

Aus dem Institut für Zell- und Neurobiologie, Centrum für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression von CALEB/NGC im embryonalen Mausgehirn

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Magda Marszalek

aus Breslau

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Abstract	XI
1 Einführung.....	1
1.1 Entwicklung des Gehirns	2
1.1.1 Morphologische Gehirnentwicklung.....	2
1.1.2 Histologische Gehirnentwicklung am Beispiel der Maus	3
1.2 CALEB/NGC	7
1.2.1 Expression von CALEB/NGC	9
1.2.2 Bindungspartner von CALEB/NGC.....	10
1.2.3 Funktionen von CALEB/NGC	12
1.3 Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Tiere	17
2.1.2 Antikörper	17
2.1.2.1 Primäre Antikörper.....	17
2.1.2.2 Sekundäre Antikörper	19
2.1.3 Chemikalien	20
2.1.4 Verbrauchsmaterial	21
2.1.5 Geräte	21
2.1.6 Programme	22
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Affinitätsreinigung des <i>Rb-anti-GST-hCALb-cyt</i> -Antikörpers	23
2.2.1.1 Expression eines rekombinanten CALEB/NGC-Fusionsproteins.....	23
2.2.1.2 Abspaltung des GST-Tags	25
2.2.1.3 Affinitätsreinigung des Antikörpers an <i>hCALEBb-cyt</i>	25
2.2.2 Herstellen eines Gehirnaufschlusses	27

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Methode	28
2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.2.5 Coomassie Blau-Färbung	30
2.2.6 Western Blot/ Immunblot.....	30
2.2.7 Immunhistochemische Färbungen.....	32
2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie.....	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Spezifität der CALEB/NGC-Antikörper	36
3.2 Immunhistochemie (<i>Rb-anti-MBP-mCALextra</i>)	38
3.2.1 Telencephalon	40
3.2.1.1 Neokortex	41
3.2.1.2 Basalganglien	48
3.2.1.3 Rhinencephalon	50
3.2.1.4 Hippocampus.....	52
3.2.2 Diencephalon.....	55
3.2.5 Retina	57
3.2.3 Mesencephalon.....	61
3.2.4 Rhombencephalon: Pons, Medulla oblongata, Cerebellum	65
3.3 Immunhistochemie (<i>Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt</i>).....	70
4 Diskussion	74
4.1 Technische und methodische Probleme	74
4.2 Vergleich mit bisherigen Expressionsstudien	76
4.3 Neuritenwachstum.....	78
4.4 Axonlenkung	80
4.5 Zellmigration	84
4.6 Mögliche Interaktionspartner in den Embryonalstadien	87
4.7 Ausblick	89
5 Literaturverzeichnis.....	92
Eidesstattliche Erklärung.....	102
Lebenslauf	103
Danksagung.....	104

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Entwicklung des Gehirns.....	2
Abbildung 2: Kortexschichten zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten.....	4
Abbildung 3: Darstellung des CALEB/NGC-Proteins beim Säuger.....	8
Abbildung 4: Immunblot zur Untersuchung der Spezifität der anti-CALEB/NGC-Antikörper.	36
Abbildung 5: CALEB/NGC außerhalb des Gehirns.....	37
Abbildung 6: Negativkontrolle der sekundären Antikörper.....	39
Abbildung 7: CALEB/NGC, Tau-1 und DAPI an E17.....	40
Abbildung 8: CALEB/NGC im rostralen Telencephalon und Diencephalon an P1.....	41
Abbildung 9: CALEB/NGC an E15, E18 und P1.....	43
Abbildung 10: CALEB/NGC und Reelin im Neokortex an E17.....	44
Abbildung 11: CALEB/NGC im Neokortex an E14, E16, E19 und P1.....	44
Abbildung 12: CALEB/NGC und DAPI im Neokortex an E16.....	45
Abbildung 13: CALEB/NGC und DAPI im Neokortex an P1.....	45
Abbildung 14: CALEB/NGC und Nestin im Neokortex an P1.....	45
Abbildung 15: CALEB/NGC und Tau-1 im Neokortex an E17.....	46
Abbildung 16: CALEB/NGC in der Ventrikularzone an E16.....	47
Abbildung 17: CALEB/NGC und Doublecortin im Neokortex an E14.....	47
Abbildung 18: CALEB/NGC und Doublecortin im Neokortex an E16.....	48
Abbildung 19: CALEB/NGC und Nestin in den Ganglienhügeln/Striatum an E14.....	49
Abbildung 20: CALEB/NGC und DAPI um die Seitenventrikel an P1.....	50
Abbildung 21: CALEB/NGC und DAPI im Bulbus olfactorius an E16.....	51
Abbildung 22: CALEB/NGC im Bulbus olfactorius an E19.....	51
Abbildung 23: CALEB/NGC im Bulbus olfactorius an P1.....	52
Abbildung 24: CALEB/NGC im Hippocampus an E18 und P1.....	53
Abbildung 25: CALEB/NGC, Doublecortin und DAPI im Hippocampus an E19.....	54
Abbildung 26: CALEB/NGC im Kortex und Diencephalon an E14.....	55
Abbildung 27: CALEB/NGC im Diencephalon an E15 und an E18.....	56
Abbildung 28: CALEB/NGC und Nestin in der Retina an E14.....	58
Abbildung 29: CALEB/NGC und Doublecortin in der Retina an E17.....	58
Abbildung 30: CALEB/NGC und DAPI im Auge an P1.....	59

Abbildung 31: CALEB/NGC im Nervus opticus an P1 und E14.....	59
Abbildung 32: CALEB/NGC im Chiasma opticum an E14 und E16.....	60
Abbildung 33: CALEB/NGC, Tau-1 und DAPI im Chiasma opticum an E17..	60
Abbildung 34: CALEB/NGC in der Commissura posterior an E14.....	61
Abbildung 35: CALEB/NGC im Colliculus superior an E14.....	61
Abbildung 36: CALEB/NGC in der Medianebene der Commissura posterior an E18.	62
Abbildung 37: CALEB/NGC und DAPI der Commissura posterior an E16.....	62
Abbildung 38: CALEB/NGC und DAPI im Colliculus inferior an E16.	63
Abbildung 39: CALEB/NGC im ventralen und dorsalen Mesencephalon und im Colliculus superior an P1.....	64
Abbildung 40: CALEB/NGC und DAPI im Colliculus inferior an P1.....	65
Abbildung 41: CALEB/NGC im Pons an E15 und an E18.	66
Abbildung 42: CALEB/NGC und Nestin in der Mittellinie des Pons an E15.....	66
Abbildung 43: CALEB/NGC in der Medulla oblongata an E14 und E18.....	67
Abbildung 44: CALEB/NGC im Cerebellum an E16 und an P1.....	68
Abbildung 45: CALEB/NGC und DAPI im Cerebellum an E16.	69
Abbildung 46: CALEB/NGC und DAPI im Cerebellum an P1..	69
Abbildung 47: CALEB/NGC und Calbindin im Cerebellum an P1.....	70
Abbildung 48: <i>Rb-anti-MBP-mCALextra</i> und <i>Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt</i> im Neokortex an P1.	71
Abbildung 49: <i>Rb-anti-MBP-mCALextra</i> , <i>Rb-anti-hCALb-cyt</i> und <i>Rb-anti-GST-hCALb-cyt</i> in der Retina an P1..	71
Abbildung 50: <i>Rb-anti-MBP-mCALextra</i> , <i>Rb-anti-hCALb-cyt</i> und <i>Rb-anti-GST-hCALb-cyt</i> in der Mittellinie des Colliculus superior an P1..	72
Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten primären Antikörper	19
Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper	19

Abkürzungsverzeichnis

A	Alveus
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aq	Aquaeductus mesencephali
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BCS	Brachium colliculi superiores
BO	Bulbus olfactorius
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CA	Cornu ammonis
ca.	Circa
CALEB	Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein
Cb	Cerebellum
CC	Corpus callosum
CE	Capsula externa
CF	Commissura fornicis
CGL	Corpus geniculatum laterale
CI	Colliculus inferior
CIc	Colliculus inferior, caudal
CO	Chiasma opticum
CP	Commissura posterior
CS	Colliculus superior
CSPG	Chondroitinsulfat-Proteoglykan
Ctx	Kortex
D	Diencephalon
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCA	Deoxycholsäure
DCX	Doublecortin
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DP	Deckplatte
DT	Dorsaler Thalamus
DTT	Dithiothreitol
E	Embryonaltag
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithelial growth factor (epithelialer Wachstumsfaktor)
EPSC	Excitatory postsynaptic current (exzitatorischer postsynaptischer Strom)
ET	Epithalamus
F	Fornix
FCS	Fötales Kälberserum
FLM	Fasciculus longitudinalis medialis
FR	Fasciculus retroflexus

g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Stratum glomerulare
GABA	γ -Aminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus
GR	Stratum granulosum
GST	Glutathion-S-Transferase
GZ	Ganglienzellschicht
H	Hippocampus
HCl	Salzsäure
HERNS	Hereditäre Endotheliopathie mit Retinopathie, Nephropathie und Schlaganfall
IH	Immunhistochemie
IPS	Innere plexiforme Schicht
IPSC	Inhibitory postsynaptic current (inhibitorischer postsynaptischer Strom)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IPZ	Innere plexiforme Schicht
IZ	Intermediärzone
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KP	Kortikale Platte
LH	Laterale Habenula
l	Liter
LB	Luria broth
LM	Lemniscus medialis
LOT	Lateraler olfactorischer Trakt
M	Molar
m	Milli-
μ	Mikro-
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MBP	Maltose-Bindungsprotein
MgCl₂	Magnesiumchlorid
ME	Mesencephalon
min	Minute(n)
MO	Medulla oblongata
mRNA	Messenger-ribonucleic acid (Messenger-Ribonucleinsäure)
MT	Mamillothalamischer Trakt
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MZ	Marginalzone
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Ncl.	Nucleus
NDM	Nucleus dorsomedialis thalami
NGC	Neuroglycan C
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NPT	Nucleus praetectalis
NSC	Nucleus suprachiasmaticus

NSL	Nucleus septalis lateralis
NVP	Nucleus ventralis posterior thalami
OFS	Opticusfaserschicht
OV	Olfactorischer Ventrikel
P	Postnataler Tag
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
p.c.	Post conceptionem = nach Empfängnis
PE	Pigmentepithel
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase
PIST	PDZ domain protein interacting specifically with TC10
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Pyramidenzellschicht
R	Retina
rpm	Rotationen pro Minute
S	Striatum
s.	Siehe
SCO	Subcommissuralorgan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFE	Stratum fibrosum externum
SGE	Stratum granulosum externum
SGI	Stratum granulosum internum
SM	Stratum moleculare
SME	Stratum moleculare externum
SMI	Stratum moleculare internum
SO	Stratum oriens
SP	Stratum purkinjense
SPE	Stratum plexiforme externum
SPI	Stratum plexiforme internum
StM	Stratum mitrale
SVZ	Subventrikulärzone
T	Telencephalon
TBS	„Tris buffered saline“ (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBST	“Tris buffered saline” mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
Th	Thalamus
TO	Tractus opticus
TP	Tractus pyramidalis
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX-100	Triton X-100
UP	Unterplatte
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	Vorplatte
Vtr.	Ventrikel
VZ	Ventrikulärzone
WB	Western Blot
ZGS	Zentrale graue Substanz
ZNS	Zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Die Gehirnentwicklung beinhaltet ein Zusammenspiel diverser Moleküle. Das Transmembranprotein CALEB/NGC (Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein/Neuroglycan C) ist Teil davon. Es besitzt ein Expressionsmaximum zum Zeitpunkt der Gehirnentwicklung, ist im postnatalen Gehirn vorwiegend an neuritenreiche Regionen gebunden und an Neuritenwachstum, Dendritenverzweigung und der Synapsenfunktion beteiligt (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000; Schumacher und Stübe, 2003; Hassel et al., 2003; Jüttner et al., 2005; Nakanishi et al., 2006; Brandt et al., 2007, 2008). Das Vorkommen und die Funktion im embryonalen Gehirn sind jedoch bislang weitestgehend unerforscht.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Expressionsmuster von CALEB/NGC im Mausgehirn sowie der Mausretina vom 14. Embryonaltag bis zum ersten postnatalen Tag mittels indirekter Immunhistochemie untersucht. Für die Studie wurde ein gegen den extrazellulären Proteinbereich gerichteter Antikörper verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels eines zweiten CALEB/NGC-Antikörpers verifiziert, der zuvor gegen den rekombinanten, intrazellulären Proteinbereich affinitätsgereinigt wurde. Im Immunblot wurden die benutzten Antikörper auf ihre Spezifität überprüft. Die Studie wurde desweiteren durch Kofärbungen mit DAPI und Antikörpern gegen Reelin, Doublecortin, Nestin, Calbindin und Tau-1 ergänzt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen mit dem hochspezifischen CALEB/NGC-Antikörper zeigten ein örtlich und zeitlich differenziertes Expressionsmuster mit einer Anreicherung in neuritenreichen und kernarmen Regionen des Gehirns. Es fand sich eine starke, schichtspezifische Expression im Neokortex, Hippocampus, Bulbus olfactorius, Cerebellum und in der Retina. Es fiel überdies eine markante Expression im Striatum sowie in Mittellinienregionen auf, insbesondere im Chiasma opticum, der Commissura posterior und in den Nestin-positiven Mittellinienglia des ventralen Mesencephalon, des Pons und der Medulla oblongata. Zudem zeigte sich eine Expression um Fasertrakte wie die hippocampalen Fimbrien, den Alveus und den Fornix. Die Kofärbungen wiesen auf eine Expression von CALEB/NGC in einigen Doublecortin-exprimierenden jungen (migrierenden) Neuronen sowie Nestin-exprimierenden Radialglia, Mittellinienglia und Proneuronen/Stammzellen hin.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen verifizieren das Vorkommen von CALEB/NGC im embryonalen Mausgehirn und identifizieren erstmalig das Expressionsmuster im gesamten Gehirn. Das dominierende Vorkommen in neuritenreichen Strukturen deutet auf einen Zusammenhang von CALEB/NGC mit Neuriten-assoziierten Vorgängen in der embryonalen Gehirnentwicklung hin. Zudem offenbart die Mittellinienexpression an Axonkreuzungsstellen und um einige Fasertrakte eine mögliche Beteiligung an Axonlenkungsvorgängen. Aufgrund der Expression in Doublecortin-positiven migrierenden Neuronen und in den Radialglia könnte CALEB/NGC überdies einen neuen potentiellen Akteur in der Zellmigration darstellen.

Abstract

Brain development is comprised of the interaction of diverse molecules. CALEB/NGC (Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein/ Neuroglycan C) is one of these. This transmembrane protein has its peak expression during brain development. It is found in the postnatal brain in neurite rich regions and takes part in neurite growth, dendritic branching and synapse function (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000; Schumacher und Stübe, 2003; Hassel et al., 2003; Jüttner et al., 2005; Nakanishi et al., 2006; Brandt et al., 2007, 2008). The expression and the function of CALEB/NGC in the prenatal brain, however, are basically unknown.

