

### 3.2. Ergebnisse Neurotractin

Das IgSF-Mitglied Neurotractin wurde 1999 von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe aus dem ZNS embryonaler Hühner isoliert und charakterisiert (Marg et al. 1999). Aufgrund der experimentellen Möglichkeit zur Inaktivierung von Genen in der Maus, war es Gegenstand dieser Arbeit, die homologe Form von Neurotractin aus der Maus (mNTRA) zu klonieren und dessen Verteilung und Funktion zu untersuchen.

#### 3.2.1. Klonierung von mNTRA aus der Maus

Zur Klonierung von mNTRA wurden zunächst die Sequenzen von Neurotractin aus dem Huhn und dessen putativen Homolog aus der Ratte miteinander verglichen. Für die Amplifikation der cDNA wurden dann verschiedene degenerierte PCR-Primer synthetisiert, die im 3'-Bereich vor dem Startkodon und im 5'-Bereich hinter dem Stopkodon hybridisieren sollten. Als Matrize für die PCR-Reaktion diente eine cDNA-Bank aus E17 Maushirn (Stratagene). Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in den Vektor Bluescript SK<sup>+</sup> kloniert und zur Überprüfung sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit den Programmen BLASTN und BLASTX der Datenbankplattform HUSAR (DKFZ) mit vorhandenen Datenbankeinträgen verglichen. Die größten Übereinstimmungen der übersetzten Aminosäuresequenz wurde mit denen von Huhn Neurotractin (80 %) und Ratten Kilon (99,4 %) ermittelt. Abbildung 11A zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von mNTRA (mm) und Neurotractin aus dem Huhn (gg). Weiterhin zeigten sich hohe Übereinstimmungen mit anderen Mitgliedern der IgLON Familie aus. Diese Übereinstimmungen beschränkten sich auf Vertebraten. Es wurden keine signifikanten Ähnlichkeiten zu Proteinen aus *Drosophila* und anderen Invertebraten gefunden, was auf eine Entstehung der IgLON Familie in Vertebraten hinweist.

Die klonierte cDNA wurde in Anlehnung an das ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe identifizierte Neurotractin, als Maus Neurotractin bezeichnet (mNTRA) (Datenbankeintrag: AJ487032.1). Im Laufe dieser Arbeit wurde, ermöglicht durch Beendigung des humanen Genomprojekts (Venter et al., 2001; Lander et al., 2001), das humane Ortholog von mNTRA durch SPDI (*the secreted protein discovery initiative*) identifiziert. Dieses weist eine Übereinstimmung von 95,4 % zu mNTRA auf und wurde mit NEGR-1 (*neuronal growth regulator-1*) bezeichnet (Datenbankeintrag: NM 173808.1). In Abbildung 11B und 11C sind



### 3.2.2. Bestimmung der Genstruktur von mNTRA

Zur Abschätzung der Exon-Intron Strukturen der Gene von mNTRA aus der Maus und dessen homologen Formen aus der Ratte (Kilon) und dem Mensch (NEGR-1) *in silico*, wurden deren cDNA-Sequenzen gegen spezies-spezifische genomische Datenbanken verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Die Position von NEGR-1 wurde dabei in der cytogenetischen Karte auf Chromosom 1 in den Regionen 1p31.3 und 1p31.2, mNTRA auf Chromosom 3 in den Regionen 3H3 und 3H4 und Kilon auf Chromosom 2 in der Region 2q45 lokalisiert. Sowohl mNTRA, als auch NEGR-1 und Kilon werden durch 7 Exons kodiert (Tab. 5). Das erste Exon kodiert für das Signalpeptid, während jeweils zwei Exons für jeweils eine Ig-ähnliche Domäne kodieren. Dabei ist die Kodierung der Ig-Domänen durch jeweils 2 Exons charakteristisch für IgSF-Mitglieder (Plagge und Brümmendorf, 1997). Die untersuchten Exon/Intron Strukturen dieser Gene weisen eine hohe Konservierung auf. Bemerkenswert sind die außergewöhnlich großen Introns von mNTRA, Kilon und NEGR-1. Für Mitglieder der IgSF wurden bereits besonders große Introns beschrieben (Hassel et al., 1997; Plagge und Brümmendorf, 1997). Sie enthalten vermutlich Elemente zur Steuerung der zeitlichen und räumlichen Genexpression (Hassel et al., 1997; Kallunki et al., 1995; Edelman et al., 1998). Die folgende Tabelle (Tab. 5) zeigt einen Vergleich der Exon/Intron Strukturen von mNTRA, Kilon und NEGR-1.

Exon	Intron	mNTRA (mm)	Kilon (rn)	NEGR-1 (hs)
1		181 bp	181 bp	185 bp
	1	297,0 kb	297,8 kb	347 kb
2		234 bp	234 bp	230 bp
	2	156,5 kb	138,4 kb	158,97 kb
3		125 bp	125 bp	125 bp
	3	52,8 kb	53,7 kb	146,26 kb
4		133 bp	133 bp	133 bp
	4	76,9 kb	86,8 kb	78,03 kb
5		121 bp	121 bp	121 bp
	5	14,25 kb	14,35 kb	18,06 kb
6		150 bp	150 bp	151 bp
	6	151,81 kb	165,52 kb	185,24 kb
7		235 bp	235 bp	243 bp
chromo- somale Position		3H3 / 3H4	2q45	p31. 2 / p31.3

Tabelle 5: Vergleich der Exon/Intron Strukturen von mNTRA, Kilon und NEGR-1. Die jeweiligen cDNAs wurden gegen spezies-spezifische Genomdatenbanken verglichen. Dabei weisen diese Gene eine hohe Konservierung der Exon/Intron Strukturen auf.

### 3.2.3. Expression von rekombinanten mNTRA

Zur Charakterisierung von mNTRA wurde zunächst das Protein rekombinant hergestellt. Dieses sollte zur Generierung von spezifischen Antikörpern verwendet werden. Für die Expression von rekombinanten mNTRA wurde die cDNA in zwei verschiedene Expressionsplasmide subkloniert. Hierzu wurden das prokaryotische Expressionsplasmid pQE-30 und das eukaryotische Expressionsplasmid pIg Plus verwendet. Diese Plasmide besitzen Abschnitte, die in Fusion mit dem rekombinanten Protein eine spätere Aufreinigung vereinfachen. In Bakterien wurde ein Konstrukt mit der Bezeichnung pQE-30-mNTRA exprimiert welches für alle drei Ig-ähnlichen Domänen von mNTRA kodiert. In Abbildung 12A ist eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des prokaryotisch exprimierten Proteins, sowie die Zwischenstufen der Reinigung dargestellt. Für die eukaryotische Expression wurde ein Konstrukt verwendet, welches für die ersten zwei der drei Ig-ähnlichen Domänen von mNTRA kodiert. Der entsprechende DNA-Abschnitt wurde in einem Leseraster mit dem humanen Fc-Abschnitt kloniert. Der Zellkulturüberstand transfizierter COS-7 Zellen wurde durch Affinitätschromatographie über eine ProteinA Sepharose-Säule aufgereinigt und das mNTRA-Fusionsprotein (mNTRA-Fc) über SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 12B; Spur 1). Zur weiteren Aufreinigung gegenüber verschiedener Serumproteine wurde das gesamte zur Verfügung stehende mNTRA-Fc über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Gelelektroelution isoliert (Abb. 12B; Spur 2). Die anschließende Überprüfung des gereinigten Fusionsprotein erfolgte mittels Western Blot mit Antikörpern gegen den humanen Fc-Abschnitt (Abb. 12B; Spur 3).

