

## 4. Diskussion

### 4.2. Neurotractin

Neurotractin wurde von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe als neues Mitglied der IgLON-Familie beschrieben (Marg et al., 1999). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die zu Neurotractin orthologe Form aus der Maus zu identifizieren und charakterisieren. Hierzu wurden biochemische und histologische Methoden zur Analyse der Verteilung von Maus Neurotractin (mNTRA) im ZNS angewendet. Weiterhin wurden Studien zur Lokalisation und Funktion von mNTRA mit primären neuronalen Zellkulturen durchgeführt, sowie dessen Regulation im Tiermodell nach entorhinaler Kortextläsion untersucht. Letztlich wurde eine für mNTRA defiziente Mauslinie generiert, die als Ausgangspunkt für weitere Studien über die Funktion dieses Proteins dienen soll.

#### 4.2.1. mNTRA ist ein Mitglied der IgLON-Familie

In dieser Arbeit wurde mNTRA als die orthologe Form von Neurotractin aus dem Huhn und Kilon aus der Ratte isoliert. Vergleiche der Aminosäuresequenzen von mNTRA mit denen von Neurotractin, Kilon und dem humanen Ortholog NEGR-1 belegen eine hohe speziesübergreifende Konservierung dieser Proteine (s. Abb. 11). Die Untersuchung der genomischen Organisation dieser Gene, zeigte eine hoch konservierte Exon/Intron Struktur (s. Tab. 5). Bemerkenswert sind die außergewöhnlich großen Introns dieser beiden Gene, die bereits für andere Mitglieder der IgSF beschrieben wurden (Giger et al., 1995; Hassel et al., 1997; Plagge und Brümmendorf, 1997). Man geht davon aus, dass sie regulatorische Elemente enthalten, die die zeitliche und räumliche Expression der Proteine steuert (Kallunki et al., 1998; Edelman et al., 1998). So wurde z.B. für F3 / Contactin-1 die Anwesenheit verschiedener Konsensussequenzen für Homeobox Transkriptionsfaktoren gefunden (De Benedictis et al., 2001). Eine zuletzt veröffentlichte Studie über die genomische Organisation von LAMP, einem der vier Mitglieder der IgLON-Familie, beschreibt auch für dieses Gen außerordentlich große Introns. Diese sind vorrangig im 5'-Bereich vorzufinden. So verfügt dieses Gen über zwei alternativ verwendete Signalpeptide, denen Introns von etwa 800 kb folgen. Darüber hinaus wurde eine weitere alternative Spleißform, die einen Abschnitt von 23 Aminosäuren zwischen GPI-Anker und dritte Ig-Domäne einfügt identifiziert (Pimenta und Levitt, 2004). Eine Insertion von 13 Aminosäuren an gleicher Stelle wurde auch für LAMP

im Huhn beschrieben (Brümmendorf et al., 1997). Dagegen wird Neurotractin im Huhn in zwei verschiedenen Isoformen mit drei bzw. zwei Ig-Domänen exprimiert (Marg et al., 1999). In der Maus wurden in der vorliegenden Arbeit, weder im Western Blot mit Antikörpern gegen mNTRA, noch durch Datenbankanalysen Hinweise für solche Isoformen gefunden. Diese Beobachtung wird durch Untersuchungen für Kilon in der Ratte unterstützt, wo im ZNS nur ein mRNA-Transkript von etwa 5,5 kb im Northern Blot detektiert wird (Bräuer et al., 2000). Aufgrund der nahezu identischen Exon/Intron Strukturen von Kilon und mNTRA ist ein vergleichbares Ergebnis für mNTRA im Northern Blot zu erwarten.

Neben diesen strukturellen Ergebnissen ergab die Untersuchung postrationaler Modifikationen von mNTRA, dass es sich um ein glykosyliertes, GPI-verankertes Protein handelt (s. Abb. 14). Beides sind charakteristische Merkmale aller Mitglieder der IgLON-Familie (Struyk et al., 1995; Brümmendorf et al., 1997; Funatsu et al., 1999; Marg et al., 1999).