In order to explore this, the expression pattern of CALEB/NGC in the mouse brain and retina from embryonic day 14 until the first postnatal day was analyzed via indirect immunofluorescence. An antibody directed against the extracellular part of the protein was used and the results were verified with the use of a second, affinity purified CALEB/NGC-antibody directed against the intracellular protein part. The specificity of the utilized antibodies was tested with immunoblot. The immunohistochemistry was further supplemented by counterstaining with DAPI and Reelin-, Doublecortin-, Nestin-, Calbindin- and Tau-1-antibodies.

The immunohistochemistry showed a regionally and temporally differentiated expression pattern with a concentration of CALEB/NGC in neurite-rich regions of the brain. A strong, layer specific expression was detected in the cerebral cortex, hippocampus, olfactory bulb, cerebellum and retina. There was a prominent expression in the striatum as well as in the midline regions, particularly the optic chiasm, the posterior commissure and the nestin-positive midline glia of the ventral mesencephalon, pons and medulla oblongata. It also

appeared around certain fiber tracts such as the hippocampal fimbria, the alveus and the fornix. The counterstains indicated an expression of CALEB/NGC by some doublecortin-expressing young (migrating) neurons as well as by nestin-expressing radial glial cells, midline glia and proneurons/stem cells.

This is the first time the expression pattern of CALEB/NGC in the whole brain of the embryonic mouse has been identified. The dominating expression in neurite-rich structures indicates a correlation of CALEB/NGC with neurite-associated processes during embryonic brain development. Furthermore, the specific expression in the midline of commissural axon tracts and around certain neural pathways implies a possible involvement in axon guidance. Based on the expression in doublecortin-positive migrating neurons and in radial glial cells a role as an actor in cell migration is also conceivable.

1 Einführung

Aus einer einfachen Zellschicht entwickelt sich ein überaus kompliziertes Gebilde. Verschiedene Zellen, die miteinander in Kontakt stehen, formen schließlich als Ganzes das Gehirn. Während dieses komplexen Entwicklungsprozesses erfolgen Proliferation, Migration, Differenzierung, das Überleben neu entstandener Zellen und deren Verknüpfung über Synapsen, zum Teil über weite Entfernungen hinweg (Evans, 2012). Fehler in diesen Prozessen können gravierende Missbildungen hervorbringen und Ursache von kognitiven Beeinträchtigungen, Epilepsie und Blindheit sein (Evans, 2012). Bekannte Syndrome, die ihren Ursprung in fehlerhaften Gehirnentwicklungsprozessen haben, sind unter anderem die Lissenzephalie, das Zellweger-Syndrom, subkortikale Bandheterotopien, die Agenesie des Corpus callosum und die Schizenzephalie (Ross und Walsh, 2001). Leider sind die molekularen und zellulären Vorgänge der Entstehung dieser Fehlbildungen und der hieran beteiligten Moleküle bisher nur im Ansatz erforscht. Das Verständnis der Entstehung des normalen sowie des fehlerhaften Gehirns ist jedoch essentiell für die Entwicklung neuer Therapien und Medikamente zur Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS).

Eine Beteiligung an Entwicklungsprozessen im Gehirn konnte für das Transmembranprotein CALEB/NGC in der späten postnatalen Phase der Kortikogenese nachgewiesen werden (Brandt et al., 2007). Der Schwerpunkt der postnatalen Entwicklung liegt dabei auf der Dendritogenese und vor allem der Synapsenbildung (Evans, 2012). Das Vorkommen von CALEB/NGC im Embryonalalter konnte ebenfalls nachgewiesen werden, die Funktion des Proteins in der frühen pränatalen Kortikogenese ist jedoch bisher weitestgehend unbekannt (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997, 2001; Ida et al., 2006). Zu diesem Zeitpunkt dominieren im Gehirn Geschehnisse wie die Proliferation und Migration von Vorläuferzellen, sowie das beginnende Auswachsen von Dendriten und Axonen, welche sich zu ersten Axontrakten bündeln (Evans, 2012).

Um eine Beteiligung von CALEB/NGC an der pränatalen Gehirnentwicklung zu untersuchen, ist eine genaue regionale Expressionsanalyse unerlässlich. Zudem wird hierdurch der Weg für weiterführende Experimente geebnet, um schließlich mehr Erkenntnisse über die Aufgabe von CALEB/NGC in der frühen Kortikogenese und seine mögliche Beteiligung an der Entstehung von Gehirnfehlbildungen zu gewinnen.

1.1 Entwicklung des Gehirns

1.1.1 Morphologische Gehirnentwicklung

Die Gehirnentwicklung beginnt in der frühen Embryonalphase mit der Neuralplatte, die aus Neuroektoderm besteht. Die Neuralplatte vertieft sich zu der Neuralrinne und schließt sich nachfolgend durch Zusammenführen der lateralen Anteile zum Neuralrohr. Aus dem caudalen Ende des Neuralrohrs entwickelt sich das Rückenmark, aus dem rostralen Ende entstehen durch Ausstülpung die Gehirnbläschen, welche mit neuronalen Stammzellen ausgekleidet sind (Abbildung 1). Diese Region wird auch Ventrikularzone (VZ) genannt, da sie an die Ventrikel grenzt. Von den dort angesiedelten Stammzellen geht die Dickenzunahme des Gehirns aus, indem sich die Stammzellen teilen und die Tochterzellen in Richtung Pia mater encephali wandern. Nach der Migration erfolgt die Maturation, also das zielgerichtete Auswachsen von Axonen, die Bildung von Dendriten, die Expression charakteristischer biochemischer Moleküle und schließlich die Synaptogenese (Swanson, 2003).

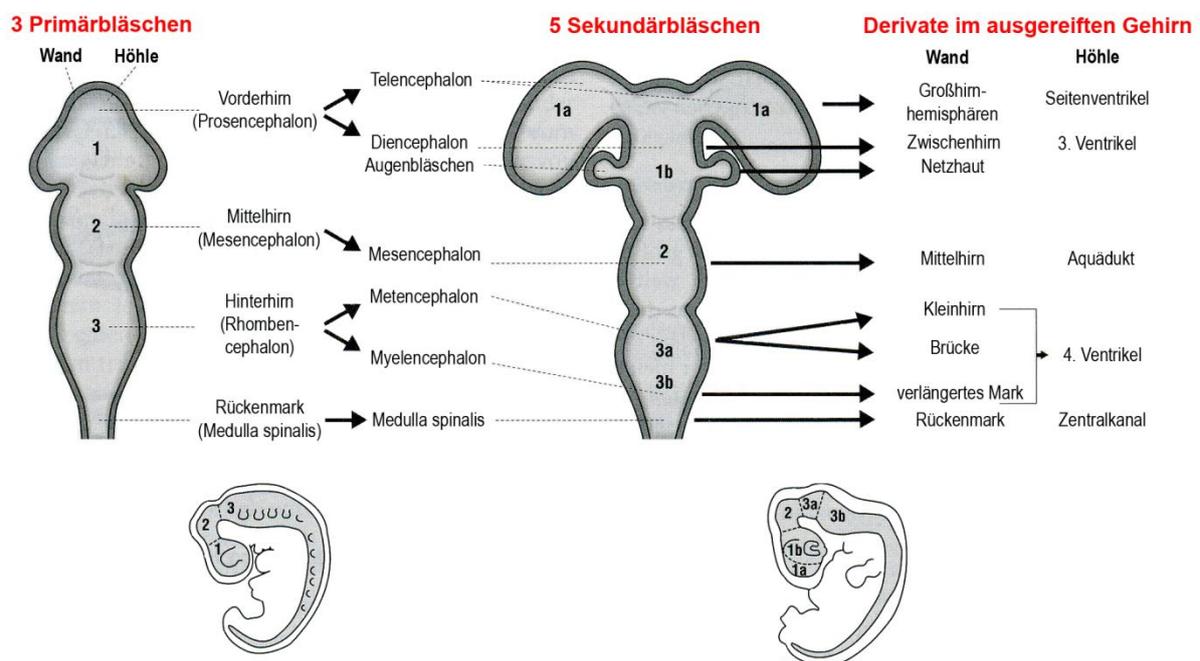


Abbildung 1: Morphologische Entwicklung des Gehirns. Entwicklung aus dem Neuralrohr über das Primärbläschenstadium (linker Teil der Abbildung; entspricht einem Mausembryo am 9. Tag post conceptionem (p.c.)) und das Sekundärbläschenstadium (rechter Teil der Abbildung; entspricht einer Maus am 10. Tag p.c.) zum ausgereiften Gehirn. Im unteren Teil der Abbildung ist eine entsprechende sagittale Ansicht dargestellt. Modifiziert nach Trepel, 2004a.

1.1.2 Histologische Gehirnentwicklung am Beispiel der Maus

Als erstes soll die Entstehung des Neokortex beschrieben werden, welcher die phylogenetisch jüngste Region des Gehirns und mit sechs verschiedenen Schichten auch die komplexeste ist. Am Embryonaltag (E) 8,5 besteht der Mauskortex aus der Ventrikularzone, die die Vorläuferzellen von Neuronen und Gliazellen beherbergt. Nach E8,5 verlassen die ersten neuronalen Vorläuferzellen die Ventrikularzone und migrieren durch somale Translokation radial in Richtung Pia mater. Der Kortex besteht nun aus Ventrikularzone, Vorplatte (direkt an der Pia mater) und der dazwischen liegenden Intermediärzone (IZ), welche von den Axonen der Vorplattenneurone sowie einwachsenden Axonen aus dem Thalamus gebildet wird (Bronner-Fraser und Hatten, 2003).

Es folgt eine zweite Migrationswelle von Neuronen, welche eine kompakte Schicht, bezeichnet als kortikale Platte (KP), formen werden. Sie wandern von der Ventrikularzone radial in Richtung Pia mater und kommen inmitten der Vorplatte zum Halt. Dieser Prozess erfolgt entlang einem ventrolateralen nach dorsomedialen Gradienten, so dass spät an E12 die kortikale Platte erstmals ventrolateral im Gehirn sichtbar wird (Smart und Smart, 1982; Sheppard et al., 1991). Der äußere Teil der nun zweigeteilten Vorplatte wird ab jetzt als Marginalzone (MZ) und der innere Teil als Unterplatte (UP) bezeichnet (Abbildung 2). Den ersten die Vorplatte spaltenden Neuronen lagern sich nach und nach weitere Neurone außen an, indem sie an den frisch migrierten Zellen vorbeiziehen. Da somit der Kortex von innen nach außen aufgebaut wird, bezeichnet man dies als „inside-out-layering“ (Bronner-Fraser und Hatten, 2003).

Für ihre Wanderung von der VZ in den Kortex sind diese exzitatorischen Neurone der kortikalen Platte auf eine Leitstruktur angewiesen. Diese wird von den Radialgliazellen gewährleistet (Marín und Rubenstein, 2003). Diese Zellen haben ihre Zellkörper in der Ventrikularzone und sind jeweils mit einem kurzen Fortsatz an der Ventrikeloberfläche und mit einem langen Fortsatz, mittels mehrerer Endfüßchen, an der Piaoberfläche befestigt. Somit überspannen sie die gesamte Kortexbreite (Zecevic, 2004). Die in der Ventrikularzone entstehenden Neurone wandern radial in Richtung Pia mater, indem sie die Fortsätze der Radialglia als Gerüst benutzen. Auf diese Weise durchqueren sie die Intermediärzone, die Unterplatte und die kortikale Platte, um direkt unterhalb der Marginalzone zum Halt zu kommen. Dort lösen sie sich von den Radialglia-Fortsätzen und beginnen ihre Reifung (Marín und Rubenstein, 2003).

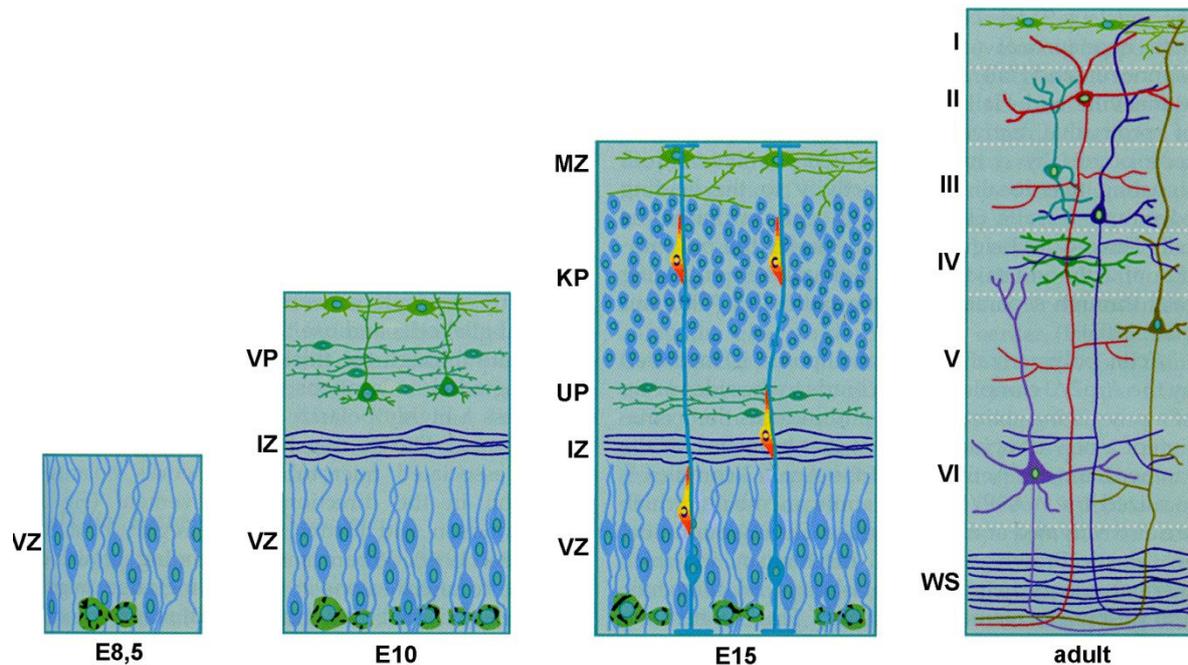


Abbildung 2: Kortexschichten zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. An E8,5 besteht der Neokortex aus der Ventrikularzone (VZ). An E10 beinhaltet er zusätzlich die Intermediärzone (IZ) und die Vorplatte (VP). Aus der VZ wandern Proneurone aus und lassen sich inmitten der Vorplatte (VP) nieder. Sie bilden so die kortikale Platte (KP), aus deren Neuronen schließlich die kortikalen Schichten II bis VI hervorgehen. MZ, Marginalzone; UP, Unterplatte; WS, weiße Substanz. Modifiziert nach Bronner-Fraser und Hatten, 2003.

