF-Mitglieder wie NCAM und Contactin/F3/F11, Integrine und das extrazelluläre Matrixprotein Neurocan, deren Bindungen zum Teil die auswuchsfördernde Wirkung von L1 modulieren (Horstkorte et al., 1993; Brümmendorf et al., 1993; Friedlander et al., 1994).

Die zytoplasmatischen Domänen von Mitgliedern der L1-Familie sind hoch konserviert (Hortsch, 1996). Sie vermitteln über einen konservierten Abschnitt die Interaktion mit dem zytoskelett-assoziierten Adapterprotein Ankyrin. Diese Bindung wird wahrscheinlich bei allen Mitgliedern der L1-Familie über eine Tyrosin-Phosphorylierung inhibiert, wie es für die Bindung von Neurofascin an Ankyrin gezeigt wurde (Garver et al., 1997; Tuvia et al. 1997). Diese Interaktion scheint von Bedeutung für die Organisation des Zytoskeletts von auswachsenden Axonen zu sein. Darüber hinaus zeigte eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Analyse von NrCAM- und Ankyrin-defizienten Mäusen, dass beide mutanten Mauslinien Katarakte in der Linse ausbilden, die vermutlich durch abnorme Aggregatbildung von F-Actin verursacht werden (More et al. 2001). Neben der Bindung an Ankyrin wurden weitere Bindungspartner der zytoplasmatischen Domäne von L1 identifiziert. Dabei handelt es sich um Proteinkinasen wie p90rsk, MAPK oder Casein-Kinase II (Wong et al., 1996 [160]; Schaefer et al. 1999; Wong et al., 1996 [159]). Weiterhin befindet sich in der zytoplasmatischen Domäne von L1 ein Abschnitt, der den zielgerichteten Transport des Proteins in das Axon, sowie den Wachstumskegel reguliert und dort die Clathrin-abhängige Internalisierung von L1 vermittelt (Kamiguchi et al. 1998; Long et al., 2001).

1.9. Neurotractin

Neurotractin (NTRA) ist wie L1 ein Mitglied der IgSF. Gemeinsam mit den Proteinen LAMP, OBCAM, Neurotrimin/CEPU und Kilon wird NTRA in die IgLON-Unterfamilie eingeordnet (Marg et al., 1999). Die Vertreter dieser Familie scheinen auf die Wirbeltiere beschränkt zu sein, da weder *Drosophila* noch *C.elegans*, deren Genome vollständig aufgeklärt sind, zu den IgLON-Mitgliedern orthologe Proteine besitzen. Jedes der IgLON-Mitglieder ist mehrfach glykosyliert und aus drei Ig-ähnlichen Domänen aufgebaut, die über einen GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden sind. Von dieser Grundstruktur ausgehend kommen verschiedene Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen entstehen. Für Neurotractin wurde eine Isoform mit zwei Ig-Domänen gefunden und CEPU-1 kann als sezerniertes Protein ohne GPI-Anker vorkommen (Marg et al., 1999; Lodge et al., 2001). Weitere Spleißformen, die einen Abschnitt von 11 Aminosäuren zwischen die dritte Ig-Domäne und den GPI-Anker einfügen, sowie die alternative Verwendung zwei verschiedener Signalpeptide, wurden für LAMP und CEPU-1 gefunden (Spaltmann und Brümmendorf, 1996; Brümmendorf et al., 1997; Pimenta und Levitt, 2004). Aufgrund der großen Ähnlichkeit der IgLON-Mitglieder zueinander kann man die Abstammung von einem gemeinsamen Vorfahren vermuten.

1.10. Funktion und Verteilung von Proteinen der IgLON-Familie

Neurotractin wurde von unserer Arbeitsgruppe als ein neuritenauswuchsförderndes Protein beschrieben, dass in bestimmten axonalen Trakten während der Embryonalentwicklung des Huhns exprimiert wird. Das Protein wird während der Entwicklung des Nervensystems hochreguliert (Marg et al. 1999). Dies weist auf eine Beteiligung an der Faszikulation von Axonen, der axonalen Wegfindung sowie der Initiierung und Unterstützung des Neuritenauswuchses hin. Die Mitglieder der IgLON-Familie sind in ihrer räumlichen und zeitlichen Verbreitung im ZNS auf bestimmte Regionen und Subpopulationen von Neuronen beschränkt. In einigen Regionen überlappt sich ihre Expression, während andere Strukturen eine komplementäre Expression der verschiedenen IgLONs aufweisen (Struyk et al., 1995; Gil et al. 2002; Bräuer et al., 2000). Für Neurotractin wurde ein homologes Protein in der Ratte beschrieben, dessen Verteilung im adulten ZNS immunhistologisch analysiert wurde. Im adulten Rattenhirn ist Kilon (**K**indred of **I**g **L**ON) ein weit verbreitetes Protein, dass in