#### **4.2.2. mNTRA wird entwicklungsabhängig reguliert und zeigt ein restriktives Expressionsmuster**

Untersuchungen zur Gewebeverteilung von mNTRA mittels Western Blot zeigten eine Expression im ZNS von P15 Mäusen. In Gewebeproben aus der Leber, Milz, Niere und Lunge wurde kein mNTRA nachgewiesen (s. Abb. 15). Im embryonalen ZNS wird die Expression von mNTRA zuerst in E14,5 und verstärkt in E16,5 Mäusen detektiert (s. Abb. 16). Immunhistologische Untersuchungen über die Verteilung des mNTRA Orthologs Neurotractin zeigten eine intensive Färbung axonaler Trakte im ZNS embryonaler Hühner des Entwicklungsstadiums E8 (Marg et al., 1999). Es wurden zwar keine Untersuchungen hinsichtlich der zellulären Verteilung im embryonalen ZNS der Maus durchgeführt, jedoch könnte die Expression von mNTRA, während eines vergleichbaren Entwicklungsstadiums, auf eine Beteiligung bei der Entwicklung axonaler Trakte hinweisen. Ob Neurotractin bzw. mNTRA tatsächlich eine Rolle bei der Etablierung des Verschaltungsmuster im embryonalen ZNS einnehmen, kann zu diesem Zeitpunkt nicht belegt werden. Solch eine Funktion wurde jedoch für LAMP, einem weiteren Mitglied der IgLON-Familie beschrieben, das eine wichtige Funktion bei Formierung des septo-hippokampalen Trakts, sowie thalamo-kortikaler Projektionen in der Ratte einzunehmen scheint (Keller et al., 1989; Mann et al., 1998).

Die Expression von mNTRA im postnatalen ZNS steigt im Verlauf der Entwicklung an und erreicht zwischen P15 und P20 ihr Maximum. Dabei wird in P20 Mäusen eine differentielle Expression von mNTRA beobachtet. Die stärkste Expression wird im Kortex, Hypothalamus, Hippokampus und im Riechkolben festgestellt. Eine schwache Expression weisen der Hirnstamm und das Cerebellum in diesem Stadium auf. In allen untersuchten Hirnregionen wird jedoch ein Anstieg der Expression von mNTRA beobachtet, die zu einer soliden Expression im adulten ZNS führt (s. Abb 18). Dies weist darauf hin, dass mNTRA auf postmitotischen Neuronen des ZNS exprimiert wird. Die in dieser Arbeit vorgestellten immunhistologischen Untersuchungen zur zellulären Verteilung von mNTRA, belegen ein restriktives Expressionsmuster in verschiedenen Regionen des ZNS. mNTRA markiert demnach neuronale Subpopulationen. Hierbei handelt es sich in allen Fällen um Zellen mit integrativen Funktionen, wie z.B. den Purkinje-Zellen im Cerebellum und den Mitralzellen im Riechkolben (s. Abb. 19).

Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen wurde für Kilon im ZNS der Ratte ein Anstieg der Expression im postnatalen ZNS beschrieben. Darüber hinaus wird die in der vorliegenden Arbeit beschriebene zelluläre Verteilung im Kortex und im Cerebellum bestätigt (Funatsu et al., 1999; Miyata et al., 2003 [100]). Gemeinsam mit der hohen Konservierung von 99,4 % auf Aminosäureebene und der stark konservierten Exon/Intron Struktur belegen diese Ergebnisse, dass es sich bei Kilon um die orthologe Form von mNTRA in der Ratte handelt.

#### 4.2.3. Subzelluläre Verteilung von mNTRA

Nach Aufklärung der entwicklungsabhängigen Regulation und histologischen Verteilung von mNTRA, wurde dessen subzelluläre Lokalisation untersucht. Hierzu wurden zunächst subzelluläre Fraktionen adulter Mäusehirne analysiert. Zusätzlich wurde die Verteilung von mNTRA durch Kollokalisierung mit geeigneten Markerproteinen in Kulturen primärer Neurone untersucht.