Der Mechanismus der radialen Migration der oben beschriebenen zukünftigen exzitatorischen Neurone unterscheidet sich grundlegend vom Migrationsmechanismus inhibitorischer GABA-erger Interneurone. Der Ursprung der Interneurone, die in den Neokortex, aber auch in den Hippocampus und in den Riechkolben wandern, befindet sich in der medialen, lateralen und caudalen ganglionären Eminenz, welche die Vorläuferstruktur der Basalganglien darstellt (Anderson et al., 1997; Lavdas et al., 1999; Nery et al., 2002). Um an ihren Zielort zu gelangen, migrieren die Interneurone parallel zur Kortexoberfläche in tangentialer Richtung. Dabei erfolgt die Wanderung in frühen Entwicklungsphasen in der Marginalzone, zwischen E13 und E15 hauptsächlich in der Intermediärzone und später in der IZ/Subventrikulärzone (SVZ) und der Unterplatte. Neurone, die in der MZ wandern, erreichen die kortikale Platte, indem sie von lateral in Richtung Ventrikel vordringen, wohingegen Neurone, die in der IZ/SVZ und UP wandern, direkt oder nach einer kurzen Pause in der VZ von medial in die kortikale Platte eindringen (Métin et al., 2006). Nur in der Endphase ihrer Migration wandern die inhibitorischen Neurone also radial in den Kortex, um dann ihre Endposition in der entsprechenden Schicht einzunehmen (Ang et al., 2003). Dabei gibt es Hinweise, dass die Interneurone TAG-1-exprimierende kortikofugale Fasern in der IZ und der MZ als Gerüst für

ihre Wanderung benutzen – ähnlich den Radialglia-Fortsätzen bei der Migration der exzitatorischen kortikalen Neurone (Denaxa et al., 2001).

Nach Vollendung der neuronalen Migration und Differenzierung besteht der Kortex schließlich aus sechs Schichten. Schicht I ist aus der Marginalzone hervorgegangen, die Schichten II bis VI entstehen aus der kortikalen Platte. Die Intermediärzone wird zur faserreichen weißen Substanz des Gehirns (Bronner-Fraser und Hatten, 2003). Die Neurone der Unterplatte gehen zum großen Teil in Apoptose, die Verbleibenden stellen interstitielle Zellen der weißen Substanz und bilden ein horizontal angeordnetes Zellband direkt unter der Schicht VI des Kortex (Friedlander und Torres-Riveron, 2009). Um die Ventrikel herum befinden sich auch im adulten Gehirn noch neuronale Stammzellen, welche einen Stammzellpool GABA-erger Neurone für den Riechkolben sowie kortikale und subkortikale Strukturen bilden (Inta et al., 2008).

Die Entstehung des dreischichtigen Cerebellums erfolgt von zwei Keimzentren aus. Aus der Ventrikularzone des IV. Ventrikels gehen die Vorläufer der Purkinjezellen und die Zellen der Kleinhirnerne hervor. Sie machen eine radiale Migration durch und benutzen dabei die Bergmann-Gliazellen als Leitstruktur, analog den Radialglia im Kortex. Das zweite Keimzentrum – die Rautenlippen – befindet sich dorsolateral des IV. Ventrikels. Seine Stammzellen wandern in tangentialer Richtung aus und bilden direkt unter der Pia mater der Kleinhirnanlage ein Band teilungsfähiger Zellen – die äußere Körnerzellschicht. Von dieser Zellpopulation wiederum geht von E13 bis zum postnatalen Tag (P) 15 durch Wanderung postmitotischer Zellen an den Purkinjezellen vorbei in Richtung Ventrikel die innere Körnerzellschicht aus (Bronner-Fraser und Hatten, 2003; Kugler, 2004a).

Das Auge entwickelt sich als Ausstülpung des Diencephalons. Die Wände dieses sogenannten Augenbeckens lagern sich derart aneinander, dass ein kelchförmiges Gebilde mit doppelter Wand resultiert. Aus dem inneren Blatt entsteht das retinale Pigmentepithel, aus dem äußeren Blatt gehen die übrigen retinalen Zellen hervor. Zu E11 beginnt in dem äußeren Blatt die Neurogenese. Es besteht bereits eine Gliederung in Ventrikularzone und Marginalzone (dem Glaskörper anliegend). Postmitotische Zellen der Ventrikularzone wandern in die Marginalzone ein und bilden dort die Intermediärzone, aus deren Zellen sich die Ganglien- und Amakrinzellen sowie überwiegend postnatal die Müller-Zellen ausdifferenzieren. Zwischen der VZ und der IZ befindet sich eine transitorische Faserschicht, welche allmählich durch Axone der Intermediärzonen-Zellen ersetzt wird, die schließlich die innere plexiforme Schicht bilden. Zwischen den sich als erstes differenzierenden Ganglienzellen (E12 bis E16)

und der Grenzschicht zum Glaskörper bilden die auswachsenden Axone der Ganglienzellen die Optikusfaserschicht aus. Aus den übrigen Zellen der Ventrikularzone entwickeln sich die Horizontal- und Bipolarzellen, sowie die Photorezeptoren. Zwischen diesen Zellschichten entsteht postnatal die äußere plexiforme Schicht (Bhattacharjee, 1977; Drenckhahn und Rager, 2004; Rapaport et al., 2004).

Die Kerngebiete enthaltenden, nicht-laminären Strukturen des Gehirns entstehen auf unterschiedliche Weise. Im Diencephalon lagern sich Proneurone hauptsächlich aus der Ventrikularzone in Ventrikelnähe zusammen (Asan und Kugler, 2004). Im Hirnstamm bilden sich die Kerne, nach tangentialer und longitudinaler Migration der Neurone, entlang der Neuralrohrachse aus (Neuhuber, 2004). Im Rückenmark wandern Proneurone über Radialglia aus der VZ aus und bilden die Intermediärzone, aus der sich später die graue Substanz entwickelt. Ventral und lateral schließt sich außen die faserreiche Marginalzone an, die später zur weißen Substanz des Rückenmarks wird (Kugler, 2004b).

Damit alle Neurone im Gehirn – exzitatorische wie auch inhibitorische – ihren Bestimmungsort erreichen, vollzieht sich ein komplexes Zusammenspiel von vielerlei Vorgängen. Bei Fehlern in diesem Ablauf können mentale Retardierung, Epilepsie und Lernstörungen bei den Betroffenen resultieren (Evans, 2012). Die Quelle einer fehlerhaften Zellpositionierung kann mehrere Ursprünge haben. Eine gestörte Zellproliferation, frühzeitige Apoptose oder misslungene Differenzierung kann Einfluss auf die eigene Positionierung und die anderer Zellen nehmen. Ferner kann die Beeinflussung mechanischer Motoren und zytoskeletaler Dynamik sowie molekularer Signale, die als Initiator der Migration oder Stopp-Signal fungieren oder die Migrationsrichtung anzeigen, zu Störungen der Zellwanderung führen (Ross und Walsh, 2001).

Durch experimentelle Überexpression und/ oder Unterdrückung bekannter Migrationsfaktoren konnte ihre Funktion bei der Entstehung von anormalen Kortextmorphologien verdeutlicht werden. So wurde gezeigt, dass Mutationen des Doublecortin-Gens im Menschen zu X-chromosomal vererbter Lissencephalie führen. Diese Erkrankung äußert sich bei Männern in vergrößerten Gyri oder Agyrie und bei Frauen in einem weniger gravierenden „Doublecortex“-Syndrom, auch bekannt als Subkortikale-Band-Heterotopie (Des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998). Das Genprodukt Doublecortin (DCX) ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein (MAP) und bewirkt eine Stabilisierung des Mikrotubuli-Netzwerks (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999).

Ein Krankheitsbild mit einer Inversion der kortikalen Schichten II-VI entsteht durch Nonsensemutationen des Reelin-Gens. Die Neurone der kortikalen Platte hören vorzeitig auf zu wandern und setzen sich unterhalb anstatt oberhalb der kortikalen Platte ab (Caviness, 1982).

Da derartige Störungen gravierende Auswirkungen auf das persönliche Schicksal der Betroffenen haben, ist es von besonderem Interesse, die an der Gehirnentwicklung beteiligten Prozesse zu entschlüsseln und die involvierten Moleküle zu ermitteln.

1.2 CALEB/NGC

CALEB steht für Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein und wurde von Schumacher et al. (1997) im Huhn beschrieben. Bei der Ratte wurde es unter dem Namen Neuroglykan C (NGC) bekannt (Watanabe et al., 1995). Das dazugehörige Gen wurde als Chondroitinsulfat-Proteoglykan 5 (CSPG5) beim Menschen klassifiziert (Yasuda et al., 1998). Zusammenfassend wird das Protein nun als CALEB/NGC bezeichnet.

CALEB/NGC gehört zur Gruppe der neuronalen transmembranären epidermalen Wachstumsfaktor-Familie (EGF, Epidermal growth factor) und ist zudem ein „Teilzeit“-Proteoglykan (Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000). Proteoglykane sind eine äußerst heterogene Gruppe von Kernproteinen mit unterschiedlicher Art und Anzahl von Glykosaminoglykan-Seitenketten. Diese Seitenketten bestehen aus sich wiederholenden Disacchariden. Handelt es sich um das Disaccharid Chondroitinsulfat, werden sie als Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG) bezeichnet. Die Funktion der Proteoglykane kann teils dem Kernprotein, teils der Glykosaminoglykankette zugeschrieben werden (Hardingham und Hosang, 1992).

CALEB/NGC gehört zu den CSPG und weist in unreifen Entwicklungsstadien eine Glykosaminoglykan-Seitenkette im Cerebellum und in der Retina auf. Bei adulten Tieren wird CALEB/NGC jedoch hauptsächlich ohne Chondroitinsulfat-Seitenkette exprimiert, was es somit zu einem „Teilzeit“-Proteoglykan macht (Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000).

Die CSPG sind ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix, wobei CALEB/NGC die Besonderheit aufweist, ein Transmembranprotein zu sein (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997). Das Protein besteht aus folgenden Teilbereichen: einer C-terminalen zytoplasmatischen Region, einer transmembranären Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne, einem an sauren Aminosäuren reichen Peptidsegment, einem Leucin-Prolin-reichen Segment (nur beim Huhn) und einer N-terminalen Region, an die eine Chondroitinsulfat-Kette

gebunden sein kann (Abbildung 3) (Wantanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Yasuda et al., 1998; Oohira et al., 2000).

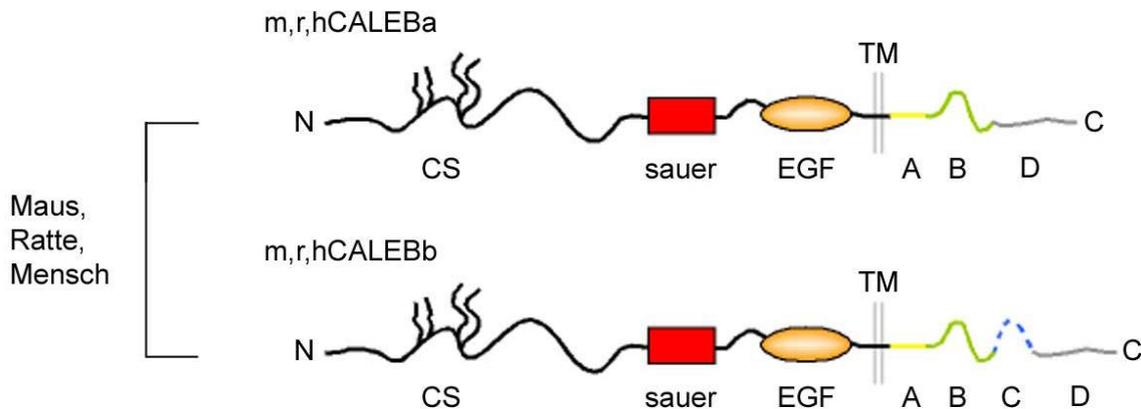


Abbildung 3: Darstellung des CALEB/NGC-Proteins beim Säuger. CALEB/NGC liegt bei der Maus (m), Ratte (r) und beim Menschen (h) in zwei Isoformen vor: CALEBa (oben) und CALEBb (unten). Sie unterscheiden sich durch einen Aminosäureneinschub im intrazellulären Teil des Proteins. CS, Chondroitinsulfatketten; sauer, saures Peptidsegment; EGF, EGF-ähnliche Domäne; TM, Transmembrandomäne; A-D intrazelluläre Peptidsegmente. Modifiziert nach Brandt et al., 2007. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Nicola Brandt.

Es wurde nachgewiesen, dass ein Teil des extrazellulären Molekülanteils von CALEB/NGC mittels Proteasen vom restlichen Protein abgespalten werden kann (Jüttner et al., 2005; Shuo et al., 2007). Dieses sogenannte „Shedding“ wird vermehrt nach Depolarisation der Zellen beobachtet und führt möglicherweise zu einer Freilegung der EGF-Domäne für Interaktionen, womit ein zusätzlicher Regulationsweg ermöglicht wird (Jüttner et al., 2005). Die lösliche Form von CALEB/NGC ist ein 75 kDa großes Kernglykoprotein und seine C-terminale Region, die nach der Proteolyse der Ektodomäne an der Zellmembran verbleibt, besitzt eine molekulare Masse von 35 kDa bei der Ratte und 38 kDa bei der Maus (Jüttner et al., 2005; Shuo et al., 2007).

Die Proteoglykan-Form von CALEB/NGC, die vor allem in unreifem Gewebe vorkommt, weist eine durchschnittliche Molekülmasse (entsprechend dem Laufverhalten in der SDS-PAGE) von 150 kDa bei Säugern und 200 kDa beim Huhn auf. Das Kernprotein ohne Chondroitinsulfat-Seitenketten bildet in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) eine Doppelbande bei 120 kDa aus, beim Huhn bei 140 kDa. Im Huhn existiert überdies eine weitere Form von CALEB/NGC mit einer Molekülmasse von 80 kDa. Diese Variante wurde beim Säuger nicht gefunden (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997).

1.2.1 Expression von CALEB/NGC

Die Expression von CALEB/NGC ist auf das Nervensystem beschränkt und unterliegt einer entwicklungspezifischen zeitlichen und räumlichen Regulation (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Yasuda et al., 1998; Schumacher und Stübe, 2003). Die Quantifizierung mittels Immunblot von Rattengehirnen vom Embryonaltag 12 (entspricht E10,5 bei der Maus) bis zum adulten Gehirn ergab wenig CALEB/NGC an E16 (E14,5 bei der Maus) bis E18. Danach stieg die Expression bis zu einem Gipfel an P20 an, um anschließend wieder auf die Hälfte des Maximums im adulten Rattenhirn abzusinken (Watanabe et al., 1995). In der Huhnretina zeigte sich entsprechend erstmals eine Expression der 140 kDa-Komponente an E7 (E14,5 bei der Maus) mit einer graduellen Steigerung zu einem Maximum an E20 (Schumacher et al., 1997).

Pränatale immunhistochemische Untersuchungen in der Huhnretina zeigten eine CALEB/NGC-Fluoreszenz an E7/8 in der inneren plexiformen Schicht und zusätzlich in den Müllerzell-Fortsätzen, später auch in der äußeren plexiformen Schicht und in der optischen Faserschicht sowie in der Nähe der Membrana limitans externa (Schumacher et al., 1997). Postnatale (ab P3) immunhistochemische Untersuchungen an der Mausretina bestätigten ein Vorkommen von CALEB/NGC vornehmlich in der Nervenfaserschicht und in der inneren plexiformen Schicht (Jüttner et al., 2005). In der adulten Rattenretina war die Expression nur gering im Vergleich zu P15. *In-situ*-Hybridisierung in der Retina der Ratte von E17-, P0- und P15-alten Tieren spezifizierte, dass die Transkription von CALEB/NGC in der Ganglienzellschicht erfolgte (Schumacher et al., 2001). Zudem ließ sich an P14 und an P42 mittels Immunelektronenmikroskopie bei der Ratte eine starke CALEB/NGC-Expression im Pigmentepithel lokalisieren, nämlich an der basalen und später auch apikalen Oberfläche der Pigmentepithelzellen (Inatani et al., 2000).

