

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material:

2.1.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden analysenrein von den Firmen Biochrom, Fluka, Merck, Roth und Sigma bezogen.

2.1.2. Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Amersham Pharmacia, MBI Fermentas, New England Biolabs und Roche Molecular Biochemicals bezogen.

2.1.3. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez synthetisiert

MS-NT4: GTG ACA AGT GGT CRG TGG ACC C

MS-NT6B: GTG TGY TGG GTY TGC ACA GAA

R = A/G; Y = T/C

UPPrime2-Sal1: TAT GTC GAC AGC AGC CTG GCA GGC ACG G

LowPrime1-Sal1: TAT GTC GAC CGT ACA GAC GGC CGA TTG TAT

KA-AscI-UP: TAT CTC GAG GCG CGC CCT CTG AAC TTC TCA GAT AGC TCA TCT TCC

KA-AscI-LP: TAT CTC GAG GGT CCA CTG ACC ACT TGT CAC C

ES2: CAC TGC AGA AGG CAA CAA TC

EX3: CCT TCTCTA GCC ATG CTT TGT AC

pQE-1: TAT GGA TCC GCC GGG CAG AGC GTG GAC TTC

pQE-2: TAG AAG CTT ACT CCC AGT AAT TCC ATA CTG GGC

abPrimer1UP: TAT GCT AGC AGC AGC CTG GCA GGC ACG G

abPrimer2low: TAT GGA TCC ACA GTG AGA TGA ACC TGC ATT G

neo 1L: CCT GCG TGC AAT CCA TCT TGT TCA ATG

2.1.4. PCR

Zur Durchführung der PCR wurden die Geräte „Master Cycler Gradient“ (Eppendorf) und Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) verwendet.

2.1.5. Plasmide:

pBluescript II SK+ (Stratagene)

pQE-30 (Qiagen)

pIG-Plus (R & D Systems)

pcDNA3 (Invitrogen)

pEGFP (Clontech)

pTV0 (Carmen Birchmeier)

2.1.6. Bakterienstämme:

E. coli DH5 α (FG Rathjen)

E. coli XL-1 blue (Stratagene)

2.1.7. DNA-Banken

E17 cDNA-Bank aus Gesamthirn der Maus (Stratagene)

BAC-4925 (Maus ES-Zellen vom Stamm 129/SvJ II; Incyte Genomics)

2.1.8. Antikörper

anti Synaptophysin-Antikörper: Synaptic Systems

anti hL1 Antikörper 4034: Fritz G. Rathjen

anti mL1-Antikörper: Fritz G. Rathjen

anti Neurotractin-Antikörper C11: Andreas Marg

anti PSD95-Antikörper: Upstate

anti F3-Antikörper: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G.Gennarini

anti MAP2-Antikörper: Boehringer

anti GFAP-Antikörper: Dako

anti GFAP-Antikörper: Boehringer

anti human Fc-Abschnitt-Antikörper: Dianova

sekundäre Antikörper: Dianova

2.1.9. Tiere, Gewebematerial und Zellen:

Hühnerembryonen (*Gallus gallus*) wurden aus befruchteten Bruteiern gewonnen (Fa. Lohmann Tierzucht). Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 65% Luftfeuchtigkeit. Das jeweilige Entwicklungsalter der Embryonen in Tagen wird mit En angegeben, wobei n = 0 den Tag der des Einlegens der Eier un den Brutschrank bezeichnet. Mäuse (C57Bl6) und Ratten (Wistar) wurden von der Tierzucht Schönwalde bezogen. Die Züchtung mNTRA-defizienter Mäuse, sowie der heterozygoten und Wildtyp-Tiere zu Vergleichszwecken, wurde in Kooperation mit der Fa. RCC durchgeführt. Die eukaryotischen Zelllinien COS-7 und CHO wurden von der FG Rathjen übernommen. ES Zellen (Stamm E14.1) und embryonale Fibroblasten wurden freundlicherweise von Carmen Birchmeier zur Verfügung gestellt.

2.1.10. Zellkultur

Für die Zellkultur wurden Produkte der Firmen Costar, Gibco BRL Life Technologies, LabTek, Millipore und Nunc verwendet.

2.2. Methoden:

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie z.B. Bakterienaufzucht, Medienherstellung, Agarosegelelektrophorese, Restriktionsenzymverdau oder Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden nach den in Sambrook et al. (1989) beschriebenen Protokollen durchgeführt.

2.2.1.1. Kompetente Bakterien, Ligation und Transformation

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach Hannahan (1985). Ligationen wurden nach Angaben des Herstellers mit T4 DNA-Ligase über Nacht bei 14°C durchgeführt. Für die Transformation kompetenter Bakterien wurden der Ligrationsansatz und die kompetenten Bakterien auf Eis für 30 min. inkubiert und 90 Sekunden auf 42°C erwärmt. Danach wurde für 3 min. auf Eis gekühlt, 900 µl LB-Medium zugegeben und für 1 h auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 2500 rpm in der Tischzentrifuge wurde das Pellet in 250 µl LB-Medium resuspendiert und auf Agarplatten über Nacht bei 37°C unter Verwendung von Antibiotika selektiert.