Die subzelluläre Fraktionierung führt zu einer sequentiellen Anreicherung synaptischer Proteine, die letztlich Proteine der *postsynaptic density* (PSD) von Proteinen synaptischer Verbindungen abtrennt (Carlin et al., 1980). Die Analyse dieses Experiments mittels Western Blot, zeigt eine deutliche Anreicherung von mNTRA in synaptosomalen Membranfraktionen. Parallel hierzu reichert sich das präsynaptische Vesikelprotein Synaptophysin in dieser

Fraktion an, während sich der postsynaptische Marker PSD95 in den postsynaptischen Fraktionen anreichert (s. Abb. 20). Dieses Ergebnis weist auf eine präsynaptische Lokalisation von mNTRA hin. Kontrovers zur Abwesenheit von mNTRA in postsynaptischen Fraktionen sind elektronenmikroskopische Untersuchungen von Miyata et al. (2003 [100]), die eine prä- und postsynaptische Lokalisation von Kilon beschreiben. Die Abwesenheit von mNTRA in PSD-Fraktionen könnte jedoch durch die angewandte Methode zur Isolierung der PSD-Fraktionen begründet sein. Diese führt vorrangig zu einer Anreicherung postsynaptischer Subpopulationen, die als Bestandteil asymmetrische Synapsen des Typs 1 beschrieben wurden (Carlin et al., 1980). Diese Präparation erstellt somit kein repräsentatives Bild aller postsynaptischen Endigungen des ZNS.

Interessanterweise wird in der Fraktion SJ (*synaptic junctions*) weniger mNTRA detektiert als in der synaptosomalen Membranfraktion. Unter der Voraussetzung dass ein hohe Trennschärfe zwischen diesen Fraktionen vorliegt, deutet dies darauf hin, dass mNTRA ebenso wie Synaptophysin, mit synaptischen Vesikeln assoziiert sein kann, statt auf der präsynaptischen Plasmamembran präsent zu sein. Thy-1 und Contactin-1, beides GPI-verankerte IgSF-Mitglieder, weisen eine präferentielle Lokalisation in synaptischen Vesikeln auf (Jeng et al., 1998; Pierre et al., 1998). Dabei wird die Oberflächenexpression von Contactin-1 durch aktivitätsabhängige Prozesse reguliert (Pierre et al., 2001). Allerdings beschränken sich diese Untersuchungen auf sekretorische Neuronen der Neurohypophyse, diese könnten einen Spezialfall darstellen. Beweise für die generelle Lokalisation dieser Proteine in synaptischen Vesikeln stehen noch aus. Über die physiologische Relevanz GPI-verankerter IgSF-Mitglieder bei der synaptischen Übertragung ist wenig bekannt. Denkbar wäre jedoch eine Veränderung der synaptischen Stabilität durch Beeinflussung transsynaptischer Zelladhäsion, wie bereits für einige CAMs gezeigt wurde (Benson et al., 2000).

Neben diesem biochemischen Ansatz zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von mNTRA wurden die Verteilung von mNTRA in Kulturen hippokampaler Neuronen untersucht. Nach einer Kultivierungsdauer von 13 Tagen wurde eine deutliche Kolo-kalisation von mNTRA mit Synaptophysin festgestellt (s. Abb. 21). Darüber hinaus werden einige punktförmige Färbungen für mNTRA detektiert, die kein Signal für Synaptophysin aufweisen. Hierbei könnte es sich um eine Färbung dendritischer Strukturen handeln, eine Lokalisation die durch immunhistologische Untersuchungen im Kortex adulter Mäuse für mNTRA gezeigt wurde (s. Abb. 19). Eine entwicklungsabhängige Regulation der subzellulären Lokalisation wurde bereits für Mitglieder der IgLON Familie diskutiert. So wird für Neurotractin und LAMP eine axonale Expression während der Embryonalentwicklung

beschrieben. Im postnatalen ZNS wird LAMP dagegen auf dem Soma und den Dendriten beobachtet. Für OBCAM wird mit zunehmender Differenzierung kultivierter Neuronen eine dendritische Lokalisation beschrieben (Marg et al., 1999; Zacco et al., 1990; Miyata et al., 2003 [101]). Demnach wäre es denkbar, dass die Expression von mNTRA mit fortschreitender Kultivierungsdauer vermehrt auf Dendriten auftritt.