Im sich entwickelnden sowie im ausgereiften Cerebellum von Huhn, Maus und Ratte fand sich CALEB/NGC in Immunfärbungen in den Purkinjezellen und ihren Dendritenbäumen (Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Hassel et al., 2003). Immunelektronenmikroskopisch wurde an P10 wenig CALEB/NGC an den Zellkörpern und deutlich mehr an den primären und sekundären Dendriten der Purkinjezellen beobachtet. Im adulten Cerebellum waren die Fluoreszenzen punktförmig an den großen Dendriten der Purkinjezellen lokalisiert (Aono et al., 2000).

Des Weiteren wurde CALEB/NGC im Colliculus superior der postnatalen Maus näher untersucht, wo sich eine uniforme Verteilung über alle Schichten zeigte. Die Menge an

CALEB/NGC-Protein stieg dabei von P1 bis P22 an und sank wieder im adulten Gehirn (Jüttner et al., 2005).

Im Telencephalon fanden Ida et al. (2006) Hinweise für eine Expression von CALEB/NGC in der Ventrikularzone des Ratten-Telencephalons bereits an E14 (= E12,5-Maus). An P0 und P7 beschrieben Watanabe et al. (1995) eine Assoziation von CALEB/NGC mit sich entwickelnden neuronalen Zellen über den gesamten Kortex hinweg. Mit fortschreitender Gehirnreifung nahm die Intensität der Immunfärbung im Kortex ab. Im adulten Ratten-Telencephalon fand sich via *in-situ*-Hybridisierung eine verhältnismäßig stärkere CALEB/NGC-Expression in den Occipital- und Temporallappen als im Frontallappen, sowie eine starke Expression in Nucleus caudatus, Putamen, Amygdala und Hippocampus. Ein nur schwaches Vorkommen von CALEB/NGC-mRNA zeigten hingegen Thalamus, Cerebellum, Pons und Medulla oblongata (Aono et al., 2006).

Im adulten Rattenhippocampus ergaben ausführlichere Expressionsstudien, dass CALEB/NGC im Stratum oriens, radiatum und lacunosum moleculare, jedoch nicht in der Pyramiden- und Körnerzellschicht exprimiert wurde (Aono et al., 2006; Brandt et al., 2007).

Zusammengefasst ist die CALEB/NGC-Immunreaktivität *in vivo* assoziiert mit Neuronenoberflächen, Dendriten und einigen Nervenfasern in verschiedenen Teilen des embryonalen und postnatalen Gehirns mit einem Expressionsgipfel in postnatalen Entwicklungsstadien. Die Expression von CALEB/NGC im pränatalen Gehirn ist mit den bisherigen Untersuchungen zwar bewiesen worden, genaue Expressionsanalysen existieren pränatal jedoch nur in der Retina von Huhn und Ratte und geringfügig auch im Huhn-Cerebellum. Der Schwerpunkt der Forschung zu diesen Regionen lag jedoch ebenfalls auf der postnatalen Phase.

1.2.2 Bindungspartner von CALEB/NGC

Da CALEB/NGC strukturell ein Multidomänenprotein ist, sind mehrere Bindungspartner denkbar, die jeweils unterschiedliche Funktionen erfüllen und somit CALEB/NGC zu einem multifunktionalen Molekül machen. Einige Interaktionspartner sind bereits ermittelt worden.

Für zwei Glykoproteine der extrazellulären Matrix – Tenascin-C und Tenascin-R – wurde die Bindung an das saure Peptidsegment von CALEB/NGC nachgewiesen (Schumacher et al., 1997, 2001; Schumacher und Stübe, 2003). Welche Auswirkungen diese Interaktion hat, ist noch nicht bekannt, man weiß jedoch von Tenascin-C und -R, dass diese modulierend bei Neuritenwachstumsprozessen wirken (Zacharias et al., 1999). Überdies haben Experimente an

Tenascin-C-defizienten Mäusen gezeigt, dass das Protein sowohl an neuronaler Vorläuferzellmigration als auch -proliferation beteiligt ist (Garcion et al., 2001).

Brandt et al. (2008) identifizierten in Hefe-2-Hybrid-Screens B56 β , eine regulatorische Untereinheit der Protein Phosphatase 2A (McCright und Virshup, 1995), als intrazellulären Interaktionspartner für CALEB/NGC. Dieser Fund wurde nicht nur *in vitro* mittels Blot-Overlay-Assays und Koimmunpräzipitationen in Zellkulturen bestätigt, sondern auch *in vivo* mittels Koimmunpräzipitationen aus solubilisierten Membranfraktionen von Rattengehirn. Zudem bestand eine Kolokalisation von CALEB/NGC und B56 β in Dendriten primärer hippocampaler Neurone (Brandt et al., 2008).

Unter Anwendung affinitätschromatographischer Verfahren und Proteinvernetzung („cross-linking“) wurde Midkine als weiterer Bindungspartner von CALEB/NGC postuliert (Ichihara-Tanaka et al., 2006). Midkine ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor, der in der mittleren embryonalen Phase stark exprimiert wird und postnatal vor allem in der Leber vorzufinden ist (Muramatsu et al., 1993). Von Midkine ist bekannt, dass es sowohl Neuritenwachstum und -lenkung als auch Migration neuronaler Zellen im embryonalen Gehirn fördert und Apoptose verhindert (Muramatsu et al., 1993; Kaneda et al., 1996; Maeda et al., 1999; Owada et al., 1999). Sowohl die Chondroitinsulfat-bindende Domäne wie auch das Saure-Aminosäuren-Motiv von CALEB/NGC zeigten Affinität zu Midkine (Ichihara-Tanaka et al., 2006).

Für den juxtamembranären zytoplasmatischen Abschnitt von CALEB/NGC wurde eine Bindung an das Golgi-assoziierte Protein PIST (PDZ domain protein interacting specifically with TC10) ermittelt (Hassel et al., 2003). Aufgrund der bekannten Funktionen von PIST und der regionalen Kolokalisation mit CALEB/NGC wird vermutet, dass PIST für den Transport von CALEB/NGC vom Soma in die Neuriten verantwortlich sein könnte.

CALEB/NGC besitzt eine EGF-ähnliche-Domäne und wird daher von manchen Autoren der Familie der Neureguline zugerechnet (Kinugasa et al., 2004). Eine Bindung von CALEB/NGC an EGF-Rezeptor-Familienmitglieder (die sogenannte ErbB-Familie) wird postuliert, unter anderem an ErbB3, durch welche das Wachstum humaner Brusttumorzelllinien stimuliert wird (Kinugasa et al., 2004).

1.2.3 Funktionen von CALEB/NGC

Das relativ stärkere Vorkommen von CALEB/NGC während der Entwicklungsphase im Vergleich zum adulten Gehirn deutet auf eine Beteiligung an der Gehirnentwicklung hin. In der frühen Adoleszenz, einem Zeitpunkt, an dem die CALEB/NGC-Expression besonders hoch ist, finden im Gehirn Neuritogenese und Synaptogenese statt (Evans, 2012). Das Vorkommen von CALEB/NGC ist vor allem an neuronale Strukturen gebunden, insbesondere Neuropil und dendritische Filopodien, aus welchen sich Neuriten oder postsynaptische Spines entwickeln (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000; Schumacher und Stübe, 2003; Hassel et al., 2003; Brandt et al., 2007). Es wurde bereits eine Beteiligung von CALEB/NGC an der Synapsenfunktion, am Neuritenwachstum, an der Dendritenverzweigung und der Spinogenese sowie der morphologischen Differenzierung der dendritischen Spines und der Filopodien nachgewiesen (Jüttner et al., 2005; Schumacher et al. 1997, 2001; Nakanishi et al., 2006; Brandt et al., 2007, 2008).

In Hinblick auf die Synapsenfunktion wurden in CALEB/NGC-defizienten Mäusen im Colliculus superior neurophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei ergab sich in „slice“-Kulturen eine Frequenzminderung der spontanen exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Ströme (EPSC und IPSC). Zudem war beim Setzen von prolongierten hochfrequenten Stimuli eine Erniedrigung der Depression postsynaptischer Antworten zu verzeichnen. Gemeinsam mit einer festgestellten erhöhten „paired-pulse“-Ratio bei den „knock-out“-Mäusen korreliert letzteres Ergebnis mit einer erniedrigten Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittern. Die Synapsenanzahl war in den CALEB/NGC-„knock-out“-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp jedoch nicht signifikant verändert. Die neurophysiologischen Veränderungen wurden nur in frühen postnatalen Entwicklungsstadien (P1-P3), jedoch nicht in reiferen Tieren (P20-22) beobachtet, was darauf hindeutet, dass CALEB/NGC nur in einem limitierten Entwicklungszeitraum die Synapsenfunktion beeinflusst (Jüttner et al., 2005).

Dass CALEB/NGC am Neuritenwachstum beteiligt ist, demonstrierten erstmals Schumacher et al. (1997). So war in Tectumzellkulturen die Neuritenlänge abhängig von der Konzentration an Fab-Fragmenten von anti-CALEB/NGC-Antikörpern. Nakanishi et al. (2006) stellten ebenso fest, dass eine rekombinante Ektodomäne des CALEB/NGC-Kernproteins in Rattenneokortexkulturen das Wachstum von Neuriten fördert. Sie postulierten ferner, dass das Wachstum via Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase-C (PKC) Pfad vermittelt wird, da Inhibitoren sowohl von PKC als auch von PI3K dosisabhängig das CALEB/NGC vermittelte Neuritenwachstum dämpften. Die aktiven Regionen von

CALEB/NGC für das Neuritenwachstum waren dabei in der EGF-ähnlichen Domäne und im sauren Peptidsegment der CALEB/NGC-Ektodomäne zu finden. Diesen Domänen scheinen jedoch unterschiedliche Aufgaben zuteil zu werden: So wurde bei Anwesenheit einer rekombinanten EGF-Domäne die Verlängerung eines einzelnen Neuriten beobachtet, bei Anwesenheit des rekombinanten sauren Peptidsegments das Ausbilden mehrerer Neuriten (Nakanishi et al., 2006). Das saure Peptidsegment der CALEB/NGC-Ektodomäne ist Bindungsstelle für Tenascin-C und Tenascin-R. Es ist denkbar, dass diese Glykoproteine am CALEB/NGC-induzierten Neuritenwachstum beteiligt sind (Schumacher et al., 1997, 2001). Dies wird ferner durch Forschungsergebnisse bekräftigt, die belegen, dass diese Tenascine eine modulierende Funktion beim Neuritenwachstum und bei der Bildung von Aktin-reichen Mikroprozessen entlang des Neuritenschafts oder dendritischer Filopodien erfüllen (Zacharias et al., 1999, 2002). Der Nachweis, dass die Interaktion von CALEB/NGC mit den Tenascinen einen Einfluss auf das Neuritenwachstum hat, steht jedoch noch aus.

Brandt et al. (2007) deckten mittels Zellkulturen und *in utero*-Elektroporation die Beteiligung von CALEB/NGC an der Dendritenverzweigung wie auch an der Spinogenese und der morphologischen Differenzierung der dendritischen Spines und der Filopodien *in vitro* sowie *in vivo* auf. So wurde sowohl die Dendritenkomplexität als auch die Spinogenese durch Überexpression von CALEB/NGC stimuliert und durch „Knock-down“ von endogenem CALEB/NGC reduziert. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die intrazellulären CALEB/NGC-Peptidsegmente A und B (Abbildung 3) sowie die extrazelluläre EGF-ähnliche Domäne für diese Prozesse essentiell sind. Zudem erwiesen sich ein intakter Phosphatidylinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin (PI3K-Akt-mTOR)-Signalweg, sowie die Anwesenheit von Proteinkinase C als notwendig für die Stimulation der Dendritenverzweigungen (Brandt et al., 2007). Die Spinogenese hingegen ist von PKC, nicht jedoch vom PI3K-Akt-mTOR-Signalweg abhängig (Brandt et al., 2007).

Im Gegensatz hierzu konnte in Zellkulturen bei Koexpression von CALEB/NGC und seinem intrazellulären Bindungspartner B56 β als Folge eine Reduktion der Dendritenverzweigungen gezeigt werden (Brandt et al., 2008). Ferner wurde aufgedeckt, dass dies ebenfalls gekoppelt ist an den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg. So induziert CALEB/NGC die Phosphorylierung von Akt, während B56 β diese inhibiert, wobei bekannt ist, dass die Phosphorylierung von Akt zu seiner Aktivierung beiträgt (Alessi et al., 1996; Brandt et al., 2008).

Weitere Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von CALEB/NGC an Reparaturprozessen von verletzten neuronalen Kreisläufen, zumindest von Nervenfasern. So wird die Expression

von CALEB/NGC nach Läsion des Nervus Opticus dynamisch reguliert (Schumacher et al., 2001).

Des Weiteren könnte CALEB/NGC an der Aufrechterhaltung von Gehirnfunktionen beteiligt sein. Bei chronischer Metamphetamin- und akuter Morphingabe wurde die CALEB/NGC-Expression im Nucleus accumbens hochreguliert (Ishikawa et al., 2006). Da die Gabe von Psychostimulanzien zu Verhaltensänderungen führt, könnte die Expressionssteigerung von CALEB/NGC zu diesen Verhaltensänderungen beitragen.

Hinsichtlich seiner Rolle als Bindungspartner von Midkine sind weitere Funktionen von CALEB/NGC denkbar, u.a. die Migration von neuronalen Zellen im embryonalen Gehirn, so dass hier noch entscheidender Forschungsbedarf besteht (Maeda et al., 1999; Ichihara-Tanaka et al., 2006).

1.3 Zielsetzung

Es besteht noch viel Forschungsbedarf, um die Entstehung des Gehirns vollständig zu verstehen. Das Wissen um die genauen Mechanismen und die daran beteiligten Moleküle stellt eine wichtige Etappe auf dem Weg zur Entwicklung neuer Therapien dar. Hierbei ist auch die Kenntnis der Auswirkungen von fehlerhaften Prozessen von Bedeutung, beispielsweise hervorgerufen durch Genmutationen, welche ein defektes Protein zur Folge haben. Es ist in den letzten Jahren vielfach gelungen, Fehlbildungen und Fehlfunktionen beim Menschen einem defekten Protein oder Gen zuzuordnen und somit neue Erkenntnisse auch über den regelrechten Verlauf der Gehirnentwicklung zu gewinnen.