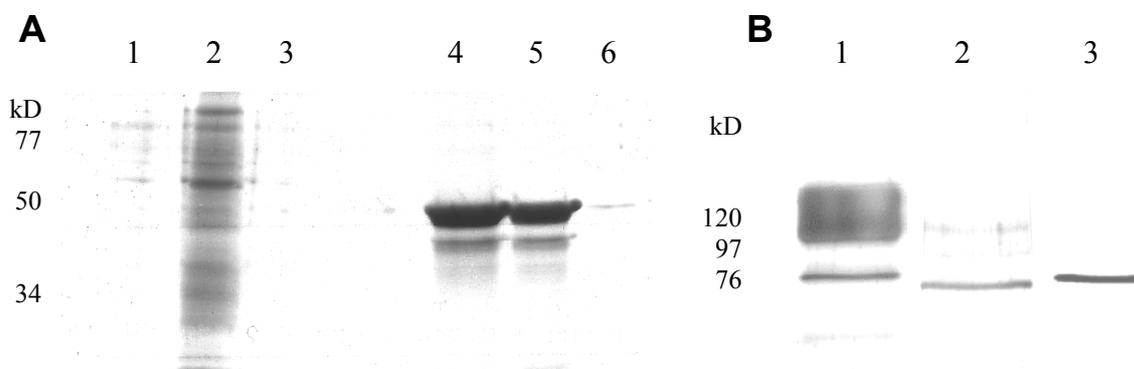


Abb. 12: Expression von rekombinantem mNTRA in Bakterien und COS-7 Zellen. A) SDS-PAGE nach Silbernitratfärbung zur Analyse der bakteriellen Expression von pQE-mNTRA. In den Spuren 1 - 3 sind die Durchläufe der Ni-NTA-Säule aufgetragen. In den Spuren 4 - 6 sind die entsprechenden Eluate aufgetragen. B) Analyse der Expression von mNTRA-Fc in COS-7 Zellen. Spur 1 wurde mit Zellkulturüberstand transfizierter COS-7 Zellen beladen, der zuvor über eine Protein A-Sepharosesäule aufgereinigt wurde. Das rekombinante Protein erscheint als distinkte Bande bei 75 kD, allerdings werden starke Hintergrundbanden in dem Bereich von etwa 100-140 kD angefärbt. Aufgrund der starken Hintergrundbanden wurde die detektierte Proteinbande durch Gelelektroelution aufgereinigt. In Spur 2 ist eine SDS-PAGE nach Silbernitratfärbung des geleluerten mNTRA-Fusionproteins zu sehen. Spur 3 zeigt einen Western Blot nach SDS-PAGE des gereinigten Geleluats mit anti-Fc Antikörpern. Es wird eine einzelne Bande von etwa 75 kD detektiert. Dies entspricht der erwarteten Größe von mNTRA-Fc.

### 3.2.4. Herstellung und Spezifität der Antiseren gegen mNTRA

Zur Generierung von Antiseren gegen mNTRA wurden Kaninchen mit rekombinantem mNTRA-Fc-Protein immunisiert und die gewonnenen Antiseren im Western Blot getestet. Das gegen prokaryotisch exprimiertes mNTRA-Fc generierte Antiserum rb50 erkennt eine Bande von etwa 50 kD, was dem erwarteten Molekulargewicht von mNTRA entspricht (Abb. 13; Spur 1). Das Antiserum rb51, das gegen eukaryotisch exprimiertes mNTRA generiert wurde, detektiert ebenfalls eine Bande von etwa 50 kD, führt allerdings zu einer hohen Hintergrundfärbung (Abb. 13; Spur 3). Um die Spezifität der polyklonalen Antiseren zu erhöhen, folgte eine Affinitätsreinigung über mNTRA-Fc Protein, das an aktivierte CNBr-4b-Sepharose kovalent gekoppelt wurde. Dadurch konnte eine unspezifische Färbung für das Antiserum rb51 erheblich reduziert und für das Antiserum rb50 vollständig eliminiert werden (Abb. 13; Spuren 2 + 4).

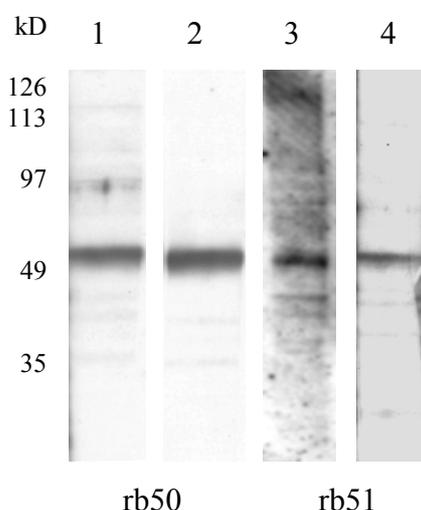


Abbildung 13: Überprüfung der Spezifität generierter Antiseren gegen mNTRA. Hirnhomogenisat adulter Mäuse wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und mit den Antiseren rb50 (VD 1:4000) und rb51 (VD 1:2000) detektiert (Spuren 1 + 3). Nach Affinitätsreinigung über mNTRA-Fc, welches an aktivierte CNBr-4b-Sepharose gekoppelt wurde, wurde die Spezifität der Antikörper erhöht.

### 3.2.5. Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen von mNTRA

Da es sich bei mNTRA, wie bei dessen homologen Formen aus dem Huhn und der Ratte um ein GPI-verankertes Glykoprotein handeln sollte, wurden die Homogenisate mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PI-PLC) inkubiert und bei 100.000g ultrazentrifugiert. Im Überstand wurde das Antigen der PI-PLC behandelten Hirnhomogenisate detektiert (Abb. 14A; Spur 1). Dagegen enthält das sedimentierte Pellet kein Antigen (Spur 2). Als Kontrolle diente Hirnhomogenisat, das ohne PI-PLC inkubiert wurde. Hier wird das Antigen nicht im Überstand, sondern im Pellet detektiert, da es nicht von der Plasmamembran abgespalten wurde (Spuren 3 und 4). Demnach handelt es sich bei dem detektierten Antigen um ein GPI-verankertes Protein.