Werden primäre hippocampale Neuronen nur für 7 Tage kultiviert und mit Antikörpern gegen mNTRA bzw. den dendritischen Marker MAP2 gefärbt, zeigt sich eine robuste axonale Expression von mNTRA. Die Färbung ist über das gesamte Axon zu beobachten und es treten nur vereinzelt punktförmige Signale auf (s. Abb. 22). Die Färbung der Kulturen mit Antikörpern gegen Synaptophysin ergab nach dieser Kultivierungsdauer kein Signal. Dies weist auf einen geringen Differenzierungsgrad der Neuronen zu diesem Stadium hin (Johnston et al., 1989). Eine weitere Beobachtung war das Auftreten einer intensiven Färbung für mNTRA an den Kontaktstellen von Neuriten (s. Abb. 22). Diese Färbung wurde nicht in älteren Kulturen beobachtet. Dies führt zu der Vermutung, dass mNTRA über homophile Bindung eine Rolle bei der Etablierung von Zell-Zellkontakten einnehmen könnte und damit die Ausbildung von Synapsen initiiert. Solch eine Rolle bei der Initiierung synaptischer Kontakte durch homophile Wechselwirkung *in trans* wurde z.B. für Cadherine beobachtet (Tanaka et al., 2000; Bozdagi et al., 2000).

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse eine entwicklungsabhängige Regulation der subzellulären Lokalisation von mNTRA in hippocampalen Neuronen *in vitro*. In sich differenzierenden hippocampalen Neuronen wird nach 7 div eine axonale Verteilung beobachtet. Nach 13 div wird eine Kolokalisation mit dem synaptischen Vesikelprotein Synaptophysin festgestellt. Diese Kolokalisation wird im adulten ZNS indirekt bestätigt, da sich mNTRA ebenso wie Synaptophysin in synaptosomalen Membranfraktionen anreichert.

#### **4.2.4. mNTRA verstärkt das Neuritenwachstum hippocampaler Neuronen**

Zur Untersuchung des Einflusses von mNTRA auf das Neuritenwachstum primärer Neuronen *in vitro*, wurden hippocampale bzw. entorhinale Kortex-Neuronen mit mNTRA-exprimierenden COS-7 Zellen kokultiviert. Dabei wurde durch mNTRA das Neuritenwachstum hippocampaler Neuronen stärker im Vergleich zu entorhinalen Kortexneuronen stimuliert (s. Abb. 23). Dabei wurde, wenn auch statistisch signifikant, nur ein relativ schwacher Effekt beobachtet. Es wäre allerdings möglich, dass die kokultivierten

COS-7 Zellen bereits eine permissive Umgebung für Neuriten darstellen, was zu einer Maskierung eines stärkeren Effekts von mNTRA auf das Neuritenwachstum führen könnte.