Es ist denkbar, dass auch eine Mutation des CALEB/NGC-Gens Auswirkungen auf die Funktion und/ oder Struktur des Gehirns haben kann. Das humane CALEB/NGC-Protein wurde mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der chromosomalen Bande 3p21.3 zugeschrieben (Yasuda et al., 1998). Verschiedene Krankheiten, die ihren Ursprung in Mutationen der Region 3p21 haben, sind bereits bekannt, darunter das Aicardi-Goutières-Syndrom sowie die cerebroretinale Vaskulopathie, HERNS (hereditäre Endotheliopathie mit Retinopathie, Nephropathie und Schlaganfall) und die hereditäre vaskuläre Retinopathie (Crow et al., 2000; Vahedi et al., 2003). So et al. (2010) postulierten einen potentiellen Zusammenhang zwischen CALEB/NGC und dem Auftreten von Schizophrenie. Unter Schizophrenie-Patienten fanden sie vermehrt Einzelnukleotid-Polymorphismen im CSPG5-Gen im Vergleich mit einer nicht erkrankten Referenzgruppe. Auch Jüttner et al. (2005) beobachteten mögliche Verhaltensänderungen bei den CALEB/NGC-„knock-out“-Mäusen, welche sich weniger fürsorglich um ihre Jungen kümmerten. Ein Zusammenhang zwischen

einer Mutation des CALEB/NGC-Gens und einem spezifischen Leiden ist jedoch bisher nicht belegt worden und bedarf der weiteren Nachforschung.

Das örtlich und zeitlich regulierte Expressionsmuster von CALEB/NGC mit einer vorherrschenden Expression im noch unreifen Gehirn deutet auf dessen Rolle in Entwicklungsprozessen hin (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Yasuda et al., 1998). In postnatalen Stadien ist CALEB/NGC vor allem in neuritenreichen Regionen zu finden und ist an der zu diesem Zeitpunkt rege stattfindenden Dendrito- und Spinogenese beteiligt (s. Abschnitt 1.2.1 und 1.2.3). Über CALEB/NGC in Zusammenhang mit der pränatalen Gehirnentwicklung ist bisher nur sehr wenig bekannt. Da die pränatal ablaufenden Prozesse sich jedoch von den postnatalen unterscheiden und für die korrekte Entwicklung des Nervensystems elementar sind, ist es von besonderem Interesse, eine mögliche Beteiligung von CALEB/NGC an diesen Prozessen zu eruieren. Um zu einem besseren Verständnis dieser Zusammenhänge zu gelangen, ist das Wissen um die ortsspezifische Expression zu verschiedenen pränatalen Entwicklungszeitpunkten wichtig. Dieses Ziel soll mit der vorliegenden Arbeit näher gebracht werden.

Zu diesem Zweck wurden embryonale Mausgehirne der Altersstufen E14 bis E19 sowie P1 mittels indirekter Immunhistochemie untersucht. Die Gehirne wurden am Vibratom geschnitten und mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper gegen den extrazellulären Bereich von Maus-CALEB/NGC inkubiert. Mittels Färbungen mit einem eigenhändig affinitätsgereinigten, gegen den intrazellulären Bereich von CALEB/NGC gerichteten Antikörper wurden die Ergebnisse verifiziert und inhaltlich erweitert. Zur Reinigung dieses Antikörpers wurde zunächst ein Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase (GST) und dem intrazellulären Teil von humanem CALEB/NGC (*GST-hCALEBb-cyt*) in Bakterienkulturen exprimiert. Mithilfe einer Glutathion-Sepharose-Säule wurde das Protein extrahiert, anschließend ankonzentriert und mit einer Protease der GST-Anteil abgetrennt. Das ankonzentrierte GST-freie *hCALEBb-cyt*-Peptid wurde dann benutzt, um einen vorhandenen Antikörper gegen *GST-hCALEBb-cyt* selektiv zu reinigen.

Der gereinigte Antikörper sowie der Antikörper gegen den extrazellulären CALEB/NGC-Bereich wurden mittels Immunblot auf ihre Spezifität hin getestet. Ergänzend wurden bei den immunhistochemischen Färbungen stets Negativkontrollen zur Prüfung der sekundären Antikörper angefertigt.

Weitere Hinweise hinsichtlich der exakten Lokalisation von CALEB/NGC im embryonalen Gehirn lieferten überdies Kofärbungen mit bekannten Markern, unter anderem Antikörper gegen Doublecortin, Reelin und Nestin.

Somit gelang es, eine Expressionskarte für CALEB/NGC zu erstellen und eine Grundlage für weitere Untersuchungen zu schaffen. Das Ziel ist die Ergründung der Rolle von CALEB/NGC an der Neurogenese, um schließlich mehr Einblicke in die Entstehung des Gehirns und seiner Fehlbildungen zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Es wurden Mäuse des Stammes C57BL6 verwendet, die aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) in Berlin bezogen wurden und gemäß der Richtlinien zur Umsetzung des Tierschutzgesetzes (TierSchG) behandelt wurden. Bei Erreichen des gewünschten Lebensalters der Embryonen wurden die Muttertiere mittels zervikaler Dislokation getötet und die Jungen aus dem Uterus entfernt. Bis einschließlich E14 wurden die gesamten Köpfe, ab E15 die freipräparierten Gehirne, sofort nach dem Töten in 4%ige Paraformaldehyd-Lösung (PFA) zum Fixieren überführt.

Am 19. embryonalen Tag erfolgte die Geburt der Tiere, dieser Tag wurde folglich mit dem ersten postnatalen Tag (P0) gleichgesetzt. P1-Tiere wurden einen Tag nach dem Werfen dekapitiert.

Insgesamt wurden für die Untersuchungen 71 Embryonen und 14 Jungtiere verwendet.

2.1.2 Antikörper

Die Antikörper für die Immunhistochemie waren verdünnt in PBS/ 5% fötalem Kälberserum (FCS)/ 0,02% Thiomersal. Die Verdünnung für Immunblots erfolgte mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS)/ 2% Rinderserumalbumin (BSA)/ 0,02% Thiomersal.

2.1.2.1 Primäre Antikörper

Rb-anti-MBP-mCALextra: Benutzt wurde ein polyklonaler Antikörper, der im Labor von Prof. Dr. Schumacher hergestellt und affinitätsgereinigt worden war. Er ist gegen den extrazellulären Bereich von Maus-CALEB/NGC, fusioniert mit dem Maltose-Bindungsprotein (MBP), gerichtet.

Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt: Ein polyklonaler CALEB/NGC-Antikörper, der gegen den intrazellulären Bereich von humanem CALEB/NGC gerichtet ist. Diese Domäne ist stark konserviert unter Ratte, Maus, Huhn und Mensch (Schumacher et al., 2001). Es existieren zwei "Splice"-Varianten von CALEB/NGC (s. Abschnitt 1.2). Dieser Antikörper richtet sich gegen die etwas längere B-Variante, erkennt aber ebenfalls die kürzere A-Variante. Der Antikörper war bereits durch Prof. Dr. Schumachers Labor gegen rekombinantes *GST-hCALEBb-cyt* affinitätsgereinigt worden. Es erfolgte eine weitere Aufreinigung an einem

Western Blot mittels des rekombinanten intrazellulären CALEB/NGC-Bereichs ohne Glutathion-S-Transferase (GST) (s. Abschnitt 2.2.1).

M-Mab 5C11-anti-CSPG5: Ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen Maus-CALEB/NGC gerichtet ist. In eigenen Mapping-Experimenten des Labors von Prof. Dr. Schumacher wurde aufgezeigt, dass dieser Antikörper ein Epitop des intrazellulären Bereichs von CALEB/NGC erkennt.

M-Mab Rat 401-anti-Nestin: Ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen Ratten-Nestin gerichtet ist, aber auch Maus-Nestin erkennt. Nestin ist ein Intermediärfilament der Klasse VI. Es wird in neuronalen Vorläufer- und Stammzellen exprimiert, vor allem aber auch in Astrozyten, Radialglia und den spezialisierten Radialglia, den sogenannten Mittellinienglia (Takano und Becker, 1997; Gilyarov, 2008). Im Prosencephalon der Maus ist Nestin bereits an E10 vorhanden, postnatal wird die Expression stark herunterreguliert. Ferner wird Nestin pränatal auch in Kapillarendothelien exprimiert (Mokry et al., 2004).

GP-anti-Doublecortin, AB5910: Es wurde ein polyklonaler Antikörper aus dem Meerschweinchen benutzt, der sowohl Maus- als auch Ratten-Doublecortin (DCX) erkennt. Doublecortin ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein und wird von Neuroblasten und jungen migrierenden Neuronen exprimiert (Gleeson et al., 1999; Francis et al., 1999). Im Cerebellum wird Doublecortin von frühen Purkinje- und Körnerzellen exprimiert, in der Retina ist DCX in der inneren plexiformen Schicht und der Ganglienzellschicht vorhanden (Gleeson et al., 1999; Lee et al., 2003).

M-anti-Reelin, MAB5364: Ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen Reelin gerichtet ist. Reelin ist ein extrazelluläres Protein, welches Einfluss auf die Migration im Neokortex sowie im Cerebellum hat (s. Abschnitt 1.1.2). Es wird von Cajal-Retzius-Zellen gebildet und akkumuliert in der extrazellulären Matrix um sie herum, zuerst in der embryonalen Vorplatte, dann in der Marginalzone, in der cerebellären äußeren Körnerzellschicht und um Pionierzellen des Hippocampus (D'Arcangelo et al., 1995).

M-300-anti-Calbindin D-28K: Ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der Calbindin D-28k erkennt. Calbindin ist ein Marker für spezifische Interneurone und Pyramidalneurone der Schicht V des Neokortex (Hevner et al., 2003). In der Retina wird Calbindin in Horizontalzellen exprimiert, im Cerebellum in den Purkinjezellen (Röhrenbeck et al., 1989; Yew et al., 1997).

M-anti-Tau-1, MAB3420: Ein monoklonaler Antikörper aus der Maus, der gegen das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau-1 gerichtet ist, dessen Funktion die Stabilisierung

axonaler Mikrotubuli ist (Cleveland et al., 1977; Binder et al., 1985). Der Antikörper färbt spezifisch Axone an, nach Dephosphorylierung des Tau-Proteins in dem zu untersuchenden Gewebe jedoch auch Zellsomata, Dendriten sowie Astrozyten und Gliazellen (Papavasiliou und Binder, 1987).

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten primären Antikörper

IH: Immunhistochemie; WB: Western Blot

Bezeichnung	Antigen	Spezies	Art	Hersteller	Konzentration/ Verdünnung
<i>Rb-anti-MBP-mCALExtra</i>	CALEB/NGC	Kaninchen	polyklonal	Labor Prof. Schmacher	1 µg/ml, 2 µg/ml, 2,5 µg/ml und 3 µg/ml (IH) 1 µg/ml (WB)
<i>Rb-anti-GST-hCALB-cyt</i>	CALEB/NGC	Kaninchen	polyklonal	Labor Prof. Schumacher	2 µg/ml (IH) 1 µg/ml (WB)
<i>Rb-anti-hCALB-cyt</i>	CALEB/NGC	Kaninchen	polyklonal	Labor Prof. Schumacher	2 µg/ml (IH) 1 µg/ml (WB)
<i>M-Mab 5C11 anti CSPG5</i>	CALEB/NGC	Maus	monoklonal	Abnova, Taiwan	5 µg/ml (IH) 2,5 µg/ml (WB)
<i>M-Mab Rat 401-anti-Nestin</i>	Nestin	Maus	monoklonal	BD Bioscience, San Jose, USA	2 µg/ml (IH)
<i>GP-anti-Doublecortin (AB5910)</i>	Doublecortin	Meerschweinchen	polyklonal	Chemicon	1:2000 (IH)
<i>M-anti-Reelin (MAB5364)</i>	Reelin	Maus	monoklonal	Chemicon	1 µg/ml (IH)
<i>M-300-anti-Calbindin D-28K</i>	Calbindin	Maus	monoklonal	Swant, Switzerland	1:5000 (IH)
<i>M-anti-Tau-1 (MAB3420)</i>	Tau-1	Maus	monoklonal	Chemicon	1 µg/ml (IH)

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Spezies	Herkunft	Verdünnung
<i>Goat-anti-mouse-Cy3</i>	Maus IgG	Ziege	Dianova, Hamburg	1:1000
<i>Goat-anti-rabbit-Alexa488</i>	Kaninchen IgG	Ziege	Molecular Probes, Karlsruhe	1:1000
<i>Goat-anti-guinea pig-Cy3</i>	Meerschweinchen IgG	Ziege	Dianova	1:1000
<i>Donkey-anti-guinea pig-Cy3</i>	Meerschweinchen IgG	Esel	Jackson Immuno Research Laboratories Inc.	1:1000
<i>Goat-anti-mouse-AP</i>	Maus IgG	Ziege	Dianova	1:2000
<i>Goat-anti-rabbit-AP</i>	Kaninchen IgG	Ziege	Dianova	1:2000

2.1.3 Chemikalien

Die Herstellung sämtlicher Lösungen erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel.

Aceton	J.T. Baker, Deventer, Holland
Acrylamid (30%)	Bio-Rad, München, Deutschland (BRD)
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, BRD
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Aprotinin from bovine lung	Fluka Bio-Chemika, Neu-Ulm, BRD
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)-P-Toluidinsalz	Roth
Bio-Safe™ Coomassie Stain	Bio-Rad
BSA Fraktion V	Roth
Desoxycholsäure (DCA) 0,15%	Sigma
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem, Darmstadt, BRD
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma
1,4-Dithiothreit (DTT)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fötales Kälberserum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, BRD
L-Glutathion	Sigma
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Glycerol-Gelatine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, BRD
Glycin	Bio-Rad
HCl	Merck KCoA, Darmstadt, BRD
Hefeextrakt	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
KCl	Roth
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker
Leupeptin Hemisulfate	Fluka Bio-Chemika
Lysozym	Sigma
m	Meter
Methanol	Carl Roth
MgCl ₂	Sigma
Micro BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
n	nano
NaCl	Carl Roth
NaHCO ₃	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth
N-Lauroylsarcosin	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Pepstatin	Fluka Bio-Chemika
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka Bio-Chemika
Pepton	Roth
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma
Precision Plus Protein™ Standards-	Bio-Rad

All Blue	
PreScission™ Protease	GE Healthcare Bio-Sciences AB
2-Propanol	Merck
Propofol	Sigma
Saccharose	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad
Temed	Bio-Rad
Thiomersal	Roth
Trichloroacetoacid (TCA)	Sigma
Tris	Carl Roth
Triton X-100	Merck
Tween 20	Roth

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Blot-Papier: Mini Blot, extra thick	Bio-Rad
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, BRD
Homogenisator und Stößel	Kontes Glass Company
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, BRD
Nadeln, Kanülen	Teruven, Leuven, Belgien
Nitrocellulose-Transfermembran	Whatman GmbH, Dasser, BRD
pH-Papierstreifen	Merck, Darmstadt
Plastikwaren	Eppendorf, Hamburg, BRD; Greiner, Solingen, BRD; Sarstedt, Nümbrecht, BRD; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, N.Y., USA
Zentrifugenfildereinheit: Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device	Millipore, Eschborn, BRD

2.1.5 Geräte

Elektrophorese-System	Mini-Protean II, Bio-Rad
ELISA-Reader	Synergy 2, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall, BRD
Fluoreszenzmikroskope	BX50, Olympus, Hamburg, BRD, mit einer Photometrics Cool SNAP ES Digitalkamera von Roper Scientific, Ottobrunn, BRD BX51TF, Olympus, Hamburg, BRD, mit einer digitalen Kamera von Intas Science Imaging Systems GmbH, Göttingen, BRD
Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, BRD
Inkubator	Memmert, Schwabach, BRD
Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope	TCS SL, Leica, Bensheim, BRD; TCS SP5, Leica, Bensheim, BRD
Magnetrührer	Kikamag RCT, Kika Labortechnik, Staufen, BRD
Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec™ 1000, UV/VIS Spectrophotometer, Cambridge, England)
Pumpe	Econo Pump, Bio-Rad, München, BRD
Rundschüttler	Roto-Shake Genie, Scientific-Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA

Scanner	Epson Stylus CX5400
Schüttelinkubator	Gerhardt, Königswinter, BRD
Schüttler	BFR25, Grant Boekel
Spannungsquelle für Elektrophorese	PowerPac Basic, Bio-Rad
Transfergerät	Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell 240, Bio-Rad
Ultraschall-Gerät	Sonopuls GM70, Bandelin, Berlin, BRD
Vibratom	HM650V, Microm, Walldorf, BRD
Vortexer	Vortex Genie TM 2 VWR-VV3, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	5415D, Eppendorf, Hamburg, BRD 8904R, Eppendorf

2.1.6 Programme

Es wurden folgende Programme verwendet: MetaMorph Imaging System (Visitron Systems GmbH), Leica Confocal Software Volocity Version 5.1 (Leica Microsystems HD GmbH), Leica Application Suite Advanced Fluorescence LAS-AF) Version 2.6.0.7266 (Leica Microsystems CMS GmbH), MagnaFire (Olympus), Office 2007 (Microsoft), Windows 7 Professional (Microsoft) und Adobe Photoshop CS2 Version 9.0 (Adobe Systems Incorporated).