2.2.1.2. Plasmid-DNA Präparation

Plasmid –DNA wurde mit dem „Plasmid Midi Kit“ bzw. dem „Plasmid Mini Kit“ (Qiagen) präpariert.

2.2.1.3. BAC-DNA Präparation

Die Präparation von BAC-DNA erfolgte nach Angaben der Fa. Incyte Genomics.

2.2.1.4. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Fa. Invitak durchgeführt.

2.2.1.5. PCR

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten für die Klonierung von mNTRA und davon abgeleiteter Konstrukte erfolgte unter Verwendung der Pfu-Polymerase (Stratagene), die aufgrund ihrer 3`-5`-Exonukleaseaktivität eine geringe Fehlerquote aufweist. Die Durchmusterung genomischer Banken wurde von der Fa. Incyte Genomics mit Taq Polymerase durchgeführt (Gibco BRL Life Technologies). Die Überprüfung selektierter ES Zellklone, sowie die Genotypisierung von Mäusen erfolgte mit LA-Taq Polymerase (Takara).

2.2.1.6. Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach deren gelelektrophoretischer Auftrennung unter Verwendung von „QiaEX“, bzw. „QiaQuick“ (Qiagen) isoliert.

2.2.1.7. Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA selektierter ES Zellen, die durch Southern Blot und PCR auf eine homologe Rekombination überprüft werden sollten, wurden über Nacht bei 55°C in Puffer1 lysiert. Am nächsten Tag wurde die DNA unter Zugabe von 100% Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) gefällt und mehrmals mit 70 % Ethanol gewaschen. Die gefällte DNA wurde bei RT für 5 min. getrocknet und in TE-Puffer gelöst. Für die Genotypisierung von Mäusen wurde die genomische DNA mit dem „High Pure PCR Isolation Kit „ (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers isoliert.

Puffer1: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS; 0,5 mg/ml Proteinase K.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA.

2.2.1.8. Southern Blot Analyse

Die Sonden für die Southern Blot Analyse wurden unter Verwendung des „DIG DNA Labelling Mix“ nach Vorschrift des Herstellers durch PCR amplifiziert. Die Southern Blot Analyse wurde nach „The DIG System User`s Guide for Filter Hybridization“ durchgeführt. Alle verwendeten Materialien und Vorschriften stammten von Roche Molecular Biochemicals.

2.2.2. Biochemische Methoden und immunologische Methoden

2.2.2.1. Proteinexpression in Bakterien

Zur Expression von rekombinantem mNTRA in Bakterien wurde ein DNA-Abschnitt mit den Primern pQE-1 und pQE-2 amplifiziert, der für alle drei Ig-ähnlichen Domänen kodiert. Als Vektor diente das prokaryotische Expressionsplasmid pQE-30. Kloniert wurde über die Restriktionsschnittstellen HindIII und BamHI. Das klonierte Konstrukt pQE-30-mNTRA wurde in Bakterien transformiert und nach Aufschluß der Bakterien durch Ultraschall, wurde die erhaltene Suspension für 30 min. bei 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Ni²⁺-NTA-Säule (Qiagen) aufgetragen. Das verwendete Expressionsplasmid enthält sechs His-Epitope, die in Fusion mit dem rekombinanten mNTRA exprimiert werden. Über diese His-Tags bindet das rekombinante Protein an die Säule. Nach zehn Waschschritten mit Puffer I und fünf Waschschritten mit Puffer II wurde das Fusionsprotein eluiert.

Waschpuffer I: 100mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl, pH 7,0

WaschpufferII: 100mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 60mM Imidazol, pH 7,9

Elutionspuffer: 100mM NaH₂PO₄; 10 mM Tris-HCl; 500mM Imidazol, pH 7,0

2.2.2.2. Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

Für die Expression von rekombinantem mNTRA in COS-7 Zellen wurde ein DNA-Abschnitt mit den Primern „abPrimer1UP“ und „abPrimer2low“ amplifiziert, der für die ersten zwei Ig-ähnlichen Domänen von mNTRA kodiert. Der DNA-Abschnitt wurde in das eukaryotische Expressionsplasmid pIg-Plus über die Restriktionsschnittstellen NheI und BamHI kloniert. Dieses Plasmid kodiert für den humanen IgG₁ Fc-Abschnitt, der in Fusion mit dem entsprechenden Protein exprimiert wird. Das mNTRA-Konstrukt wurde in COS-7 Zellen transfiziert und einen Tag nach der Transfektion für fünf Tage in DMEM / 1 % FCS

kultiviert. Nach dieser Zeit wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für 15 min. bei 4°C und 10.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf eine ProteinA-Sepharose-Säule aufgetragen und mit dem 30fachen Säulenvolumen PBS gewaschen. Die Elution wurde mit 0,58% HCl/150mM NaCl durchgeführt. Nach erfolgter Elution wurde mit 1/10 Volumen Tris-HCl, pH 8,8 neutralisiert. Das eluierte Fusionsprotein wurde daraufhin gegen PBS dialysiert und über SDS-PAGE mit anschließender Silbernitratfärbung analysiert.