Die Aminosäuresequenz von mNTRA besteht aus 348 Aminosäuren und reduziert sich nach Abspaltung des Signalpeptids und der hydrophoben GPI-Verankerungssequenz auf 286 Aminosäuren. Das detektierte Antigen weist eine molekulare Masse von etwa 50 kD auf. Die höhere molekulare Masse erklärt sich vermutlich durch posttranslationale Glykosylierungen, die bereits aufgrund der Sequenzanalyse vorhergesagt wurden. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde Hirnhomogenisat adulter Mäuse mit einer Kombination der Enzyme EndoF/PNGase behandelt (Abb. 14B). Diese Behandlung führt zu einer Reduzierung der molekularen Masse von 50 kD (Spur 1) auf etwa 36 kD (Spur 2). Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem detektierten Antigen um ein GPI-verankertes Glykoprotein mit einer molekularen Masse von etwa 50 kD handelt. Da diese Kriterien ebenfalls auf die zu mNTRA homologen Proteine Neurotractin im Huhn und Kilon in der Ratte zutreffen, wurde das hergestellte Antiserum als spezifisch für mNTRA angesehen (Marg et al., 1999; Funatsu et al., 1999).

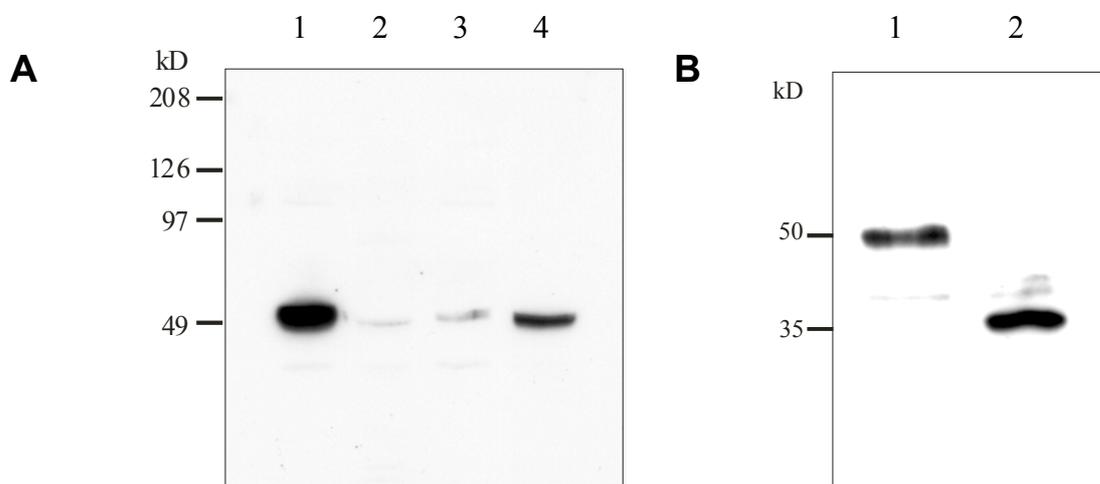


Abbildung 14: Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen von mNTRA. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen mNTRA detektiert. A) Western Blot von PI-PLC behandelten Hirnhomogenisaten adulter Mäuse (Spur 1: Überstand + PI-PLC; Spur 2 Pellet + PI-PLC; Spur 3: Überstand ohne PI-PLC; Spur 4: Pellet ohne PI-PLC). B) Western Blot zur Überprüfung der Glykosylierung des detektierten Antigens (Spur 1: Homogenisat nach Inkubation ohne EndoF/PNGase; Spur 2: Homogenisat nach Inkubation mit EndoF/PNGase).

### 3.2.6. Untersuchung zur Verteilung von mNTRA in der Maus

#### 3.2.6.1. Expression von mNTRA in verschiedenen Geweben

Die Gewebeverteilung von mNTRA wurde an Mäusen des Stadiums P15 untersucht. Hierzu wurden Homogenisate verschiedener Gewebe hergestellt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen mNTRA detektiert. Dabei wird mNTRA ausschließlich im Hirnhomogenisat detektiert.

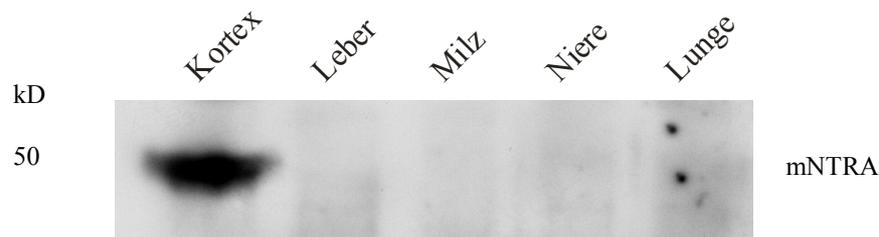


Abbildung 15: Western Blot zur Überprüfung der Gewebeverteilung von mNTRA. Es wurden jeweils 30  $\mu$ g Protein geladen, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen mNTRA detektiert. Von den untersuchten Geweben wird mNTRA ausschließlich im kortikalen Hirngewebe detektiert. In Homogenisaten der Leber, der Milz, der Niere und der Lunge wird kein mNTRA detektiert.

#### 3.2.6.2. Expression von mNTRA im embryonalen ZNS

Zunächst wurden Hirnhomogenisate der embryonalen Stadien E12, E14.5 und E16.5 im Western Blot mit Antikörpern gegen mNTRA analysiert. Dabei konnte die Expression von mNTRA zuerst im Stadium E14.5 nachgewiesen werden. Die Expression nimmt während der Embryonalentwicklung zu, wie eine deutliche Zunahme der Bande bei E16.5 zeigt (Abb. 16).

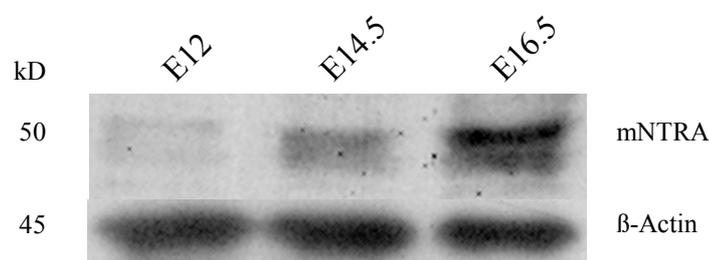


Abbildung 16: Expression von mNTRA im embryonalen Maushirn. Gesamthirnhomogenisate embryonaler Maushirne wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen mNTRA detektiert. mNTRA ist zuerst im Stadium E14.5 im Western Blot nachweisbar. Nachträglich wurde eine Detektion mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Actin durchgeführt, um die Ladung gleicher Proteinmengen zu belegen.