Um die wachstumsfördernde Wirkung von mNTRA in einem anderen Testsystem zu überprüfen, wurde ein Streifenassay durchgeführt. Dieses Verfahren wurde ursprünglich zur Analyse repulsiver und attraktiver Moleküle im retinotektalen System entwickelt (Walter et al., 1987). Entgegen der homogenen Verteilung von mNTRA in Kokulturen primärer Neuronen mit mNTRA-exprimierenden Zellen, bietet der Streifenassay die Möglichkeit zwei verschiedene Substrate simultan anzubieten. In der vorliegenden Arbeit wurden CHO-Membranen von Zellen verwendet, die entweder stabil mit pcDNA3-mNTRA oder zur Kontrolle mit pcDNA3 stabil transfiziert wurden. Dabei wurde davon ausgegangen, dass ein wachstumsfördernder Effekt von mNTRA durch CHO Zellmembranen weniger stark maskiert werden würde, als durch COS-7 Zellen. Ein ähnlicher experimenteller Ansatz, wurde zuvor zur Untersuchung der wachstumsfördernden Wirkung von LAMP, einem zu mNTRA nahe verwandten Protein, verfolgt (Mann et al., 1998). Unter diesen Bedingungen wurde eine Präferenz auswachsender Neuriten für CHO-Membranen + mNTRA ermittelt, wenn diese simultan mit CHO-Membranen – mNTRA angeboten wurden (s. Abb. 27). Dabei wurde insbesondere eine Präferenz der Explantate für mNTRA festgestellt, kurz nachdem die Neuritenbündel aus ihnen auswuchsen. Es wurde kein Effekt von mNTRA auf die Neuritenlänge festgestellt. Vielmehr zeigten die Neuriten die Tendenz, nach Erreichen einer bestimmten Länge, über die Substratgrenzen hinweg auszuwachsen. Eine Erklärung hierfür könnte eine zeitabhängig abnehmende biologische Aktivität von mNTRA sein. Dadurch würde ein Gradient mit zeitabhängig absteigender Konzentration von mNTRA entstehen. Eine als Adaptation beschriebene Eigenschaft auswachsender Axone innerhalb eines Gradienten besagt, dass eine Zu - oder Abnahme eines attraktiven oder repulsiven Substrats durch Regulation Effekt-vermittelnder Rezeptoren auf dem Wachstumskegel kompensiert wird. Unterschreitet das Substrat jedoch einen bestimmten Schwellenwert, bei der gleichzeitigen Anwesenheit eines homogen vorhandenen Substrats, wirkt sich diese Interaktion nicht mehr auf das Wachstumsverhalten aus (Song und Poo, 2001).

Vorherige Untersuchungen weisen auf eine Funktion von Mitgliedern der IgLON-Familie bei der Vermittlung des Neuritenwachstums *in vitro* hin. Die vorliegenden Daten implizieren eine bifunktionale Aktivität, die je nach Identität der Neuronen das Neuritenwachstum verstärken oder inhibieren kann. So stimuliert LAMP z.B. das Neuritenwachstum limbischer Axone, verstärkt den Verzweigungsgrad thalamischer Axone und wirkt inhibitorisch auf das Neuritenwachstum dorsaler Wurzelganglion (DRG) - Neuronen (Pimenta et al., 1995;

Mann et al., 1998). Dagegen unterstützt Neurotrimin das Neuritenwachstum von DRG Neuronen und unterdrückt das Neuritenwachstum sympathischer Neurone (Gil et al., 1998; 2002). Neurotractin stimuliert nur das Neuritenwachstum einer Subpopulation von telencephalischen Neuronen (Marg et al., 1999).

Ebenso wie Mitglieder der L1-Familie zeichnen sich Vertreter der IgLON-Familie durch ein komplexes heterophiles und homophiles Bindungsverhalten aus. Bisher wurden keine Interaktionen der IgLON-Mitgliedern mit Proteinen anderen Subgruppen der IgSF beobachtet. Dagegen wurden Hinweise auf Interaktionen von IgLON-Familienmitglieder untereinander beschrieben. Diese wurden sowohl in *cis*, als auch in *trans* nachgewiesen (Eagleson et al., 2003; Gil et al., 1998; Gil et al., 2002; Marg et al., 1999). Die Identität des Rezeptors für mNTRA auf hippocampalen Neuronen ist unbekannt, die angeführten Untersuchungen über das Bindungsverhalten der IgLON-Mitglieder weisen jedoch auf ein IgLON-Mitglied hin.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass mNTRA ein permissives Substrat für das Neuritenwachstum hippocampaler Neuronen darstellt und das auswachsende hippocampale Explantaten eine deutliche Präferenz für mNTRA aufweisen, wenn ein vergleichbares Substrat ohne mNTRA angeboten wird.

#### **4.2.5. Verteilung und Regulation von mNTRA nach entorhinaler Kortextläsion**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Verteilung von mNTRA nach entorhinaler Kortextläsion durchgeführt. Hierzu wurden Mäuse 2 dal, 5 dal und 16 dal immunhistologisch analysiert. Dabei wurde ein Anstieg bzw. eine Induktion der neuronalen Expression von mNTRA in verschiedenen Regionen 5 dal und 16 dal beobachtet. Diese Regulation von mNTRA wurde v.a. im ipsilateral zur Läsion gelegenen Hippokampus festgestellt. Dabei handelte es sich im einzelnen um eine verstärkte Expression in den Regionen CA1 – CA3 und auf Körnerzellen des Gyrus dentatus, sowie im Stratum lacunosum moleculare. Des weiteren wurde ein Anstieg der Expression von mNTRA im entorhinalen Kortex ipsilateral zur Läsion festgestellt (s. Abb. 29). Die Regulation von mNTRA 5d dal wurde mittels Western Blot untersucht. Dabei ergab sich ein Anstieg von etwa 80 % von mNTRA im ipsilateral zur Läsion gelegenen Hippokampus, im Vergleich zur kontralateralen Seite und zu Hippokampi unlädierter Mäuse (s. Abb. 32).