2.2.2.3. SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Für die immunologische Detektion von Proteinen wurden diese in der SDS-PAGE aufgetrennt. Hierzu wurden die Proteine mit Laemmlipuffer versetzt und durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer „Mini Protean II“-Apparatur bei 180 mV aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Größen aufgetrennter Proteine wurden mit Hilfe eines Massenstandards ermittelt. Die aufgetrennten Proteinbanden wurden durch Silbernitrat-Färbung sichtbar gemacht (Ansorge, 1985). Zur immunologischen Detektion von Proteinen mittels Western Blot wurden die Proteine mit einer Transblot-Apparatur auf Nitrocellulosemembranen transferiert (1h, 340 mA, 4°C). Die Membranen wurden daraufhin zur Blockierung freier Bindungsstellen mit Blockpuffer für 1h bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurden die Membranen einmal mit Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II für jeweils 10 min. gewaschen und für 1h mit HRP-gekoppelten sekundären Antikörpern in Waschpuffer II inkubiert. Danach wurde wie zuvor gewaschen, wobei die Dauer der einzelnen Waschschrte 15 min. betrug. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Detection-Kit“ nach Angaben des Herstellers (Pierce). Alle Apparaturen und Reagenzien wurden von der Fa. BioRad bezogen.

5x Laemmlipuffer: 60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10% SDS; 10% β -Mercaptoethanol;

50% Glycerin; 1,5% Bromphenolblau.

Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin; 0,1% SDS

Transferpuffer: 25mM Tris/HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin; 20% Methanol

Blockpuffer: 4% Magermilchpulver, 0,5% Tween; 1xPBS

Washpuffer I: 0,2 % Tween 20; 1xPBS

Washpuffer II: 0,05 % Tween 20; 1xPBS

2.2.2.4. Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Es wurden 600 mg CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) für 2 Stunden in 5 ml 1mM HCl aufgequellt. Die Sepharose wurde danach in eine Säule gefüllt und mit 120 ml 1mM HCl gewaschen und mit 20 ml H₂O neutralisiert. Daraufhin wurde die Sepharose mit 10 ml, 100mM NaHCO₃ aktiviert. Das zu koppelnde Protein wurde anschließend über Nacht bei RT bei leichter Rotation an die Sepharose gebunden. Freie Bindungsstellen wurden mit 100 ml 100 mM Ethanolamin, sowie 50 ml PBS / 1% BSA geblockt. Abschließend wurde die Säule mit PBS / 0.1 % Natriumazid gewaschen und bei 4°C aufbewahrt. Die Herstellung der CNBr-Sepharose 4B-Säule wurde freundlicherweise von Dieter Jobsky durchgeführt.

2.2.2.5. Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern

Kaninchen wurden mit einer Suspension von 50-100 µg rekombinantem mNTRA-Fusionsprotein in komplettem Freund's Adjuvant (Gibco) immunisiert. Die Injektionen wurden mehrmals in einem Rhythmus von zwei Wochen wiederholt. Antiseren immunisierter Kaninchen wurden zur Erhöhung der Spezifität durch Affinitätschromatographie über eine CNBr-Sepharose 4B-Säule mit kovalent gebundenen mNTRA-Fc-Fusionsprotein aufgereinigt.

2.2.2.6. Herstellung von Proteinextrakten aus Zellkulturen und Gewebeproben

Gewebe bzw. Zellen wurden in zehnfachen Volumen / Gewicht Homogenisationspuffer mit Proteaseinhibitoren in einem Glashomogenisator zerkleinert und anschließend mit Hilfe einer feinen Kanüle (Ø 0,4mm) vollständig homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat für 10 min. bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit Laemmli-Puffer versetzt.

Homogenisationspuffer: 150 mM NaCl, 0,32 M Saccharose, 2 mM EDTA, HEPES, PBS.

Proteaseinhibitoren: (40U/ml Aprotinin; 10 µM Pepstatin, 10 µM Leupeptin; 200 µM Phenylmethylsulfonylfluorid).

2.2.2.7. Enzymatische Deglykosylierung von Proteinen

Hierzu wurde ein Gemisch der Enzyme Endoglycosidase-F und Peptid-N-Glykosidase F (Oxford Glyco Systems) aus *Flavobacterium meningosepticum* verwendet, das eine vollständige Abspaltung von N-Glycanen gewährleistet. Zunächst wurde Hirngewebe adulter Mäuse (P24) in einem 10fachen Volumen Puffer¹ extrahiert. Dann wurden 100 µl des Extrakts mit 11 µl 10% SDS vermischt und für 2 min bei 95°C denaturiert. Danach wurden 15 µl 10 x PBS, 25 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 und 15 µl Triton X-100 hinzupipettiert und auf 250 µl mit H₂O

aufgefüllt. Die Probe wurde erneut für 2 min auf 95°C erhitzt und dann nach Zugabe der N-Glykosidasen für 2 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde Hirnextrakt auf die gleiche Weise behandelt, allerdings ohne eine Zugabe von N-Glykosidasen. Nach Ablauf der Inkubation wurden 25µl Laemmli-Puffer mit β-Mercaptoethanol den Proben zugegeben und 35µl der jeweiligen Ansätze auf ein SDS-Gel geladen.