2.2 Methoden

Nach einer kurzen Zusammenfassung der Kernmethoden dieser Arbeit werden im Folgenden detailliert die einzelnen Arbeitsschritte dargelegt.

Mit dem Ziel, die Spezifität eines Antikörpers gegen den intrazellulären Bereich von humanem CALEB/NGC (*hCALEBb-cyt*) zu erhöhen, wurde eine Affinitätsreinigung durchgeführt. Anschließend erfolgte mittels Western Blot die Testung des gereinigten Antikörpers *Rb-anti-hCALb-cyt* sowie eines Antikörpers gegen ein Fusionsprotein aus MBP und dem extrazellulären CALEB/NGC-Bereich (*mCALEBextra*) auf ihre Spezifität hin. Nachfolgend wurden Mausgehirne der Entwicklungsstufen E14 bis E19 sowie P1 am Vibratom geschnitten und mit dem gereinigten *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörper und dem *Rb-anti-MBP-mCALExtra*-Antikörper angefärbt. Zusätzlich erfolgten Kofärbungen mit weiteren relevanten Antikörpern. Parallel wurden bei jedem Färbedurchgang die verwendeten sekundären Antikörper hinsichtlich einer potenziellen unspezifischen Bindung an Gewebstrukturen kontrolliert. Die Schnitte wurden dann am Epifluoreszenzmikroskop und einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert und dokumentiert.

Die in dieser Arbeit benutzte Nomenklatur beruht auf dem Maus-Gehirnatlas „Atlas of the prenatal mouse brain“ von U.B. Schambra, J.M. Lauder und J. Silver, erschienen 1992 bei Academic Press, Inc., San Diego, Kalifornien, USA.

2.2.1 Affinitätsreinigung des *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*-Antikörpers

Es wurde ein im Labor von Prof. Dr. Schumacher hergestellter, polyklonaler Antikörper gegen CALEB/NGC verwendet. Dieser Antikörper richtet sich gegen ein Fusionsprotein aus dem intrazellulären Bereich von humanem CALEB/NGC (*hCALEBb-cyt*) und einem Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag. Der Vorteil eines solchen Fusionsproteins ist eine höhere Stabilität des Proteins und die Möglichkeit der Aufreinigung an Glutathion-Affinitätsmatrizen. Nachteilig ist, dass ein Antikörper resultiert, der nicht nur CALEB/NGC erkennt, sondern auch GST und GST-ähnliche Strukturen. Um die Spezifität des Antikörpers zu steigern, wurde er gegen den intrazellulären Proteinbereich ohne GST-Tag affinitätsgereinigt. Hierfür wurde dieses Fusionsprotein rekombinant in einer *Escherichia (E.) coli*-Bakterienkultur synthetisiert, das GST-Tag abgespalten und der Antikörper anschließend an *hCALEBb-cyt* mittels eines Western Blots affinitätsgereinigt.

Alle Schritte der Expression und Affinitätsreinigung wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) auf ihr Gelingen hin überprüft.

2.2.1.1 Expression eines rekombinanten CALEB/NGC-Fusionsproteins

Eine entsprechende *E. coli*-Dauerkultur (mit dem *E. coli*-Stamm BL21 AI, Invitrogen), transformiert mit einem *GST-hCALEBb-cyt*-Vektor (pGEX-6P-1, Amersham Biosciences), war bereits vorhanden (Brandt et al., 2008). Mittels dieser wurde eine Vorkultur angeimpft. Hierfür wurden 100 µl *GST-hCALEBb-cyt*-Glycerolstock oder 150 µl von einer Vorkultur mit 100 ml LB-Medium unter Ampicillin-Zusatz (1:1000) bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler bei 140 Umdrehungen belassen. Das benutzte Plasmid enthält ein Resistenzgen gegen Ampicillin, so dass durch die Antibiotika-Zugabe die Plasmid-enthaltenden Bakterien selektiert werden. Die Animpfung der Hauptkultur erfolgte mit jeweils 5 ml der Vorkultur und 400 ml LB-Medium mit Ampicillin (1:1000). Es wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei 600 nm inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins ist mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar. Bei einer finalen IPTG-Konzentration von 0,3 mM erfolgte die Expression für zwei bis drei Stunden bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend bei 4000 x g für 5 Minuten bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde mit 20 ml eiskaltem STE-Puffer pH 8,0 gewaschen, bei 4000 x g bei 4°C wieder abzentrifugiert und der Überstand abgossen. Nun konnte das Pellet in flüssiges N₂ getaucht und dann bei -80°C über Nacht

eingefroren werden. Die Resuspension erfolgte durch Zugabe von 20 ml eiskaltem STE-Puffer pH 8,0 mit Lysozym, welches zugleich die Zellwand enzymatisch andaut und die Zellen dadurch „aufschließt“ (Endkonzentration 1 mg/ml). Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten auf Eis unter Proteaseschutz (in STE-Puffer, pH 8,0: Pepstatin (2,67 mg/l), Aprotinin (0,67 mg/l), Leupeptin (1 mg/l), PMSF (13,92 mg/l)). Als nächstes wurde Dithiothreitol (DTT) bis zum Erreichen einer Endkonzentration von 5 mM hinzugefügt. Nach Zugabe des Detergens‘ N-Lauroylsarcosin zu einer Endkonzentration von 1,5% wurde weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert, dann Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 4% addiert und die Zellsuspension wieder 20 Minuten auf Eis belassen. Es folgte die Verdopplung des Volumens durch Zugabe von eiskaltem STE-Puffer (pH 6,8) unter Proteaseschutz (Pepstatin (6,6 mg/l), Aprotinin (1,67 mg/l), Leupeptin (2,5 mg/l), PMSF (69,6 mg/l)) und die Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Die Zellfragmente wurden bei 11.000 x g bei 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und gegebenenfalls bei Zähflüssigkeit mit mehreren Ultraschallstößen auf Stufe 4-5 auf Eis aufgeschlossen. Anschließend wurde für 2,5 Stunden bei 4°C mit ca. 2 ml, in PBS äquilibrierter Glutathionsepharose im Überkopfschüttler inkubiert. Die Glutathionsepharose mit dem Zelllysate wurde schließlich auf eine leere Säule gegeben und mit ca. 300 ml PBS gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit 6 x 2 ml Elutionspuffer. Für den nächsten Gebrauch wurde die Säule mit 20 ml Elutionspuffer gewaschen und mit 50 ml PBS äquilibriert.

LB-Medium (Luria Broth):

Hefeextrakt 5g/l
Trypton o. Pepton 10g/l
NaCl 10g/l

STE-Puffer:

150 mM NaCl
10 mM Tris/Cl pH 8,0/ pH 6,8
1 mM EDTA

PBS:

140 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,4

Elutionspuffer:

50 mM Tris/Cl pH 8,0

10 mM GSH
5 mM DTT

2.2.1.2 Abspaltung des GST-Tags

In Vorbereitung auf die Affinitätsreinigung des *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*-Antikörpers war es notwendig, das GST-Tag vom Fusionsprotein *GST-hCALEBb-cyt* abzuspalten. Hierfür wurden die Eluate aus dreimaliger Expression (s. Abschnitt 2.2.1.1) in einer, in PBS äquilibrierten, Zentrifugen-Filtereinheit für Proteine bis 10 kDa (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device, Millipore) 4,5-fach ankonzentriert bei 7000 x g bei 4°C. Das ankonzentrierte *GST-hCALEBb-cyt* wurde nun mit in PBS äquilibrierter Glutathionsepharose für 2,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte das Äquilibrieren im Spaltungspuffer und das Zufügen von 50 µl (entspricht 100 units) PreScissionTM Protease (GE Healthcare Bio-Sciences AB), welche spezifisch das GST-Tag abspaltet. Nach fünfstündiger Inkubation auf dem Schüttler bei 4°C und dem Setzenlassen der Glutathionsepharose wurde der *hCALEBb-cyt*-Überstand abgenommen und die Glutathionsepharose wieder mit Spaltungspuffer aufgefüllt. Über Nacht bei 4°C auf Eis wurde dieser Prozess wiederholt. Die *hCALEBb-cyt*-Überstände wurden nun in einer Zentrifugen-Filtereinheit für Proteine bis 3 kDa (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device, Millipore) bei 7000 x g bei 4°C ankonzentriert.

PBS:

140 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,4

Spaltungspuffer:

50 mM Tris/Cl pH 7,0
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM DTT

2.2.1.3 Affinitätsreinigung des Antikörpers an *hCALEBb-cyt*

Für die Antikörperreinigung wurde das rekombinante *hCALEBb-cyt*-Protein (s. Abschnitt 2.2.1.1 und 2.2.1.2) weiter ankonzentriert und dann mittels SDS-PAGE und Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. An dem auf die Membran übertragenen Protein erfolgte die eigentliche Affinitätsreinigung.

Als erstes wurde das ankonzentrierte *hCALEBb-cyt*-Protein in einen Kopplungspuffer umgepuffert. Dies geschah durch 20maliges Zentrifugieren bei 2°C in einer Zentrifugen-Filtereinheit (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Device bis 3 kDa, Millipore) mit je 3 ml Kopplungspuffer.

Zu dem ankonzentrierten rekombinanten *hCALEBb-cyt*-Protein wurde 0,15% Desoxycholsäure (DCA) auf 110% der Ausgangsmenge zugegeben, geschüttelt und auf Eis inkubiert. Nach 10 Minuten wurde das Fällungsmittel Trichloressigsäure (TCA) zu 120% des Ursprungsvolumens hinzugefügt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden nun 15 Minuten bei 2°C bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Kanüle abgesaugt und das Pellet mit Aceton (auf -80°C, dann auf -20°C gekühlt) gewaschen. Es folgten zwei weitere Zentrifugationen für je 10 Minuten bei 14.000 rpm bei 2°C jeweils gefolgt vom Absaugen des Überstandes. Das Pellet wurde schließlich in 2,5fachem SDS-Probenpuffer gelöst, 10 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert und anschließend eingefroren. Mittels SDS-PAGE und Western Blotting (s. Abschnitte 2.2.4 und 2.2.6) wurde nun das in SDS-Probenpuffer gelöste *hCALEBb-cyt* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach einstündiger Inkubation in Blockierungslösung wurde ein Streifen der Nitrocellulosemembran zwischen 15 und 20 kDa, auf dem sich das *hCALEBb-cyt*-Protein befindet, ausgeschnitten, zerkleinert und in ein Falcontube überführt. Die Membranstücke wurden über Nacht bei 4°C in dem zu reinigenden Antikörper *Rb-anti-GST-hCALb-cyt* inkubiert, der Antikörper anschließend abgenommen und die Membranen mit TBST drei Mal gewaschen. Der gebundene Antikörper wurde mit 0,1 M Glycin pH 2,5 eluiert, abpipettiert und mit 1/10 des Volumens an Tris/Cl pH 8,0 neutralisiert. Die Membran wurde 30 Minuten in Blockierungslösung äquilibriert, mit TBST gewaschen und wieder für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*-Antikörper inkubiert. Nachfolgend wurde der gebundene Antikörper wie beschrieben eluiert und das Procedere zwei weitere Male wiederholt.

Kopplungspuffer:

0,2 M NaHCO₃

0,5 M NaCl

pH 8,3

SDS-Probenpuffer (5x):

50% Glycerol

10% SDS

0,5 M DTT

0,4 M Tris/Cl

*Spatelspitze Bromphenolblau
pH 6,8*

Blockierungslösung:

*1x TBST
2% BSA
0,02% Thiomersal*

TBS:

*50 mM Tris/Cl
150 mM NaCl
pH 7,4*

TBST:

*TBS
0,05% Tween 20*

2.2.2 Herstellen eines Gehirnaufschlusses

Die Spezifität der verwendeten anti-CALEB/NGC-Antikörper wurde im Rahmen von Immunblots an Gehirngewebe getestet. Hierzu war ein Gehirnaufschluss erforderlich. Ein halbes Mausgehirn wurde in einen Homogenisator auf Eis überführt und 5 ml eiskalter Aufschlusspuffer addiert. Mit einem Stößel wurde das Gehirn nun homogenisiert, auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und 70 Minuten bei 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit SDS-Probenpuffer vermischt und konnte bis zum Gebrauch eingefroren werden.

Aufschlusspuffer:

*1x TBS
1,2% Triton X-100
5 mM EDTA
Proteaseschutz (1:500): Leupeptin (100 mg/ 40 ml H₂O), Aprotinin (100 mg/60 ml H₂O),
Pepstatin A (100 mg/ 30 ml Methanol), PMSF (870 mg/ 25 ml Methanol)*

TBS:

*50 mM Tris/Cl
150 mM NaCl
pH 7,4*

2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Methode

Bei der elektrophoretischen Proteinauftrennung können sich die Proteine bei zu hohem Gesamtproteingehalt pro Bande gegenseitig verdrängen, so dass man keine saubere Auftrennung erhält. Bei Proteingemischen erzielt man die qualitativ hochwertigsten Banden bei einem Gesamtproteingehalt von ca. 30 µg pro Bande. Aus diesem Grund war es erforderlich, die Proteinkonzentration des Gehirnaufschlusses zu bestimmen, bevor er für einen Immunblot verwendet werden konnte. Es wurde hierfür ein Micro BCATM Protein Assay Kit (Pierce) benutzt. Der benutzte Kit enthält die Lösungen MA (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Natriumtartrat), MB (4% BCA) und MC (4% CuSO₄·5H₂O). Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, dass die zweiwertigen Kupferionen des Kupfersulfates in alkalischem Milieu durch Proteine zu Cu¹⁺ reduziert werden. Die einwertigen Kupferionen bilden dann mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex, dessen Extinktion photometrisch bei 562 nm gemessen werden kann. Die Lösungen MA, MB und MC wurden hierfür miteinander vermischt, der Gehirnaufschluss addiert (1:25) und 30 Minuten bei 37°C in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Die Extinktion wurde am ELISA-Reader gemessen und die Proteinkonzentration mittels einer Eichgeraden ermittelt.