### 3.2.6.3. Expression von mNTRA während der postnatalen Entwicklung im ZNS der Maus

Zur weiteren Charakterisierung von mNTRA wurde dessen Expression im postnatalen ZNS untersucht. Die Analyse der zeitlichen Regulation von mNTRA in postnatalen Gesamthirnhomogenisaten zeigt einen Anstieg der Expression bis zum Stadium P25. Dieses Expressionsniveau bleibt auch im ältesten untersuchten Stadium P70 erhalten (Abb. 17A). In P20 Mäusen registriert man die stärkste Expression im Hypothalamus, Kortex, Riechkolben und Hippokampus, während die Expression im Hirnstamm und im Cerebellum wesentlich schwächer ist (Abb. 17B).

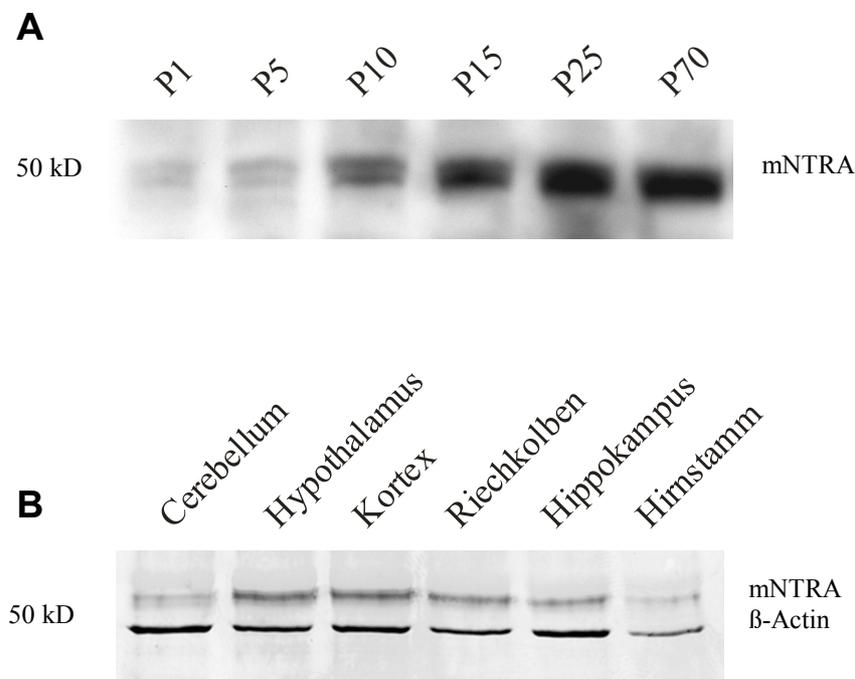


Abbildung 17: mNTRA wird entwicklungsabhängig reguliert und weist eine differentielle Expression in verschiedenen Hirnregionen von P20 Mäusen auf. Hirnhomogenisate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen mNTRA bzw.  $\beta$ -Actin detektiert, das als Marker für gleiche Proteinmengen diente. A) Gesamthirnhomogenisate verschiedener postnataler Entwicklungsstadien. Die Expression von mNTRA steigt während der Entwicklung an. B) Homogenisate verschiedener Hirnregionen von P20 Mäusen. mNTRA (obere Bande) weist eine differentielle Expression in verschiedenen Hirnregionen auf.

Daraufhin wurde die entwicklungsabhängige Regulation von mNTRA in vier verschiedenen Hirnregionen untersucht. Dabei steigt die Expression von mNTRA während der Entwicklung in allen untersuchten Regionen deutlich an. Die Expression erreicht während der Stadien P15 – P20 ihr Maximum. Dieses Expressionsniveau bleibt bis zum ältesten untersuchten Stadium P70 bestehen (Abb. 18).

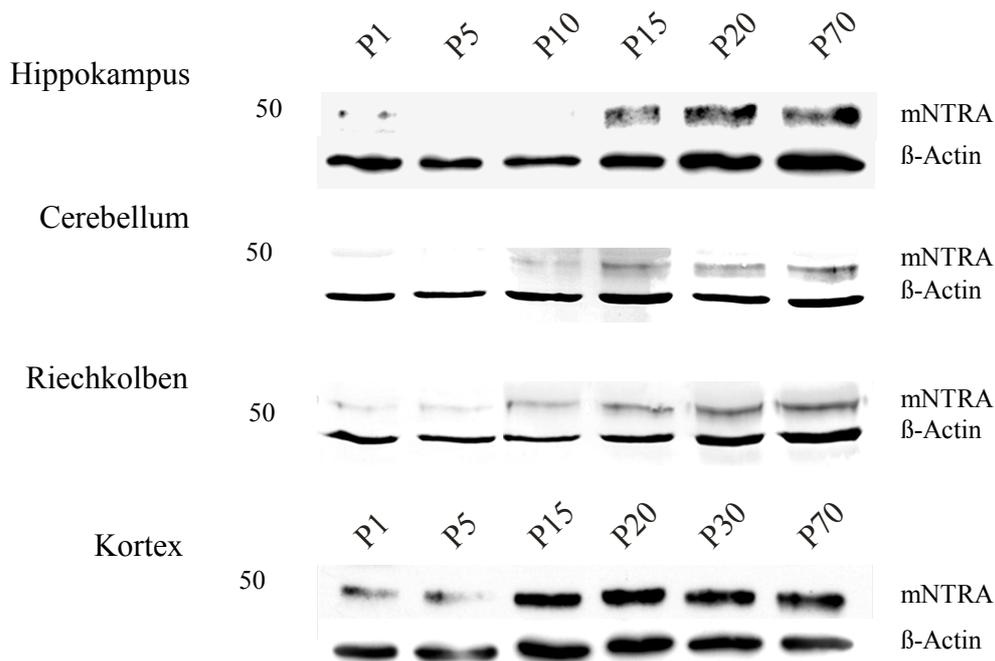


Abbildung 18: Western Blot Analyse zur entwicklungsabhängigen Regulation von mNTRA in verschiedenen Hirnregionen. Folgende Hirnhomogenisate verschiedener Regionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit affinitätsgereinigten Antikörpern gegen mNTRA bzw. Antikörpern gegen  $\beta$ -Actin detektiert: Hippokampus; Cerebellum; Riechkolben; Kortex. mNTRA wird während der Entwicklung in allen untersuchten Regionen hochreguliert und erreicht seine maximale Expression während der Stadien P15-P20.

### 3.2.6.4. Immunhistologische Untersuchungen zur Verteilung von mNTRA im Maushirn

Zur Untersuchung der zellulären Verteilung von mNTRA im ZNS wurden immunhistologische Untersuchungen an postnatalen Mäusen durchgeführt. In Abbildung 19 sind koronale Schnitte durch verschiedene Regionen des ZNS dargestellt.