allen Hirnregionen detektiert wird. Eine starke Expression wurde im Riechhirn, dem Kortex, Diencephalon, Hippokampus und Cerebellum nachgewiesen. Der Hirnstamm und das Rückenmark zeigen eine deutlich schwächere Expression. Im Gegensatz dazu, ist die Expression von OBCAM restriktiver und beschränkt sich auf den Kortex und den Hippokampus (Struyk et al., 1995; Funatsu et al., 1999; Miyata et al., 2003 [100]). LAMP ist vorrangig im limbischen Kortex und dem Hippokampus exprimiert, während das vierte Mitglied der IgLON-Familie, Neurotrimin/CEPU, im sensorisch-motorischen Kortex vorkommt (Zacco et al., 1990; Gil et al., 2002). Wenig bekannt ist über eine Expression von IgLON-Mitgliedern außerhalb des Nervensystems. Allerdings wird für das humane OBCAM Protein (OPCML) eine Expression in epithelialen Gebärmutterzellen beschrieben. In diesem Zusammenhang wurde OPCML als potentiell Tumor-Suppressor-Gen identifiziert, dass bei Auftreten einer bestimmten *missense*-Mutation funktionell inaktiviert wird. Es wird angenommen, dass diese Mutation die Zell-Zelladhäsion beeinflusst und zur Auslösung von Gebärmutterkrebs beiträgt (Sellar et al. 2003). Innerhalb des Nervensystems gibt es bisher keine Hinweise auf pathologische Mutationen der IgLON-Genfamilie.

Bisherige Untersuchungen mit Neuronen *in vitro* zeigen, dass Proteine dieser Familie homophile Wechselwirkungen miteinander eingehen, aber auch heterophil miteinander interagieren können. Dabei gibt es Hinweise, dass sie in Abhängigkeit der molekularen Identität interagierender Neurone, als permissiver oder nicht-permissiver Faktor eine Veränderung des Auswuchsverhaltens von Axonen bewirken (Zhukareva und Levitt, 1995; Gil et al., 1998; Mann et al., 1998; Eagleson et al., 2003). Diese selektive Wirkung von Zelladhäsionsmolekülen auf das axonale Wachstum stellt ein weit verbreitetes Prinzip zur Etablierung unterschiedlicher neuronaler Verbindungen während der Entwicklung des Nervensystems dar.

1.11. Subzelluläre Verteilung von IgLON-Proteinen

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die subzelluläre Lokalisation von Mitgliedern der IgLON-Familie entwicklungsabhängig reguliert wird. Für embryonale Neuronen, die sich im Wachstums- und Differenzierungsprozess befinden wird eine somatosomale und axonale Verteilung beschrieben. Dagegen wird die Expression im postnatalen ZNS vorrangig auf Dendriten und dem Zellsoma beobachtet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen darüber hinaus, dass Kilon und OBCAM im adulten Rattenhirn eine synaptische Lokalisation

aufweisen (Horton und Levitt, 1988; Gil et al., 2002; Miyata et al., 2003 [99]; Miyata et al., 2003 [100]). Ein funktioneller Zusammenhang, der z.B. auf eine Rolle von IgLON-Proteinen bei der Synaptogenese hinweist, konnte bislang nicht hergestellt werden.

Da es sich bei Proteinen der IgLON-Familie um GPI-verankerte Moleküle handelt, lässt die Abwesenheit einer intrazellulären Domäne keine direkte Signaltransduktion zu. Für GPI-verankerte Proteine ist bekannt, dass sie sich in bestimmten Kompartimenten der Plasmamembran befinden. Diese sogenannten Lipid-Rafts besitzen eine charakteristische Zusammensetzung, die reich an Cholesterolen und Sphingolipiden ist (Varma et al., 1998; Brown und London, 2000). Für diese Kompartimente wird eine bedeutende Rolle bei Vorgängen der Signaltransduktion, sowie der Endo- und Exocytose angenommen (Simons et al. 1997). Dabei führt die räumliche Anreicherung verschiedener Proteine auf extrazellulärer Seite zu einer Rekrutierung intrazellulärer Signalmoleküle. Diese könnte innerhalb der Lipid-Rafts über einen Ko-Rezeptor vermittelt werden. So wurde z.B. für das GPI-verankerte Protein Contactin-1, eine Signaltransduktion über die Aktivierung der Protein Tyrosinkinase Fyn gezeigt (Zisch et al. 1995; Cervello et al. 1996).