2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen. Es wurde hierfür das von Laemmli (1970) beschriebene SDS-haltige TRIS-Glycin-Puffersystem benutzt. Hierbei wird das anionische SDS an hitzedenaturierte und mittels Dithiothreitol (DTT) reduzierte Proteine gebunden, wodurch deren Eigenladung überdeckt wird, so dass die Proteine proportional zu ihrer Größe aufgetrennt werden können. Je nach Molekulargewicht der interessierenden Proteine wurden Trenngele mit 8%, 10%, 12% oder 14% Acrylamid-Anteil verwendet, womit die Porengröße und somit die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine variiert werden kann. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten gefüllt. Je nach Bedarf wurden Platten-Spacer für 1,5 mm und 0,75 mm dicke Gele benutzt. Das Gel wurde mit einer Schicht 2-Propanol bedeckt, damit sich während der Polymerisation eine glatte Trennfläche bilden kann. Nach ca. einer Stunde wurde das 2-Propanol abgekippt, das Sammelgel aufgetragen und ein Kamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels nach ca. 30 Minuten wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen, die Platten eingespannt und der Puffertank mit Laufpuffer gefüllt. Alle aufzutrennenden Proben waren mit SDS-Probenpuffer versetzt worden, bei 95°C hitzedenaturiert und bis zu ihrem Gebrauch bei -20°C tiefgefroren. Kurz

vor Gebrauch wurden sie nochmals 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anzentrifugiert, bevor sie neben den Marker auf die Gele aufgetragen wurden.

Eine Spannung von 80 V wurde angelegt und auf 120 V erhöht, sobald die Lauffront das Trenngel erreicht hatte. Die negativ geladenen Proteine wanderten nun in Richtung Anode. Als die Bromphenolblau-Front begann, aus dem Gel heraus zu laufen (nach ca. 1 Stunde 15 Minuten), wurde die Elektrophorese beendet, die Gele aus der Kammer genommen und von den Glasplatten gelöst. Entweder konnten nun alle Proteine unspezifisch mittels einer Coomassie Blau-Lösung angefärbt oder im Rahmen eines Immunblots spezifische Proteine mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden.

SDS-Probenpuffer (5x):

50% Glycerol
10% SDS
0,5 M DTT
0,4 M Tris/Cl
Spatelspitze Bromphenolblau
pH 6,8

Trenngel:

	8%	10%	12%	14%
H ₂ O	9,33 ml	8 ml	7,77 ml	5,34 ml
Trenngelpuffer	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
30% Acrylamid	5,33 ml	6,66 ml	7,99 ml	9,32 ml
10% SDS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Temed	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris/Cl pH 8,8

Sammelgel:

H₂O 6,1 ml
Sammelgelpuffer 2,5 ml
30% Acrylamid 1,3 ml
10% SDS 100 µl
10% APS 100 µl
Temed 10µl

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris/Cl pH 6,8

Laufpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% SDS

2.2.5 Coomassie Blau-Färbung

Coomassie Blau ist ein Farbstoff, der sich an die basischen Aminosäureseitenketten von Proteinen anlagert und somit unspezifisch fast alle Proteine tief blau färbt. Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf einem Gel mittels Coomassie Blau sichtbar zu machen, wurde das Gel sofort nach Beendigung der Elektrophorese drei Mal mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde es für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in Coomassie Blau-Lösung inkubiert. Zur Reduktion von Hintergrund wurde die Coomassie Blau-Lösung abgossen und die Gele in Aqua dest. teilweise wieder entfärbt.

2.2.6 Western Blot/ Immunblot

Alternativ zu einer Coomassie Blau-Färbung kann nach einer SDS-PAGE ein Western Blot durchgeführt werden. Dabei werden die aufgetrennten Proteine vom Gel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und können dann spezifisch im Sinne eines Immunblots mittels Antikörpern detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Verfahren einerseits zur Affinitätsreinigung eines rekombinanten, auf Nitrocellulosemembran fixierten CALEB/NGC-Bereiches verwendet (s. Abschnitt 2.2.1) und andererseits zur Spezifitätskontrolle der Antikörper für die Immunhistochemie an elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen aus Gehirnextrakt (s. Abschnitt 2.2.2).

Für einen Western Blot wurde das Gel von den Platten gelöst und in den Semidry-Blotter überführt. Dort war das Gel eingebettet zwischen zwei Blotpapiere und die Nitrocellulosemembran. Diese wurden mit reichlich Blotpuffer getränkt; das darin enthaltene Methanol aktiviert die Proteinbindungstellen der Nitrocellulosemembran. Die anschließende Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran erfolgte etwa eine Stunde lang bei einer angelegten Spannung von 15 V. Nach Beendigung wurden die freien Proteinbindungsstellen der Blotmembran mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit Blockierungslösung abgesättigt, hiernach erfolgte die Inkubation im primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Es wurden verschiedene Antikörper gegen CALEB/NGC benutzt (*M-Mab 5C11-anti-CSPG5*, *Rb-anti-MBP-mCALextra*, *Rb-anti-GST-hCALb-cyt* und *Rb-anti-hCALb-cyt*, siehe Abschnitt 2.1.2.1). Der Antikörper wurde abgenommen und die Membran drei Mal mit TBST gewaschen, um ungebundene

Antikörperbestände zu entfernen. Dann erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur die Inkubation im sekundären, an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Antikörper *Goat-anti-rabbit* bzw. *Goat-anti-mouse* – je nach verwendetem Primärantikörper. Nach dem Abtragen des sekundären Antikörpers wurde 8 Mal mit TBST gewaschen und 2-4 Mal je 5 Minuten in AP-Puffer äquilibriert. Es folgte die Entwicklung des Blots mittels AP-Entwicklungslösung unter leichtem Schwenken. Das in dieser Lösung enthaltene BCIP und NBT wird von der Alkalischen Phosphatase zu einem blau-violetten Farbstoff umgesetzt. Bei guter Sichtbarkeit der Banden wurde die Reaktion mit Aqua dest. und anschließend mit AP-Stopp-Lösung unterbrochen. Die Blots konnten nun getrocknet und eingescannt werden.

Blotpuffer:

25 mM Tris
192 mM Glycin
20% Methanol

Blockierungslösung:

TBST
2% BSA
0,02% Thiomersal

TBST:

TBS
0,05% Tween20

TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung):

50 mM Tris/Cl pH 7,4
150 mM NaCl

AP- Puffer:

100 mM Tris-Cl pH 9,5
100 mM NaCl
5 mM MgCl₂

AP- Entwicklungslösung:

20 µl BCIP (Stammlösung)
40 µl NBT (Stammlösung)
10 ml AP-Puffer

BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat)- Stammlösung:

50 mg/ml in 100% DMF (Dimethylformamid)

NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)- Stammlösung:

50 mg/ml in 70% DMF

AP- Stopp- Lösung:

10 mM Tris pH 7,4

5 mM EDTA

2.2.7 Immunhistochemische Färbungen

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Gehirne, Augen oder gesamte Köpfe (bei E14, teils auch E15 und E16) von Mäusen der Alterstufen E14 bis P1 verwendet (s. Abschnitt 2.1.1). Das Gewebe wurde 48 Stunden bei P1-Tieren, sonst 24 Stunden in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) in PBS bei 4°C fixiert. Bei einigen P1-Tieren wurde eine Perfusionsfixierung mit PFA durchgeführt. Bei diesem Vorgang wurden die Tiere mit Propofol tief narkotisiert, dann wurde der Brustkorb eröffnet. Mit einer feinen Nadel wurde die rechte Herzkammer perforiert und in die linke Herzkammer 4%iges PFA injiziert. Anschließend wurden die Tiere dekapitiert und in PFA fixiert. Die Perfusionsfixierung dient einerseits dem Herausspülen der Erythrozyten aus den Blutgefäßen, andererseits der möglichst raschen Fixation bei dickerem Gewebe, um autolytische Vorgänge schnell auch in der Tiefe unterbinden zu können.

Anschließend wurden die Präparate für mindestens 24 Stunden in 30%ige Saccharoselösung überführt, welche der Demaskierung eventuell durch Formalin quervernetzter Proteine dient und somit eine Erhöhung der Antigenität bewirken soll. Das fixierte Gewebe wurde in 4%igem Agar-Agar eingebettet, bevor es am Vibratom (HM650V, Microm) in einer Wanne mit 4°C kaltem PBS geschnitten wurde. Es wurde eine Schnittdicke von 50 µm gewählt, sowie eine Geschwindigkeit von 12, eine Amplitude von 0,7 und Frequenz von 60 am Gerät eingestellt. Um alle Gehirnregionen optimal darstellen zu können, wurden von jeder Altersstufe Schnitte in allen drei Ebenen angefertigt. Die Gewebescheiben wurden in 12-„well“-Platten mit je 5-10 Schnitten pro „well“ aufgefangen. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte für 4 Stunden bei Raumtemperatur in Permeabilisierungslösung inkubiert. Alternativ kann für diesen Schritt auch Blockierungslösung bei 4°C über Nacht verwendet werden. Hierbei lagert sich das in beiden Lösungen enthaltene fötale Kälberserum (FCS) an das Gewebe an und sättigt unspezifische Bindungsstellen ab, womit sich bei den Färbungen der Hintergrund reduzieren lässt. Das in der Permeabilisierungslösung enthaltene Triton-X100 macht als mildes Detergenz das Gewebe und insbesondere die Zellwand durchgängiger, so dass die Antikörper eindringen können. Hierauf wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht im

ersten primären Antikörper inkubiert, der gegen CALEB/NGC gerichtet war. Nach Abnahme des Antikörpers folgten 3 Waschschrte mit Waschlösung für jeweils 10-15 Minuten bevor die Schnitte im zweiten primären Antikörper ebenfalls bei 4°C über Nacht inkubiert wurden. Hier wurden Antikörper, die gegen Doublecortin, Reelin, Nestin, Calbindin und Tau-1 gerichtet waren, benutzt (s. Abschnitt 2.1.2.1). Die Schnitte wurden nun wieder drei Mal mit PBS/ 0,1% TX-100 gewaschen, danach auf dem Schüttler für 3,5 Stunden bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern (1:1000) inkubiert. Diese an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper sind gegen Immunglobuline verschiedener Tierspezies gerichtet und wurden auf die verwendeten primären Antikörper abgestimmt. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt in Alufolie und unter Zugabe von 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:5000). Der sekundäre Antikörper wurde abgenommen und im Gegensatz zu den primären Antikörpern, welche einige Male wiederverwertet werden können, verworfen. Die Schnitte wurden nun vier Mal in Waschlösung für jeweils 10-15 Minuten gewaschen, dann auf unbeschichtete Objektträger übertragen und mittels Glycerol-Gelatine eingedeckelt.

Permeabilisierungslösung:

Phosphate-buffered saline (PBS)
5 % Fetales Kälberserum (FCS)
0,2% Triton X-100 (TX-100)
0,02% Thiomersal

PBS:

140 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,4

Blockierungslösung:

PBS
5% FCS
0,2% Thiomersal

Waschlösung:

PBS
0,1% Triton X-100

2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die indirekte Immunhistochemie erlaubt es, Proteine in Gewebeschnitten spezifisch zu markieren und sichtbar zu machen. Das Prinzip beruht auf der Inkubation in einem ersten, gegen ein gesuchtes Protein gerichteten Antikörper und dessen Markierung mittels eines zweiten Antikörpers, welcher an einen fluoreszierenden Farbstoff (Fluorochrom) gebunden ist. Diese Fluorochrome emittieren, nach Anregung durch eine Xenon- oder Quecksilber-Hochdruck-Dampfampe, Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Epifluoreszenzmikroskope, durch welche diese Fluoreszenz beobachtet werden kann, besitzen Filter, welche lediglich die längerwelligen emittierten Strahlen durchlassen und somit zu einer Kontrasterhöhung beitragen. Diese Filter erlauben überdies die getrennte Betrachtung von an unterschiedliche Fluorochrome gebundener Antikörper im gleichen Gewebeschnitt. Jedes Fluorochrom besitzt eine spezifische Anregungs- und Abstrahlungswellenlänge, so dass bei möglichst keiner oder einer nur geringen Überschneidung mehrere Fluorochrome und somit unterschiedliche Zielproteine im gleichen Präparat dargestellt werden können.

Für die immunhistochemischen Färbungen in dieser Arbeit wurden drei Fluorochrome benutzt: Die anti-CALEB/NGC-Antikörper wurden mit Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), welches eine grüne Fluoreszenz erzeugt, sichtbar gemacht. Alle übrigen Antikörper wurden mittels Cy3 (Amersham Biosciences) rot markiert. Zudem wurden die Zellkerne direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI dargestellt, welcher spezifisch mit der DNA interkaliert und bei Anregung mit ultraviolettem (UV) Licht blau fluoresziert.

Die Analyse und Dokumentation der immunhistochemischen Färbungen erfolgte an zwei Epifluoreszenzmikroskopen: BX50 (Olympus) mit den Filtern U-MWIG, U-MNIBA3 und U-MWU2 (Olympus) und mit der Digitalkamera Photometrics Cool SNAP ES (Roper Scientific) und BX51TF (Olympus) mit den Filtern U-MWIG2, U-NIBA3 und U-MWU2 und einer Digitalkamera von Intas Science Imaging Systems GmbH. Es wurden jeweils Objektive mit einer 4-, 10-, 20- und 40-fachen Vergrößerung benutzt (BX50: 4x/ 0,13; 10x/ 0,30 PH1; 20x/ 0,50 PH1; 40x/ 0,75 PH2; BX51TF: 4x/ 0,13; 10x/ 0,30; 20x/ 0,50; 40x/ 0,75).

Höherauflösende Aufnahmen wurden an dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop erstellt. Hierbei werden die Fluorochrome anstatt von einer Quecksilber-Lampe wie bei der Epifluoreszenzmikroskopie von monochromatischen Lasern angeregt. Der Laser scannt die Probe rasterartig und vermag dank einer Lochblende die Fokusebene auf einen sehr kleinen Bereich zu reduzieren. Somit wird das Fluoreszenzsignal außerhalb der Fokusebene ausgeblendet und es entstehen selektive Schichtaufnahmen des Gewebeschnittes.