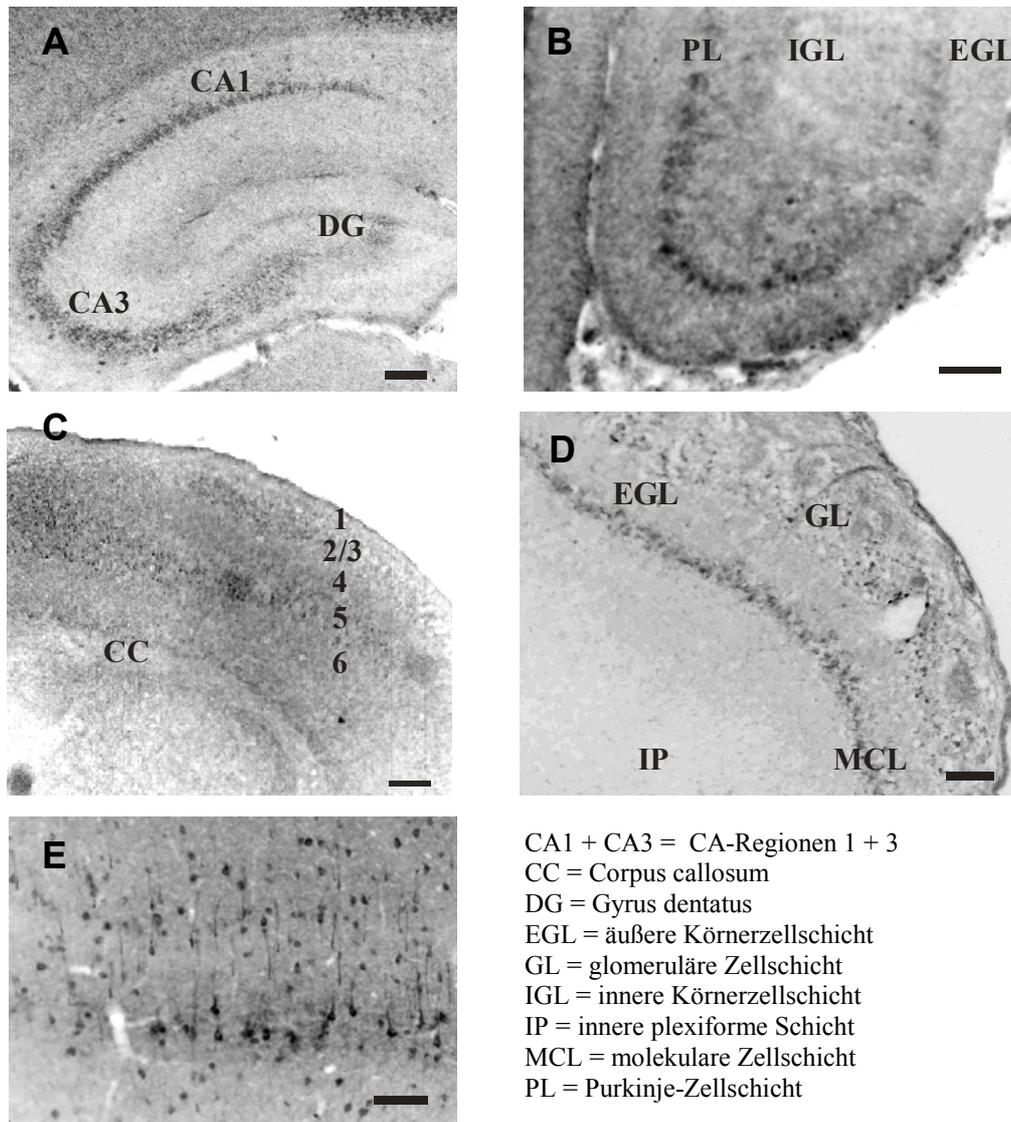


Abbildung 19: Immunhistologische Untersuchung zur Expression von mNTRA im ZNS der Maus. Koronale Kryostatschnitte wurden mit Antiseren gegen mNTRA und Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern gefärbt. Dabei wurden mit den Antiseren rb50 (VD 1:200) und rb51 (VD 1:800) die gleichen Resultate erzielt. Zur besseren Darstellung wurden die Bilder invertiert. A) Im Hippokampus von P11 Mäusen sind Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region angefärbt. B) Die Zellkörper von Purkinje-Zellen im Cerebellum weisen in P11 Mäusen eine intensive Färbung auf. C) Eine schichten-spezifische Expression von mNTRA wird im Kortex von P11 Mäusen beobachtet. Hier sind vor allem Zellen der Schicht 5 gefärbt, sowie vereinzelte Zellen der Schicht 2/3. D) Das stärkste Signal im Riechkolben von P6 Mäusen zeigen Mitralzellen. Außerdem werden Körnerzellen

in der äußeren Körnerzellschicht angefärbt. E) In adulten Mäusen wird mNTRA auf dem Soma und den Dendriten von Pyramidenzellen der Schicht 5 exprimiert. Balken: A) 100 µm, B) 50 µm, C) 200 µm, D) 50µm, E) 50µm.

In allen untersuchten Regionen wird mNTRA auf Subpopulationen von Neuronen exprimiert. Im Hippokampus von P11 Mäusen werden Pyramidenzellen der Regionen CA1 und CA3 angefärbt. Im Gyrus Dentatus wird dagegen keine Expression festgestellt (Abb. 19A). Das Cerebellum weist eine Expression von mNTRA auf den Zellkörpern von Purkinje-Zellen auf (Abb. 19B). Eine schichtenspezifische Verteilung wird für mNTRA im Kortex von P11 Mäusen beobachtet. Hier werden vor allem Pyramidenzellen der Schicht 5, sowie der Schicht 2/3 angefärbt. Der Hirnbalken (CC; *corpus callosum*) weist kein Signal auf (Abb. 19C). Im Kortex adulter Mäuse wird mNTRA auf dem Soma, sowie auf Dendriten der Schicht 5 von Pyramidenzellen nachgewiesen (Abb. 19E). Im Riechkolben von P6 Mäusen wird mNTRA auf Mitralzellen und auf vereinzelt Zellen der äußeren Körnerzellschicht detektiert (Abb. 19D).