2.2.2.8. Enzymatische Abspaltung des GPI-Ankers

Mit Hilfe des Enzymes Phosphatidyl-Inositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) können Proteine, die über einen GPI-Anker mit der Membran verbunden sind, von dieser losgelöst werden (Low und Saltiel, 1988). Zu diesem Zweck wurde Hirngewebe adulter Mäuse in einem zehnfachen Volumen 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) und Proteaseinhibitoren homogenisiert. Danach wurden 100 µl Homogenisat mit 0,05 U PI-PLC für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 84.000g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Das sedimentierte Pellet wurde in 100 µl 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) resuspendiert und gemeinsam mit dem Überstand und dem entsprechenden Kontrollansatz ohne PI-PLC-Verdau über SDS-PAGE aufgetrennt. Es wurde nun untersucht, ob das zu analysierende Protein glycosylphosphatidylinositol-verankert ist (nach Wolff et al., 1989).

2.2.2.9. Präparation von Membranfraktionen aus CHO Zellen

Hierzu wurden zunächst CHO Zellen mit dem Konstrukt pcDNA3-mNTRA und als Kontrolle mit dem Vektor pcDNA3 stabil transfiziert und für insgesamt 20 Tage unter Zugabe von G418 (Sigma) selektiert. Selektierte Zellen wurden im fünffachen Volumen Homogenisationspuffer aufgenommen und mit Hilfe einer feinen Kanüle (Ø 0,4mm) homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 30.000g für 20 min. bei 4°C. Das Pellet wurde in dem zur Ausgangsmenge zehnfachen Volumen 2,25 M Saccharose homogenisiert. Jeweils 10 ml Homogenisat wurden mit 5 ml 0,8 M Saccharose überschichtet und für 1.5 h bei 4°C und 100.000g zentrifugiert. Die Membranen befinden sich in der Interphase des Saccharose-Gradienten. Sie wurden abgenommen zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 30.000g für 20 min. bei 4°C zentrifugiert.

2.2.2.10. Affinitätsreinigung von NgCAM aus Plasmamembranen von adultem Hühnerhirn

Plasmamembranen aus adultem Hühnerhirn wurden in Lysispuffer (1 % TritonX-100, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.4) homogenisiert und für 1h bei 100.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst auf eine Sepharose 4B-Säule geladen, um an der Sepharosematrix unspezifisch bindende Proteine abzureichern. Der Durchlauf wurde daraufhin auf eine CNBr-aktivierte Sepharose-4B-Säule geladen, an die zuvor der monoklonale anti-NgCAM-Antikörper 12-I-4E-311 gekoppelt wurde. Dieser Schritt wurde über Nacht durchgeführt. Danach wurde die Säule mit 60ml TBS/1%Triton und 200ml PBS gewaschen und mit 20ml 0,1M DEA/0,5% DOC, pH 11,5 eluiert. Dem Eluat wurden zur Neutralisation 2ml 1M Tris (pH 6,8) zugegeben. Letztlich wurde das neutralisierte Eluat bei 4°C über Nacht gegen PBS dialysiert und in einer Druckdialysekammer mit einer Membran der Ausschlußgrenze 10 kD (Amicon) eingeeengt und die Proteinkonzentration nach der Methode von Lowry bestimmt. Diese Aufreinigung wurde freundlicherweise von Dieter Jobsky übernommen.

2.2.2.12. Herstellung von subzellulären Fraktionen aus dem Mausgehirn

Die Isolation subzellulärer Fraktionen aus dem Mausgehirn wurde in leicht abgewandelter Form nach dem Protokoll von Carlin et al. (1980) durchgeführt. Alle Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, bei einer Temperatur von 4°C verwendet und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Von jeder Fraktion wurden Aliquots abgenommen. Für die Präparation der subzellulären Fraktionen wurden 5g Hirngewebe von adulten Mäusen in 50 ml Homogenisationspuffer im Potter 12 mal bei 900 rpm homogenisiert. Es folgte die Zentrifugation des Homogenisats für 10 min. bei 1000g. Daraufhin wurde der Überstand (S1) abgenommen und auf Eis gelagert. Das sedimentierte Pellet (P1) wurde in 50 ml Homogenisationspuffer resuspendiert, erneut im Potter homogenisiert und für 10 min. bei 1000g zentrifugiert. Der Überstand (S1') wurde mit der Fraktion S1 vereinigt und für 15 min. bei 12.000g zentrifugiert. Der Überstand (S2) wurde abgenommen und das Pellet (P2) in 10ml/g Pellet Homogenisationspuffer gewaschen und im Potter sechsmal bei 900 rpm homogenisiert. Dann wurde das homogenisierte Pellet erneut für 15 min. bei 12.000g zentrifugiert und in Lösung B resuspendiert (1,5ml/g Pellet). Zur Isolation der Nervenendigungen (Synaptosomen) wurde die aufgereinigte Membranfraktion auf einen Stufengradient von 0,85 M, 1 M und 1,2 M Saccharose geladen und bei 85.000g für 2h