Die signifikanteste Beobachtung war allerdings die läsions-induzierte Expression von mNTRA auf reaktiven Astrozyten in der äußeren Molekularschicht im ipsilateral zur Läsion gelegenen Gyrus dentatus. (s. Abb. 30 + 31).

Die entorhinale Kortexläsion führt zu einer partiellen Denervation des Hippokampus. (Matthews et al., 1976; Kelley und Steward, 1997; Savaskan und Nitsch, 2001). Als Folge der Läsion kommt es in denervierten Regionen zu lokalem axonalem Wachstum, das als kollaterale Aussprossung bezeichnet wird (Cotman et al., 1981). Dieser schichtenspezifische Aussprossung folgt die Ausbildung neuer Synapsen, die den läsions-induzierten Verlust vorheriger Synapsen kompensieren und zu einer funktionellen Regeneration der denervierten Region führen. Die sequentiellen Prozesse nach Läsion wurden physiologisch klassifiziert (zusammengefasst in Kelley und Steward, 1997; Savaskan und Nitsch, 2001):

2 - 8 dal: Degenerative Prozesse und eine hohe phagozytotische Aktivität (Gall et al., 1979; Bechmann und Nitsch, 1997).

6 - 12 dal: Maximum des axonalen Wachstums, sowie der Etablierung neuer synaptischer Kontakte (Cotman et al., 1997, Matthews et al., 1976).

12 - 30 dal: Zeit, nach der das axonale Wachstum zum Stillstand kommt und die Formierung neuer Synapsen beendet ist (Lee et al., 1977; Matthews et al., 1976)

Reaktive Astrozyten scheinen eine Schlüsselrolle bei der läsions-induzierten Antwort im ZNS einzunehmen. Nach Läsion des ZNS wandern Astrozyten in die verletzte Region ein und bilden in der Folge eine gliale Narbe. Diese Struktur wird als eine molekulare und physische Barriere für axonales Wachstum angesehen, was v.a. auf die Sekretion von Chondroitinsulfat-Proteoglykanen (CSPGs) zurück geführt wird (McKeon et al., 1999; Asher et al., 2000). Untersuchungen im verletzten Rückenmark lieferten eine überzeugende Beweiskette für die Herstellung eines inhibitorischen Milieus für axonale Regeneration. Neben CSPGs sind es vor allem myelin-assoziierte Moleküle, die eine Regeneration von Axonen verhindert (Schnell und Schwab, 1990; Brösamle et al., 2000; Papadopoulos et al., 2002; Sicotte et al., 2003).

In dem hier verwendeten Läsionsmodell wird jedoch trotz der massiven Anwesenheit reaktiver Astrozyten eine funktionelle Regeneration der denervierten äußeren Molekularschicht durch axonale Wachstumsprozesse vollzogen. Es ist vielmehr anzunehmen, dass reaktive Astrozyten in diesem Modell an der regenerativen Aussprossung von Axonen beteiligt sind, anstatt diese zu inhibieren.