#### **3.2.6.5. Biochemische Untersuchung der subzellulären Verteilung von mNTRA im ZNS adulter Mäuse**

Im folgenden Experiment wurde die subzelluläre Verteilung im ZNS adulter Mäuse untersucht. Hierzu wurden Hirnhomogenisate mittels Sedimentation durch diskontinuierliche Saccharose-Gradienten fraktioniert. Dies führt zu einer sequentiellen Anreicherung postsynaptischer Proteine (Carlin et al., 1980). Die isolierten Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen mNTRA, Synaptophysin und PSD95 detektiert (Abb. 20). Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein, das als Marker für synaptische Vesikeln und neuronale Differenzierung beschrieben wurde (Johnston et al., 1989). In diesem Experiment wurde Synaptophysin in Synaptosomen, synaptosomalen Membranen und synaptischen Verbindungen (*synaptic junctions*) nachgewiesen. Dagegen wurde kein Synaptophysin in den postsynaptischen Fraktionen PSD 1 - 3 detektiert. Das postsynaptische Protein PSD95 wurde bei einer aufgetragenen Proteinmenge von 5 µg pro Spur ausschließlich in den Fraktionen PSD 2 und PSD 3 detektiert. mNTRA wird im Ausgangshomogenisat, Plasmamembranen, Synaptosomen, synaptosomalen Membranen und den *synaptic junctions* detektiert. Dabei reichert sich mNTRA in den gleichen Fraktionen an, wie das präsynaptische Vesikelprotein Synaptophysin. Die stärkste Anreicherung beider Proteine wurde in der

synaptosomalen Membranfraktion beobachtet. In den postsynaptischen Fraktionen konnte kein mNTRA nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine präsynaptische Lokalisation von mNTRA im ZNS adulter Mäuse hin.

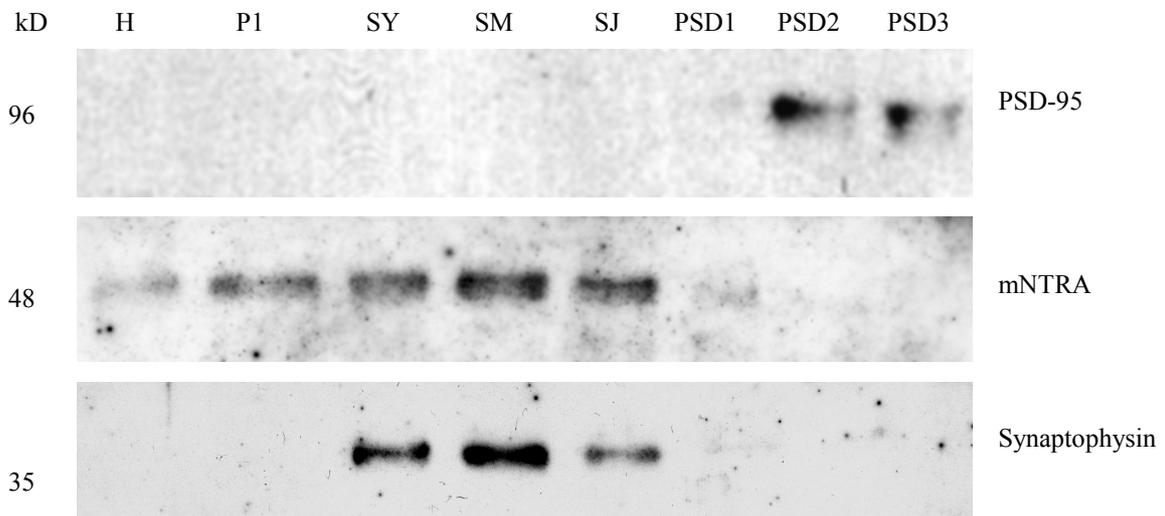


Abbildung 20: Analyse der Verteilung von mNTRA in subzellulären Fraktionen des ZNS adulter Mäuse. Es wurden 5 µg Protein der jeweiligen Fraktionen geladen, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Antikörpern gegen PSD95 (oben), mNTRA (mitte) und Synaptophysin (unten) detektiert. mNTRA und Synaptophysin reichern sich in den Fraktionen SY, SM und SJ an. In den postsynaptischen Fraktionen PSDI - III wird weder mNTRA, noch der präsynaptische Marker Synaptophysin nachgewiesen (H, Homogenisat; P1, Plasmemembran-Fraktion 1; SY, Synaptosomen; SM, synaptosomale Membranen; SJ, *synaptic junctions*; PSD I – III, *postsynaptic density* Fraktionen I – III).

### 3.2.6.6. Immunzytologische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von mNTRA

Im vorangegangenen Experiment wurde eine Anreicherung von mNTRA und Synaptophysin in den gleichen subzellulären Fraktionen nachgewiesen. Um diese Beobachtung zu bestätigen wurde die subzelluläre Verteilung von mNTRA in Primärkulturen hippocampaler Neuronen der Maus immunzytologisch untersucht. Nach einer Kultivierungsdauer von 13 Tagen (13 div) wurden die Kulturen mit Antikörpern gegen mNTRA und Synaptophysin gefärbt (Abb. 21). Die Überlagerung der Signale weist auf eine Kolokalisation der beiden Proteine hin (Abb. 21C).

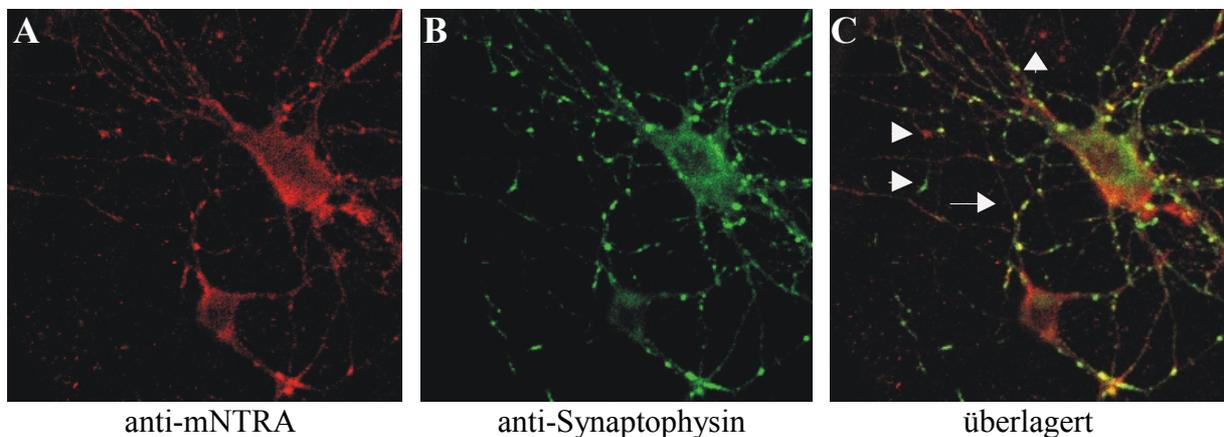


Abbildung 21: Kolokalisation von mNTRA und Synaptophysin in primären Neuronen. Primärkulturen hippocampaler Neuronen aus P0 Mäusen wurden nach einer Kultivierungsdauer von 13 Tagen mit Antikörpern gegen mNTRA bzw. Synaptophysin gefärbt. A) mNTRA wird auf dem Soma, sowie in punktförmiger Verteilung auf den Neuriten exprimiert. B) Synaptophysin weist vorrangig eine punktförmige Verteilung auf, die typisch für synaptische Vesikel ist. C) Die Überlagerung der Signale zeigt eine Kolokalisation der beiden Proteine (Pfeil). Dabei fällt auf, dass die Kolokalisation nicht absolut ist (Pfeilspitzen).