zentrifugiert. Nach dieser Zentrifugation sedimentierten die Synaptosomen in der Interphase zwischen 1 M und 1,2 M Saccharose. Die Synaptosomen wurden mit einer gebogenen Pasteurpipette abgenommen und einem hypoosmotischen Schock unterzogen. Hierzu wurde diese Fraktion mit dem fünffachen Volumen eines niedermolekularen Tris-Puffers (5mM Tris/HCl, pH8,1; 1mM DTT) lysiert und bei 0°C für 30 min. gerührt. Nach dieser Behandlung wurde die Lösung für 30 min. bei 33.000g zentrifugiert. Das Pellet (P3) das nun die synaptosomalen Membranen enthielt, wurde in 1,5ml / g Pellet Tris-Puffer resuspendiert und auf einen Stufengradient von 1M, 1,5M und 2M Saccharose geladen. Es folgte eine Zentrifugation bei 85.000g für 2h, nach der die Interphase zwischen 1,5 M und 2 M abgenommen wurde. Die in dieser Fraktion enthaltenen synaptischen Verbindungen (*synaptic junctions*) wurden mit dem fünffachen Volumen Lösung C aufgenommen und für 15 min. bei 0°C gerührt. Daraufhin wurde für 30 min. bei 33.000g zentrifugiert. Das resultierende Pellet (P4) entspricht der PSD-Fraktion 1 (PSD1). Die Extraktion des Pellets P4 in Lösung C wurde wie zuvor beschrieben wiederholt. Das Pellet (P5) entsprach der PSD-Fraktion 2 (PSD2) wurde in 1,5 ml Lösung B resuspendiert und in Ultrazentrifugenröhrchen mit 10,5 ml vorgelegter 1,5 M Saccharose pipettiert. Es wurde über Nacht bei 200.000g zentrifugiert und das Pellet P6 (PSD3) in einer geeigneten Menge 50 mM HEPES, pH 7,2 aufgenommen und zusammen mit den Aliquots der anderen Fraktionen bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Lowry.

Homogenisationspuffer: 0,32 M Saccharose; 5 mM HEPES, pH 7,4
Lösung B: 0,32 M Saccharose; 5mM Tris/HCl, pH8,1
Lösung C: 0,32 M Saccharose 5mM Tris/HCl, pH8,1; 1mM DTT;
0,5 % TritonX-100.
Tris-Puffer: 5mM Tris/HCl, pH8,1;1mM DTT

2.2.3. Zellkulturtechniken

2.2.3.1. Präparation und Kultivierung primärer Neuronen

Für die Herstellung von primären Neuronenkulturen wurden neugeborene Ratten oder Mäuse dekapitiert, das Gehirn entnommen, zweimal in eiskalten PBS gespült und in EBSS-Medium überführt. Die Präparation der Hippokampi erfolgte in eiskalten EBSS. Die entnommenen Hippokampi wurden in kleine Stücke zerschnitten, in ein 10 ml Falco-Röhrchen überführt und für 15 min. in 5ml EBSS / 0,25% Trypsin im Inkubator (37°C; 5% CO₂) inkubiert. Nach der Inkubation wurden 5ml DMEM / 10% FCS, 200 µl DNaseI (0,5mg/ml) und 150 µl 1M MgSO₄ zupipettiert. Danach wurden die Zellen mit einer verengten Pasteurpipette schonend vereinzelt und das Röhrchen für 45 Sekunden stehen gelassen, damit sich größere Gewebestücke absetzen konnten. Dann wurden 9ml des Überstands in ein neues Röhrchen überführt und ein Aliquot für die Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Die Zählung erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Während der Zählung wurden die Zellen für 5 min. bei 1000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge NB-Medium resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte in 24 Lochplatten, wobei 500 µl NB-Medium pro Loch verwendet wurden. Nach 4 Stunden Kultivierung wurde das Medium zu 4/5 durch frisches Medium ersetzt. Die Kultivierungsdauer und Konzentration der ausgesäten Zellen wurde dem jeweiligen Zweck des Versuchs angepasst. Bei Zellen, die länger als zwei Tage kultiviert wurden, erfolgte nach jeweils zwei Tagen ein Mediumwechsel von 4/5 des Ausgangsvolumen.

2.2.3.2. Herstellung stabil transfizierter CHO Zellen

CHO Zellen wurden mit Lipofectamin2000 (Invitrogen) und den entsprechenden linearisierten Konstrukten nach Angaben des Herstellers transfiziert. Danach wurden die Zellen für zwölf Tage mit G418 (1mg/ml) in DMEM /10 % FCS selektiert, bis einzelne Zellklone sichtbar wurden. Diese wurden isoliert und in 48-Lochplatten vereinzelt und weitere sieben Tage selektiert. Selektierte Klone wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen mNTRA auf deren Expression getestet, als Kontrolle dienten Klone, die mit pcDNA3 ohne Insert transfiziert wurden.