Zusammenfassend weisen bisherige Untersuchungen über die Funktion und Verteilung von Mitgliedern der IgLON-Familie auf eine Rolle bei der Zell-Zellerkennung während der Entwicklung des Nervensystems hin. Im postnatalen ZNS erreicht die graduell ansteigende Expression ihr Maximum. Dabei wird die entwicklungsabhängige Regulation auf zellulärer Ebene durch Veränderungen der subzellulären Lokalisation begleitet. Zusätzlich wird im adulten ZNS eine synaptische Verteilung beobachtet. Aus diesem Grund muss auch im adulten ZNS eine Funktion für die Mitglieder der IgLON-Familie postuliert werden.

1.12. Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung und Funktionsaufklärung der IgSF-Mitglieder L1 und Neurotractin.

Wie zuvor beschrieben, spielen Zelladhäsionsmoleküle der IgSF bei der Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle. L1 ist eines der prominentesten, neuronalen Mitglieder dieser Familie und wurde bereits in einer Vielzahl von Publikationen bezüglich seiner Funktion und Verbreitung in verschiedenen Spezies und experimentellen Ansätzen charakterisiert (Brümmendorf und Lemmon, 2001; Crossin und Krushel, 2000; Haspel und Grumet, 2003). Das Auftreten einer neuronalen Erbkrankheit als Folge von Mutationen des L1-Gens rückte dieses Protein in das Blickfeld der medizinischen Forschung.

In diesem Zusammenhang wurden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen über molekulare Mechanismen durchgeführt, die zur Pathogenität unterschiedlicher L1-Mutationen führen. Hierzu wurden die homophilen und heterophilen Wechselwirkungen von L1-Mutanten mit verschiedenen Liganden analysiert. Die Beeinträchtigung dieser Wechselwirkungen ist ein möglicher Mechanismus, der zur Ausbildung des CRASH-Syndroms führen kann (De Angelis et al. 1999). Ein weiterer Grund für die Ausbildung dieses Syndroms kann eine reduzierte Zelloberflächenexpression bestimmter L1-Mutanten sein (De Angelis et al. 1999; Moulding et al. 2000). Es ist anzunehmen, dass eine reduzierte Zelloberflächenexpression von L1, als auch Beeinträchtigungen homo- und heterophiler Wechselwirkungen unmittelbare Auswirkungen auf die Entwicklung axonaler Trakte ausüben. Daraus leiten sich zwei zentrale Fragestellungen ab:

- 1) Führen humanpathogene L1-Mutationen zu einer reduzierten Zelloberflächenexpression mutanter L1-Proteine ?
- 2) Beeinträchtigen humanpathogene L1-Mutationen das axonale Wachstum ?

Zur Aufklärung dieser Fragen sollen 25 verschiedene L1-Mutanten in CHO Zellen überexprimiert werden und deren Zelloberflächenexpression quantifiziert werden. Zur Untersuchung der Auswirkungen humanpathogener L1-Mutationen auf das axonale Wachstum soll ein *in vitro* Testsystem etabliert werden, mit dem das Neuritenwachstum

embryonaler Neuronen untersucht werden kann, die unterschiedliche L1-Mutanten exprimieren.

Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet die Charakterisierung von Neurotractin. Dieses IgSF-Molekül wurde ursprünglich im Huhn beschrieben. Hier zeigten erste Untersuchungen embryonaler Entwicklungsstadien, dass dieses Protein vorrangig auf axonalen Trakten zu finden ist (Marg et al. 1999).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, das zu Neurotractin orthologe Protein in der Maus zu identifizieren und charakterisieren.

Da die histologische Verteilung und deren entwicklungsabhängige Regulation Hinweise auf eine mögliche Funktion liefern, sollen diese mittels immunhistologischer Untersuchungen charakterisiert werden. Hierzu sollen polyklonale Antikörper gegen das in der Maus orthologe Neurotractin (mNTRA) hergestellt werden. Zur funktionellen Charakterisierung von mNTRA soll dessen Auswirkung auf das Neuritenwachstum primärer Neuronen mit verschiedenen *in vitro* Verfahren analysiert werden. Neben einer entwicklungsrelevanten Funktion für mNTRA, soll die mögliche Beteiligung bei plastizitäts-abhängigen Prozessen im adulten ZNS untersucht werden. Zu diesem Zweck ist vorgesehen die Verteilung von mNTRA nach einseitiger Läsion des entorhinalen Kortex zu analysieren.

Schließlich soll eine für mNTRA defiziente Mauslinie generiert werden. Dieses Mausmodell soll in der Zukunft den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen der *in vivo* Funktion von mNTRA darstellen.