Elektrophysiologische Untersuchungen weisen für reaktive Astrozyten auf eine Dedifferenzierung nach entorhinaler Kortexläsion hin (Schröder et al., 1999). Neonatale Astrozyten weisen *in vitro* nach kurzer Kultivierungsdauer eine permissive Wirkung auf, die zu verstärktem Neuritenwachstum und erhöhter Synapsenzahl führt. Diese Effekte auf das Neuritenwachstum werden durch CAMs wie N-Cadherin, NCAM und Integrine vermittelt (Neugebauer et al., 1988; Smith et al., 1993; Smith et al., 1990). Ein synaptogener Effekt wurde für Cholesterol gezeigt, das von Gliazellen sezerniert wird. Weiterhin verstärkt ein lokaler, durch Integrine vermittelter Kontakt zwischen Neuronen und Astrozyten die Synapsenbildung *in vitro* (Mauch et al., 2001; Hama et al., 2004). Darüber hinaus wird nach Läsion die embryonale Form von NCAM (PSA-NCAM) auf reaktiven Astrozyten und aussprossenden Axonen in der äußeren Molekularschicht exprimiert (Miller et al., 1994). L1 CAM wird in der inneren Molekularschicht auf aussprossenden Axonen reexprimiert (Aubert et al., 1998). Beide Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems. Somit deutet eine Vielzahl von Hinweisen darauf hin, dass eine Reiteration von Entwicklungsprozessen nach Läsion auftritt. Daher sind insbesondere Moleküle, die während der Entwicklung des ZNS eine Rolle spielen, Kandidaten für die Herstellung eines permissiven Milieus nach Läsionen.

Interessanterweise, weisen septo-hippokampale Axone eine verminderte Fähigkeit zur Innervierung des Hippokampus und des Aussprossens auf, wenn sie mit Antikörpern gegen LAMP behandelt werden (Keller et al., 1989). Diese Axone projizieren in die polymorphe Schicht unter der Körerzellschicht im Gyrus dentatus, sowie in beide Molekularschichten. Weiterhin werden das Stratum radiatum und Stratum oriens innerviert (Skutella und Nitsch, 2001). LAMP und mNTRA, beides Mitglieder der IgLON-Familie können miteinander interagieren (Marg et al., 1999). Ob diese beiden Moleküle eine relevante Funktion bei der Entwicklung hippokampaler Afferenzen *in vivo* ausüben wurde bisher nicht untersucht. Auch über eine mögliche Regulation von LAMP nach entorhinaler Kortexläsion ist nichts bekannt. Vergleichende Untersuchungen über die Verteilung von mNTRA und LAMP könnten in der Zukunft Hinweise auf deren mögliche funktionelle Interaktion bei der Entwicklung hippokampaler Afferenzen und der läsions-induzierten Axonsprossung geben.

#### 4.2.6. Vorläufige Analyse mNTRA-defizienter Mäuse

Die Genetische Inaktivierung von Genen in der Maus ist eine wertvolle Methode zur Untersuchung der *in vivo* Funktion von Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine für mNTRA defiziente Mauslinie generiert.

Eine vorläufige Untersuchung der Hirnanatomie defizienter Mäuse ergab keine sichtbaren Abweichungen in der Hirnanatomie zu Wildtyp-Mäusen. mNTRA-defiziente Mäuse sind vital und fortpflanzungsfähig. Homozygote Tiere treten nach Verpaarung heterozygoter Tiere in einer Mendelschen Verteilung auf (s. Abb. 34). Aufgrund der hohen Konservierung der IgLON-Mitglieder untereinander und der teilweise überlappenden Expression wäre es möglich, dass andere Mitglieder kompensatorisch für das Fehlen von mNTRA wirken. Ähnliches wird für NrCAM-defiziente Mäuse berichtet. Hier wird erst nach Erzeugung einer NrCAM / L1 - Doppelmutante ein Phänotyp während der Entwicklung des Cerebellums beobachtet (Sakurai et al., 2001). Es ist allerdings noch zu früh eine Aussage über das Vorhandensein oder Fehlen eines Phänotyps zu treffen. Hierzu sind detaillierte anatomische Untersuchungen unterschiedlicher Entwicklungsstadien notwendig. Von besonderem Interesse wäre eine Untersuchung der axonalen Aussprossung nach entorhinaler Kortexläsion in mNTRA-defizienten Mäusen. Hiermit könnten die Hinweise auf eine Funktion von mNTRA bei diesem Vorgang überprüft werden. Daher stellt diese Mauslinie einen wichtigen Ausgangspunkt für zukünftige Untersuchungen zur *in vivo* Funktion von mNTRA dar.