Ergänzend zu diesen Experimenten wurde die subzelluläre Verteilung von mNTRA in Kulturen hippocampaler Neuronen nach 7 Tagen *in vitro* (7 div) untersucht (Abb. 22). Hierzu wurde die Verteilung von mNTRA mit der von MAP2 verglichen. MAP2 ist ein neuronales, zytoskelett-assoziiertes Protein, das im Soma und den Dendriten exprimiert wird. Es dient als Differenzierungsmarker für neuronale Kulturen (Caceres et al., 1984). Die immunzytologische Untersuchung der Kulturen zeigt die Expression von mNTRA auf lang auswachsenden Neuriten, die MAP2-negativ sind (Abb. 22A + B; Pfeil). Darüber hinaus wird

eine überlappende Expression von mNTRA und MAP2 auf dem Soma der meisten MAP2-positiven Neuronen detektiert. Neben der axonalen Lokalisation wird mNTRA aber auch auf einigen MAP2-positiven Neuriten exprimiert (Abb. 22B; Pfeilspitze). Zum Teil trat eine intensive Färbung für mNTRA an Kontaktstellen MAP2-positiver Neuriten auf (Abb. 22C).

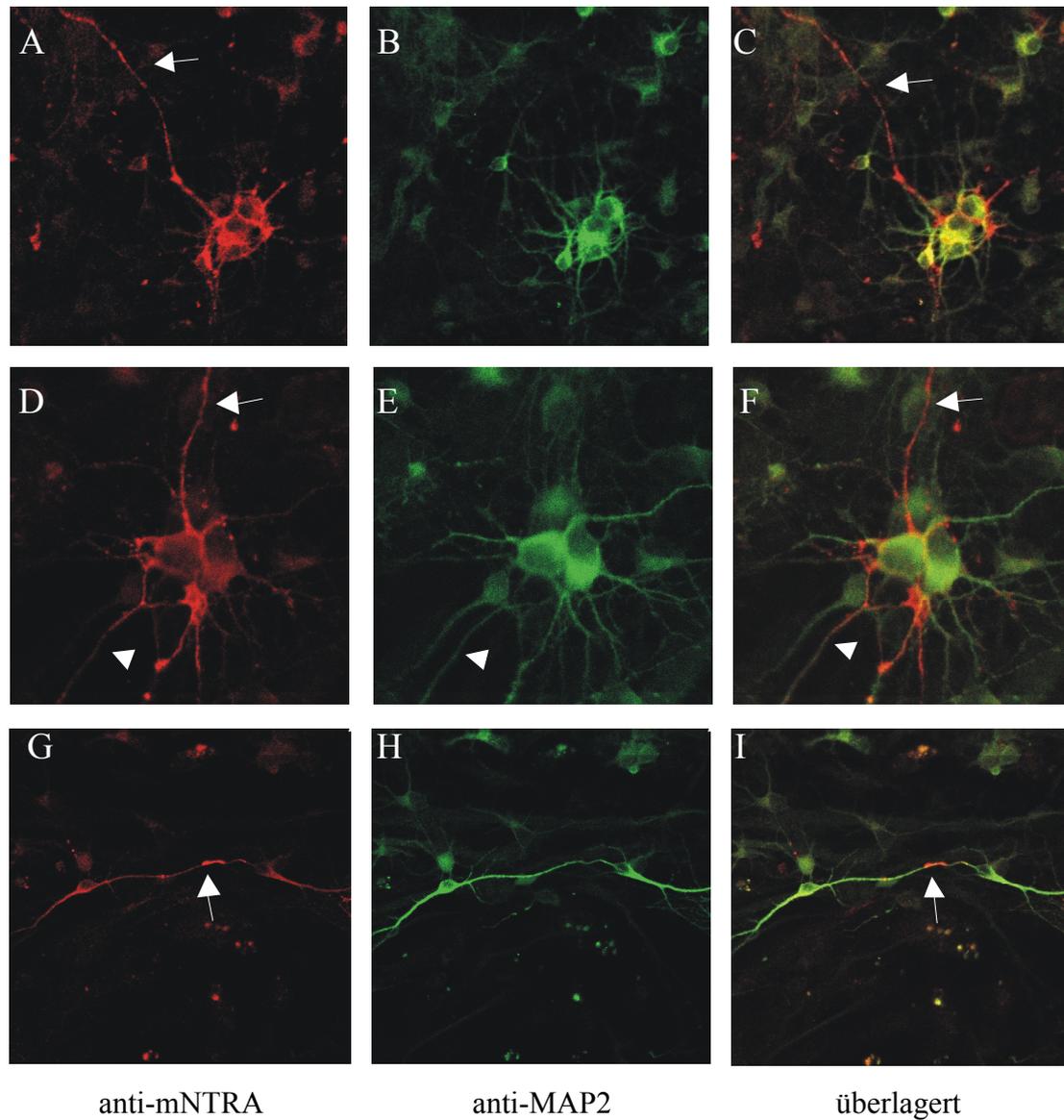


Abbildung 22: Immunzytologische Zweifachfärbung primärer hippocampaler Neuronen mit Antikörpern gegen mNTRA bzw. MAP2. Primäre Neuronen wurden aus Hippokampi neugeborener Mäuse dissoziiert und in einer Dichte von 500 Zellen / mm<sup>2</sup> für 7 Tage kultiviert. Für die immunzytologische Detektion wurden die Kulturen mit Formaldehyd fixiert und die Zellen mit TritonX-100 permeabilisiert. Die Fluoreszenzfärbung der Neuronen erfolgte mit primären Antikörpern gegen mNTRA und MAP2, sowie fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern.

### 3.2.7. Untersuchungen zur Funktion von mNTRA

#### 3.2.7.1. Analyse des Neuritenwachstums in Kokulturen von hippocampalen Neuronen und mNTRA-exprimierenden COS-7 Zellen

Zuvor veröffentlichte Ergebnisse ergaben erste Hinweise auf eine Beteiligung von Neurotractin bei der Vermittlung des axonalen Wachstums embryonaler Neuronen im Huhn. Neben dieser Beobachtung *in vitro*, wurde Neurotractin v.a. auf Subpopulationen axonaler Trakte detektiert (Marg et al., 1999). Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur subzellulären Verteilung von mNTRA auf hippocampalen Neuronen, belegen eine axonale Lokalisation von mNTRA (s. Abb. 22).