2.2.3.3. Kokulturen zur Analyse des mNTRA-vermittelten Neuritenauswuchs

Für die Kokultur von Zellen wurden 8 Loch-Glasobjektträger (Costar) mit 50µg/ml PLL über Nacht bei 4°C beschichtet, zweimal mit PBS gewaschen und die COS-7 Zellen darauf ausgesät. Diese wurden für 24h kultiviert, so dass sie einen konfluenten Zellrasen bildeten. Die verwendeten COS-7 Zellen wurden zuvor mit pcDNA3-mNTRA, bzw. dem Vektor pcDNA3 alleine, transient transfiziert. Die Präparation der primären Neuronen erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Protokoll. Es wurden 300 Zellen / mm² auf den konfluenten Zellrasen ausplattiert und im Inkubator kultiviert. Nach 48h wurden die Zellen mit 3,7% PFA/PBS für 15 min fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und auf Eis für 4 min. mit PBS/0,2% Triton X-100 permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Kulturen für 30 min. mit 10% Ziegenserum blockiert. Die Färbung der Neuronen wurde mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker MAP2 durchgeführt. Dieses Protein ist in den Dendriten differenzierter Neuronen exprimiert. Es eignet sich jedoch auch zur Anfärbung auswachsender Neuriten, die sich noch nicht in Dendriten und Axone differenziert haben. Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss Invertmikroskop, sowie dem Axiocam Bildverarbeitungssystem. Hierzu wurden Neuriten gewählt, die keinen unmittelbaren Kontakt mit anderen Zellen aufwiesen. Zellen, die mehr als 4 Ausläufer aufwiesen, wurden nicht analysiert. Bei Neuronen, die mehrere Neuriten ausbildeten, wurde nur der längste Neurit gemessen.

2.2.3.4. Streifenassay (in Kooperation mit Nicolai Savaskan)

Für den Streifenassay wurden Nucleopore Polycarbonat Filtermembranen (0,4 µm Poren, Millipore) verwendet, die mit einer Lösung aus 20 µg/ml PLL und 100 µg/ml Kollagen für 1 h bei 37°C vorbeschichtet wurden. Die Membranen wurden in Anlehnung an Walter et al. (1987) mit einer Apparatur von Dr. F. Bonhoeffer angefertigt. Dabei wurde das entsprechende Substrat mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch die Filtermembranen gesaugt, die durch den Aufsatz einer speziellen Matrize in alternierenden Streifen auf der Membran angeordnet wurden. Die Membranen wurden zur Überprüfung eines regulären Streifenmusters mit fluoreszierenden Kügelchen versetzt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Daraufhin wurden die beschichteten Nucleopore Filter in sterile Millicell-Behälter (Millipore) mit 1,5 ml Medium überführt (DMEM/2mM Glutamin, 0,6 % Glukose, 100U / ml Penicillin, 100 µg / ml Streptomycin, 12 % FCS). Die hippokampalen Explantate wurden aus E20 Embryonen präpariert und auf den Nucleopore Filtern für 5 Tage im Inkubator (5 % CO₂, 37°C) kultiviert. Nach dem ersten Tag der Kultivierung wurden dem Kulturmedium 8 µm

Cytosinarabinosid zugefügt. Zur Visualisierung der Explantate wurde diese mit Rhodamin-Dextran gefärbt, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und mit Immu-Mount (Shandon, USA) eingedeckelt. Die Analyse des Streifenassays wurde mit zwei Beobachtern durchgeführt. Die Auswachspräferenz wurde durch ein Drei-Klassen-System in Anlehnung an Bähr und Wizenmann (1996) semiquantitativ ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Statview (Abacus, USA) unter Verwendung des chi-Quadrat Tests.

2.2.4. *In vitro* Testsystem zur Analyse des Einflusses von L1-Mutanten auf das homophil vermittelte Neuritenwachstum

2.2.4.1. Beschichtung von Petriperm Kulturschalen

Auf den Boden der Petriperm Kulturschalen wurden Kunststoffgitter (LabTek) aufgeklebt, die eine Fläche von 10 mm² / Feld aufwiesen. Die Beschichtung der Felder erfolgte einen Tag vor der Durchführung des Experiments mit 25 µg NgCAM / ml PBS über Nacht bei 4°C. Am Tag der Präparation wurden die Schalen vor dem Aussähen der transfizierten Zellen zweimal 15 min. mit DMEM / 10 % FCS bei RT gewaschen.

2.2.4.2. Präparation und Transfektion primärer Neuronen

Für diesen Assay wurden E7-Hühnerembryonen verwendet, d.h. befruchtete Eier wurden für 7 Tage im Brutschrank künstlich bebrütet. Die Eier wurden geöffnet und der Hühnerembryo zweimal mit eiskaltem PBS gespült und in eine Kulturschale mit eiskaltem HBSS-Medium überführt. Das Tektum wurde in einem Stück entfernt und die Hirnhäute vorsichtig entfernt. Die Präparation erfolgte in eiskaltem HBSS-Medium. Danach wurde das Gewebe in 5ml HBSS / 0.25 % Trypsin überführt, 2-3 mal mit der Glaspipette grob zerkleinert und für 10 min. im Inkubator (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Transfektion der Zellen vorbereitet. Hierzu wurden jeweils 1 µg cDNA, der zu untersuchenden L1-Mutante und 0,4 µg EGFP-cDNA in 25 µl OptiMem aufgenommen. Dann wurden 47 µl OptiMem mit 3 µl Lipofectamine für 5 min. bei RT inkubiert und mit der cDNA-Lösung vereinigt und für weitere 15 min. bei RT inkubiert. Inzwischen wurde der Trypsin-Verdau durch Zugabe von 5ml DMEM / 10 % FCS abgestoppt und das Gewebe durch Trituration mit einer verengten Glaspipette vereinzelt. 50 µl wurden zur Bestimmung der Zellzahl abgenommen. Die übrigen Zellen wurden für 5 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in einer

entsprechenden Menge OptiMEM aufgenommen, so dass die Konzentration 3×10^7 Zellen / ml betrug. Nun wurden jeweils 50 μ l (entspricht $1,5 \times 10^6$ Zellen) pro Transfektionsansatz zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde für 45 min. bei 37°C inkubiert und daraufhin mit DMEM / 20% FCS auf 300 μ l aufgefüllt. Nun wurden jeweils 100 μ l Zellsuspension pro Feld ausplattiert und für 20 h im Brutschrank inkubiert. Zur Fixierung der Kulturen wurden pro Feld 50 μ l des Mediums entnommen und durch 50 μ l 3,7% FA/PBS ersetzt. Nach 10 min. bei RT wurde das gesamte Medium mit 3,7% FA/PBS ersetzt und für weitere 15 min. bei RT fixiert. Anschließend wurden die Kulturen mit 50% Glycerol / PBS bedeckt und bis zur Auswertung bei 4°C gelagert.

2.2.4.3. Quantifizierung der Neuritenlängen

Die Auswertung erfolgte mit einem Zeiss Invertmikroskop, sowie dem Axiocam Bildverarbeitungssystem. Zur Messung der Neuritenlänge wurden ausschließlich Zellen vermessen, die das Reportergen EGFP exprimierten. Für diese Zellen wurde gezeigt, dass sie gleichzeitig das eingeschleuste L1-Konstrukt exprimieren. Des Weiteren wurden Zellen gewählt, die keinen unmittelbaren Kontakt mit anderen Zellen aufwiesen. Bei Neuronen, die mehrere Neuriten ausbildeten, wurde nur der längste Neurit gemessen.

2.2.5. Methode zur Bestimmung der Zelloberflächenexpression von L1 in CHO Zellen

Die transfizierten CHO Zellen wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen humanes L1 immunzytologisch gefärbt und die optische Dichte, die sich proportional zur Expressionsstärke verhält mit einem automatisierten digitalen Messsystem ermittelt. Die ermittelten Werte für die einzelnen Mutanten wurden gegenüber Wildtyp-L1 normalisiert, welches somit eine Oberflächenexpression von 100% aufweist. Kultivierung, Transfektion und Auswertung der Oberflächenexpression der verschiedenen L1-Mutanten wurde durchgeführt wie beschrieben (De Angelis et al. 2002).

2.2.6. Histologische Methoden

2.2.6.1. Immunhistologie

Immunhistologische Färbungen von Kryostatschnitten wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt. Zuerst wurden die zu färbenden Schnitte zweimal mit PBS gewaschen, um verbliebenes Einbettmedium zu entfernen. Es folgte eine Inkubation in PBS / 10 % Ziegen-

Serum für 1 h bei RT. Der primäre Antikörper wurde in PBS / 5 % Ziegen Serum verdünnt und die Schnitte bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurde fünfmal für jeweils fünf Minuten mit PBS / 0.1 % Tween20 gewaschen, sowie nochmals für 30 Minuten mit PBS / 10 % Ziegen Serum blockiert. Der fluoreszenz-konjugierte zweite Antikörper wurde für 1,5 h bei RT inkubiert. Danach folgte fünfmaliges Waschen mit PBS / 0.1 % Tween20. Optional wurde eine Kernfärbung mit Bisbenzimid durchgeführt. Schließlich wurden die Schnitte in Mowiol eingedeckelt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.6.2. Immunzytologie

Färbungen von Zellkulturen wurden wie oben angegeben durchgeführt. Sollte ein intrazelluläres Protein detektiert werden, wurde vor der ersten Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegen Serum, eine fünfminütige Inkubation mit PBS/0.2% TritonX-100 zur Permeabilisierung der Zellmembran durchgeführt.

2.2.6.3. Nissl-Färbung

Hierzu wurden Kryostatschnitte für 1 – 10 min in Kresylviolett-Lösung gefärbt. Danach wurden die Zellen kurz in Acetatpuffer (125 mM Na-Acetat, pH 6,0) getaucht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 min entwässert. Die Einbettung erfolgte in Permount Einbettmedium.