Um einen möglichen Einfluss von mNTRA auf das Neuritenwachstum zu testen, wurden Kokulturen von mNTRA-exprimierenden Zelllinien und primären Neuronen aus der Ratte untersucht. Aufgrund der hohen Konservierung von mNTRA und dessen orthologen Form in der Ratte, die in nur zwei Aminosäuren voneinander abweichen, wurde dieser Interspezies-Ansatz als repräsentativ für die Funktion von mNTRA in der Maus angesehen.

Für diese Untersuchung wurden COS-7 Zellen transient mit den Plasmiden pcDNA3-mNTRA bzw. pcDNA3 transfiziert und mit primären Neuronen des entorhinalen Kortex bzw. Hippokampus für 48 h kultiviert. Dadurch sollte untersucht werden, ob mNTRA einen wachstumsfördernden Effekt auf primäre Neuronen ausübt. In Abbildung 23 werden die Ergebnisse zusammengefasst. Hierzu wurden die kumulativen Verteilungskurven der gemessenen Neuritenlängen erstellt, sowie die durchschnittlichen Neuritenlänge als Balkendiagramm abgebildet (Abb. 23 A – C). Das Neuritenwachstum entorhinaler Kortex-Neuronen auf COS-7 mit bzw. ohne mNTRA weist auf ein tendenziell verstärktes Neuritenwachstum hin. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 23C;  $p = 0,058$ ). Wird der gleiche Versuch mit hippocampalen Neuronen durchgeführt, zeigt sich ein signifikant verstärktes Neuritenwachstum auf COS-7 Zellen, die mit mNTRA transfiziert wurden (Abb. 23D;  $p = 0,0318$ ).

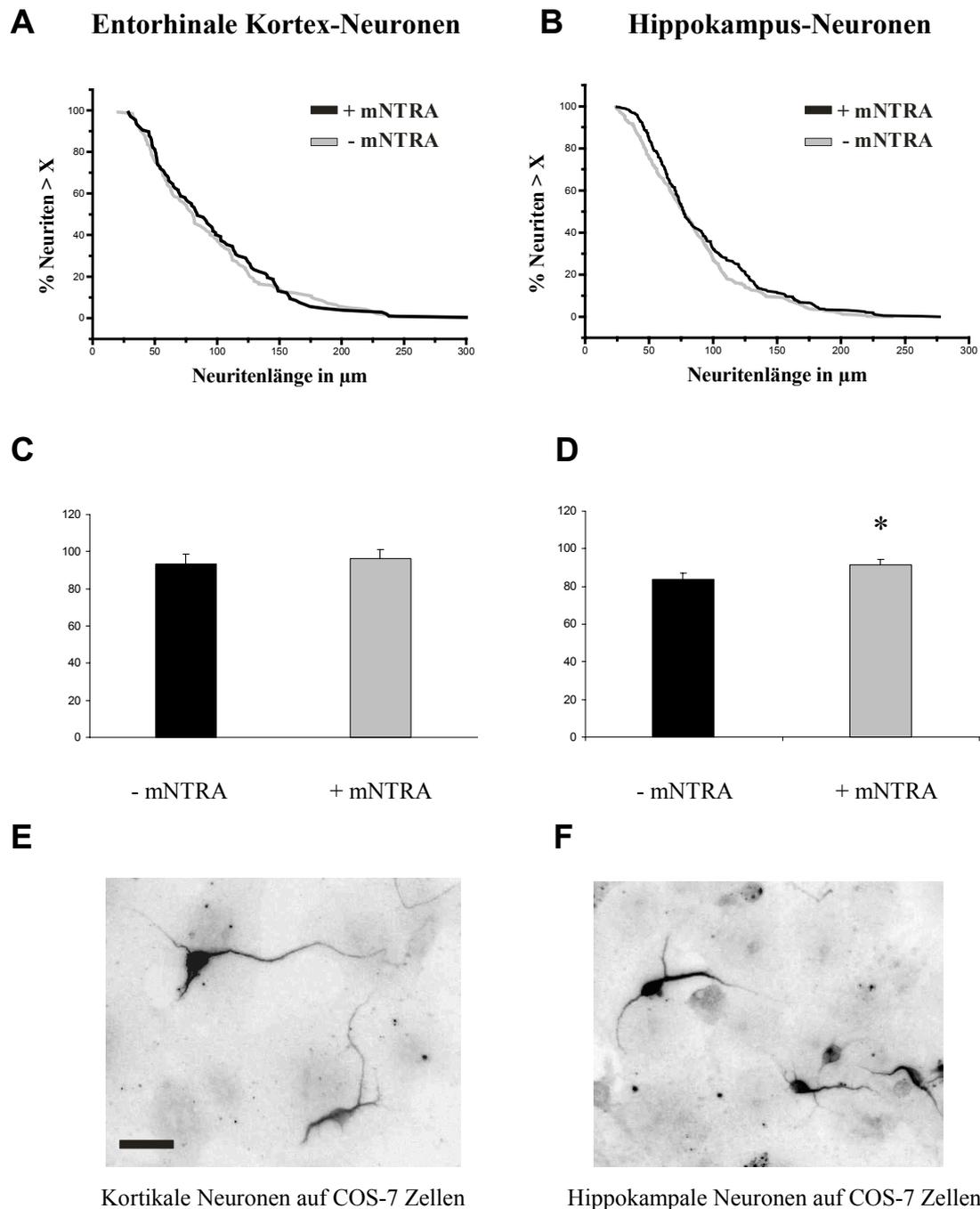


Abbildung 23: mNTRA verstärkt das Neuritenwachstum hippocampaler Neuronen. COS-7 Zellen wurden transient mit pcDNA3-mNTRA bzw. pcDNA3 transfiziert. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit primären entorhinalen Kortex- bzw. Hippokampalen Neuronen kokultiviert, mit Formaldehyd fixiert und mit TritonX-100 permeabilisiert. Anschliessend wurden die Kulturen mit Antikörpern gegen MAP2 und sekundären Cy3-konjugierten Antikörpern gefärbt. A) + B) Kumulative Verteilungskurven entorhinaler Kortex-Neuronen, bzw. hippocampaler Neuronen auf COS-7 Zellen, die entweder mit pcDNA3-mNTRA oder pcDNA3 transfiziert wurden. C) + D) Balkendiagramme  $\pm$  Standardabweichung (SEM) zur Darstellung der durchschnittlichen Neuritenlänge entorhinaler Kortex-Neuronen bzw. hippocampaler Neuronen. Es wurden jeweils über 300 Neuriten gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney U Test. E) + F) Die Aufnahmen wurden invertiert dargestellt. Der Maßstab entspricht 50  $\mu$ m.