2.2.7. Entorhinale Kortexläsion (in Kooperation mit Anja Bräuer)

Männliche Mäusen mit einem Körpergewicht von 20 – 25 g wurden mit einer Lösung von 25 mg/ml Ketamin, 1,2 mg/ml Xylazin und 0,35 mg/ml Acepromazin in 0,9 % NaCl anästhesiert. Hierzu wurden 0,1 ml / 10g Körpergewicht verwendet. Für die Läsion wurden die Tiere am Kopf rasiert und in einen stereotaktischen Kopfhalter eingespannt. Die Augen wurden mit einer Zellstoffbinde abgedeckt, die mit 0,09 % NaCl-Lösung getränkt war. Das Messer wurde durch Ausrichtung der Lambda-Naht des stereotaktischen Geräts, an der Sagittalnaht des Schädelknochens justiert. Danach wurde das Messer 0,4 Skaleneinheiten nach vorn und 1,4 Skaleneinheiten nach rechts verschoben. Es folgte das Aufbohren des Schädels, so dass die Klinge eingeführt werden konnte. Das Messer wurde soweit eingeführt, bis die Schädelbasis erreicht wurde. Nach Läsion wurde die Wunde zugenäht. Für die folgenden Untersuchungen wurden Tiere, verwendet, die für 2, 5 und 16 Tage überlebten. Dabei wurden drei Tiere je Läsionsstadium untersucht.

2.2.8. Methoden zur Generierung defizienter Mäuse

2.2.8.1. Durchmustern einer genomischen Bank (in Kooperation mit Incyte Genomics)

Murine genomische Banken, repräsentiert durch BAC-Klone (*bacterial artificial chromosomes*) wurden durch PCR unter Verwendung der Primer MS-NT4 und MS-NT6b durchsucht. Die gefundenen positiven BAC-Klone wurden als Agar-Stabkulturen zur Verfügung gestellt.

2.2.8.2. Klonierung des Zielvektors

Positive BAC-Klone wurden gemäß ihrer Restriktionsstellen durch Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen kartiert und geeignete Fragmente des mNTRA-Gens in den Zielvektor pTV0 subkloniert.

2.2.8.3. Transfektion, Kultivierung und Selektion von ES Zellen

ES Zellen wurden auf konfluenten embryonalen Fibroblasten in ES Kulturmedium kultiviert (DMEM, 15 % FCS, 2 μ m β -Mercaptoethanol, 100 U / ml Penicillin, 100 μ g / ml Streptomycin). Um einer Differenzierung der ES Zellen entgegen zu wirken wurde Zellkulturüberstand LIF-produzierender Zellen (*leukemia inhibitory factor*) in einer Verdünnung von 1:10.000 beigefügt (zur Verfügung gestellt von C.Birchmeier). Fibroblasten wurden zuvor Mitomycin-C behandelt. Für die Transfektion der ES-Zellen ($1,2 \times 10^7$ Zellen / ml) durch Elektroporation wurden 15-20 μ g des linearisierten Zielvektors verwendet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen für 10 Tage im Inkubator (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Die Selektion der ES Zellklone erfolgte durch Zugabe von G418 (350 μ g/ml) am darauf folgenden Tag für 7 Tage, sowie der Zugabe von 2 μ M Gancyclovir am fünften Tag der Kultivierung für 3 Tage. Nach 8 Tagen Selektion wurden die einzelne ES Zellklone in 96-Lochplatten überführt. Vereinzelte ES Zellklone wurden für weiter 4-5 Tagen auf embryonalen Fibroblasten in 96-Lochplatten kultiviert.

2.2.8.4. Analyse selektierter ES Zellklone

Für die Analyse der Klone wurden auf 96-Lochplatten kultivierte ES Zellklone dupliziert und jeweils ein Duplikat bei -80°C eingefroren und das andere Duplikat für eine Analyse durch Southern Blot bzw. PCR vorbereitet. Zur Überprüfung der selektierten ES-Zellklone wurden zwei DIG-markierte Sonden durch PCR mit LA-Taq Polymerase (Takara) generiert. Die selektierten ES Zellklone wurden unter Verwendung der Primer EX3 und neo1L auf die

korrekte Integration der Neomycin-Kassette bzw. auf die korrekte Integration des kurzen Arms überprüft. PCR-positive Klone wurden daraufhin durch Southern Blot analysiert.

2.2.8.5. Generierung von chimären und Züchtung von mNTRA-defizienter Mäusen

Die homolog rekombinierten ES Zellen wurden in Blastocysten injiziert, die in scheinträchtige Mäuse transplantiert wurden. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Daniela Nebenius-Oosthuizen des Biozentrums Basel durchgeführt. Chimäre Mäuse wurden mit C57Bl6-Mäusen gekreuzt und deren Nachkommen auf eine erfolgreiche Vererbung der Mutation durch Genotypisierung überprüft.

2.2.8.6 Genotypisierung von Mäusen

Die Genotypisierung von mutanten bzw. Wildtyp-Mäusen erfolgte über PCR mit den Primern ES2 und EX3. Hierfür wurde folgendes Temperaturprofil je Zyklus (30x) verwendet:

Temperatur(°C)	95	60	72
Zeit	30 s	30 s	1 min 30 s

Die PCR-Ansätze wurden anschließend über ein 1,2 % Agarosegel bei 100 mV aufgetrennt.