Es wurden zwei konfokale Laser-Scanning-Mikroskope benutzt: Das TCS SL (Leica) sowie das TCS SP5 (Leica) mit jeweils einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) für die Darstellung von Alexa Fluor 488, einem Helium-Neon-Laser (543 nm) zur Anregung von Cy3 und einer UV-Lampe für DAPI. Das TCS SL besaß Objektive für 5-, 10- und 20-fache Vergrößerung (HC PL Fluotar 5x/0,5; HC PL Fluotar 10x/0,30; HC PL APO 20x/0,70), sowie Öl-Immersionsojektive für eine 40- und 63-fache Vergrößerung (40x HCX PL APO/1,25-0,75; 63x HCX PL APO/1,40-0,60). Am TCS SP5 wurden das Trockenobjektiv mit 10-facher Vergrößerung (HCX PL APO/10x0.40) sowie das Öl-Immersionsojektiv für eine 20-fache Vergrößerung (HCX PL APO/20.0x0.70) benutzt.

Die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte hauptsächlich am Epifluoreszenzmikroskop. Die veröffentlichten Bilder wurden aufgrund der besseren Qualität überwiegend an dem Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Die anschließende Bildbearbeitung beinhaltete das Zurechtschneiden der Bilder, ihre Beschriftung und das Einfügen von Maßstabsbalken mit dem Programm Adobe Photoshop CS2 Version 9.0.

3 Ergebnisse

3.1 Spezifität der CALEB/NGC-Antikörper

Für die Arbeit mit Antikörpern ist es wichtig zu prüfen, ob die Antikörper das gesuchte Protein überhaupt erkennen. Um die Spezifität der benutzten CALEB/NGC-Antikörper zu testen, wurden Western Blots mit Gehirnextrakten von adulten Mäusen durchgeführt. Diese wurden anschließend im Sinne eines Immunblots mit dem *Rb-anti-MBP-mCALextra*-, dem *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*-, dem nochmals affinitätsgereinigten *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörper und einem Antikörper von Abnova (Taiwan) – *M-Mab 5C11-anti-CSPG5* – inkubiert. Bei der Auswertung wurde darauf geachtet, ob die Antikörper die entsprechenden CALEB/NGC-Banden erkannten und ob noch weitere Banden angefärbt wurden.

Die Auswertung der Immunblots ergab, dass alle benutzten CALEB/NGC-Antikörper drei Banden erkannten, die der Molekülmasse von CALEB/NGC entsprechen. Die erste lag bei 150 kDa, welches die molekulare Masse der Proteoglykanform von CALEB/NGC bei der Maus ist, und eine Doppelbande befand sich bei 120 kDa, der Molekularmasse der Nicht-Proteoglykanform (Abbildung 4).

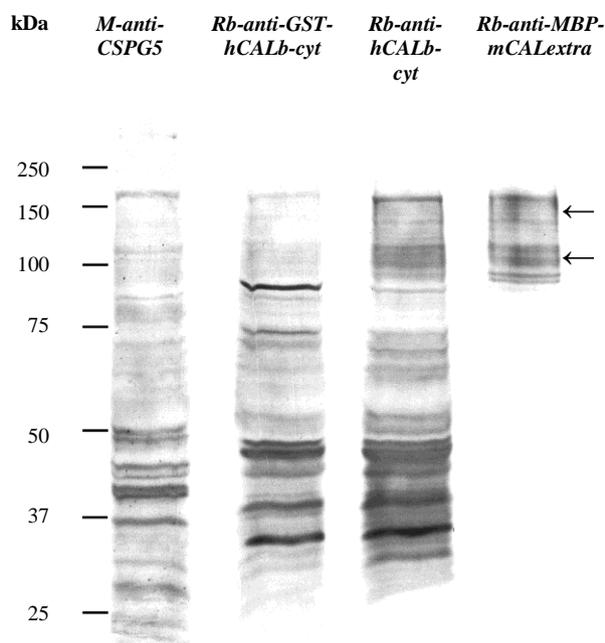


Abbildung 4: Immunblot zur Untersuchung der Spezifität der anti-CALEB/NGC-Antikörper. Je 30 µg Mausgehirnextrakt wurde inkubiert mit einem *M-anti-CSPG5*-Antikörper (*Mab 5C11*, Abnova, Taiwan) dem ungereinigten *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*- (Labor Schumacher), dem nochmals affinitätsgereinigten *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörper (Labor Schumacher), sowie dem *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper (Labor Schumacher), jeweils in einer Konzentration von 1 µg/ml. Die Proteoglykan-Form von CALEB/NGC läuft bei 150 kDa und die Nicht-Proteoglykan-Form in Form einer Doppelbande bei 120 kDa (Pfeile).

Als am spezifischsten erwies sich der *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper, der gegen die extrazelluläre CALEB/NGC-Domäne gerichtet ist. Er erkannte im Immunblot lediglich die oben genannten CALEB/NGC-Banden und wurde somit für das Erstellen einer Expressionskarte verwendet. Die Antikörper gegen die intrazelluläre CALEB/NGC-Domäne erkannten neben den spezifischen CALEB/NGC-Banden noch weitere Proteine bzw.

Proteinbestandteile, was sich in mehreren Banden zwischen 25 und 100 kDa manifestierte. Es ist möglich, dass sich hinter diesen Banden auch proteolytierte CALEB/NGC-Bestandteile verbergen. Es fand sich jedoch auch eine Bande bei 39 kDa, was der molekularen Masse von auch physiologisch vorkommendem GST entspricht. Es kann daher angenommen werden, dass der *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*-Antikörper auch nach der Affinitätsreinigung weiterhin an GST bindet. Es zeigte sich jedoch auch, dass bei identischer Entwicklungszeit der Blots und gleicher Antikörperkonzentration die Banden auf Höhe von CALEB/NGC bei Anwendung des zweifach affinitätsgereinigten Antikörpers im Vergleich zum nur einfach gereinigten *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*-Antikörper wesentlich intensiver waren. Somit ist bei diesem polyklonalen Antikörper die Menge an spezifisch an CALEB/NGC-bindenden Immunglobulinen im Verhältnis höher. Dies kann als Indikator für den Erfolg der Affinitätsreinigung gewertet werden.

Der *M-anti-CSPG5*-Antikörper, der ebenfalls gegen die intrazelluläre Domäne von CALEB/NGC gerichtet ist, erkannte im Immunblot ebenfalls die spezifischen CALEB/NGC-Banden, zeigte jedoch auch eine Affinität zu einigen weiteren Proteinen, vor allem zwischen 36 und 50 kDa. In der Immunhistochemie erwies sich dieser Antikörper ebenfalls als recht unspezifisch mit einer intensiven Anfärbung von Blutgefäßen, so dass er nicht für die immunhistochemische Expressionsanalyse von CALEB/NGC benutzt wurde.

Eine weitere Kontrolle für die Güte eines Antikörpers ist die möglichst geringe Bindung an Gewebe, in dem das gesuchte Protein bekanntermaßen nicht vorkommt. So zeigte der *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper kaum Affinität zu Gewebe außerhalb des zentralen Nervensystems (Abbildung 5).

CALEB/NGC

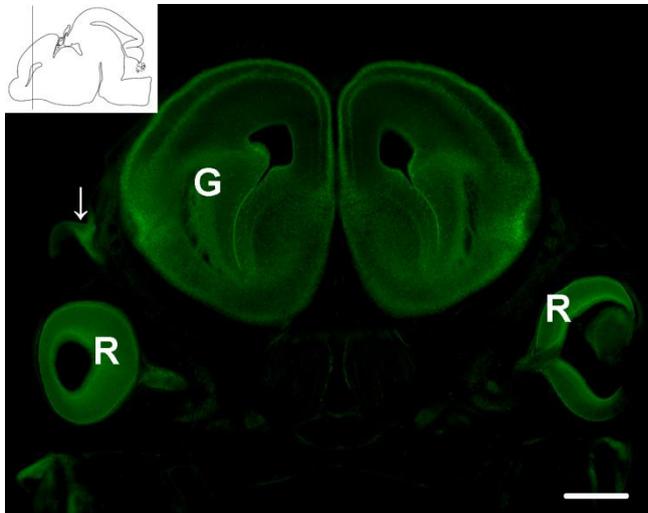


Abbildung 5: CALEB/NGC außerhalb des Gehirns. Coronare Schnittebene.

Epifluoreszenzmikroskopisches Bild. Das Bild zeigt den oberen Teil eines Mauskopfes an E16. Deutlich erkennbar sind das immunpositive Gehirn (G) und die Retina (R). Zum Kopfgewebe zeigt der *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper (1 µg/ml) kaum Affinität, lediglich an Stellen sich überlappenden Gewebes (Pfeil) ist das Fluoreszenzsignal etwas stärker. Balken: 400 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

3.2 Immunhistochemie (*Rb-anti-MBP-mCALextra*)

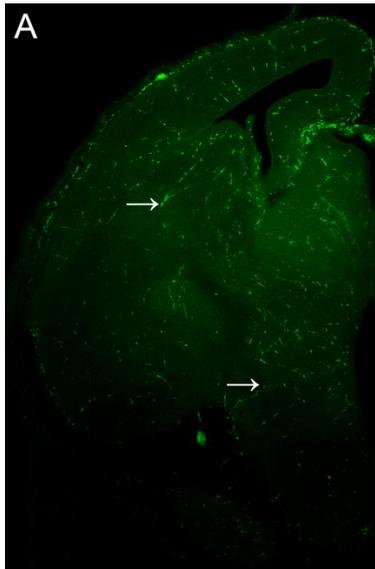
Um die Expression von CALEB/NGC im Gehirn zu untersuchen, wurden indirekte immunhistochemische Färbungen von 50 µm dicken Gehirnscheiben in drei Ebenen von Mäusen der Alterstufen E14 bis P1 durchgeführt und anschließend am Epifluoreszenzmikroskop sowie am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert. Für die Untersuchungen wurde ein vom Labor Schumacher hergestellter und affinitätsgereinigter, polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen verwendet, der gegen ein Fusionsprotein aus dem extrazellulären CALEB/NGC-Bereich und MBP gerichtet ist (*Rb-anti-MBP-mCALextra*). Dieser Antikörper erwies sich im Immunblot mit Mausgehirnextrakt als hochspezifisch. Die Ergebnisse der CALEB/NGC-Expressionsstudien wurden durch Färbungen mit einem gegen den intrazellulären Bereich von CALEB/NGC gerichteten Antikörper (*Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*) verifiziert und inhaltlich erweitert (Abschnitt 3.3).

Bei jedem immunhistochemischen Färbedurchgang wurden Negativkontrollen angefertigt, die lediglich mit den sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Der *Goat-anti-rabbit-A1488*-Antikörper, der gegen die aus dem Kaninchen stammenden CALEB/NGC-Antikörper gerichtet ist, zeigte hierbei keine nennenswerte unspezifische Bindung an Gehirngewebe (Abbildung 6).

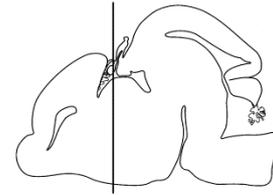
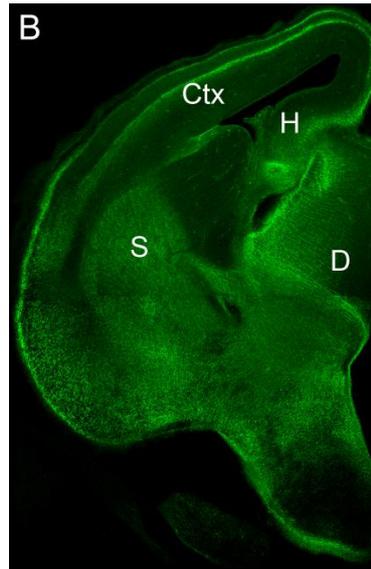
Parallel zum immunhistochemischen Nachweis von CALEB/NGC erfolgten immer auch eine Zellkernfärbung mit DAPI und die Inkubation mit einem zweiten primären Antikörper. Hierbei wurde der Stammzell- und Radialglia-Marker Nestin sowie Doublecortin als Marker für junge migrierende Neurone, Tau-1 als Axon-Marker, Reelin als Marker für Cajal-Retzius-Zellen und Calbindin, welches von manchen Interneuronen sowie retinalen Horizontal- und cerebellären Purkinjezellen exprimiert wird, verwendet (Abschnitt 2.1.2.1).

Die immunhistochemischen Färbungen zeigten, dass CALEB/NGC ein spatiotemporal differenziertes Expressionsmuster besitzt. Das Protein konzentrierte sich vor allem in neuritenreichen Regionen an und war zudem besonders markant in Mittellinienstrukturen vorhanden. Im Nachfolgenden wird das Expressionsmuster in den verschiedenen Gehirnregionen sowie der Retina und dem sich daran anschließenden Teil der Sehbahn bis zum Eintritt des Sehnerven ins Gehirn dargestellt.

Goat-anti-rabbit-Al488

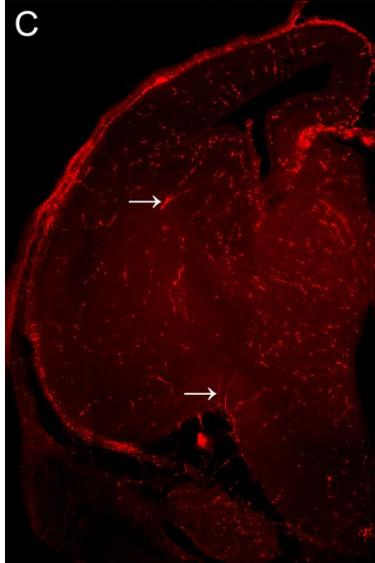


CALEB/NGC

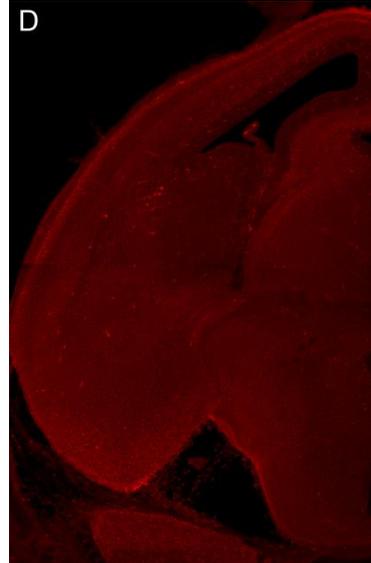
**Abbildung 6: Negativkontrolle der sekundären Antikörper.**

Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Der *Goat-anti-rabbit-Al488*-Antikörper (A; 1:1000), der als sekundärer Marker für die *Rabbit-anti-CALEB/NGC*-Antikörper (B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 $\mu\text{g/ml}$) benutzt wurde, der *Goat-anti-guinea pig-Cy3*-Antikörper (C; 1:1000) für die Doublecortin (DCX)-Färbungen (D; *GP-anti-Doublecortin*; 1:2000) sowie der *Goat-anti-mouse-Cy3*-Antikörper (E; 1:1000) als Marker unter anderem für den *Mouse-anti-Nestin*-Antikörper (F; 1:2000) weist jeweils eine nur sehr geringe unspezifische Bindung an das Gehirngewebe auf. Auffällig sind jedoch bei allen drei sekundären Antikörpern immunpositive geschlängelte Strukturen, die größere Blutgefäße darstellen (Pfeile). Ctx, Kortex; D, Diencephalon; H, Hippocampus; S, Striatum. Balken: 500 μm . Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

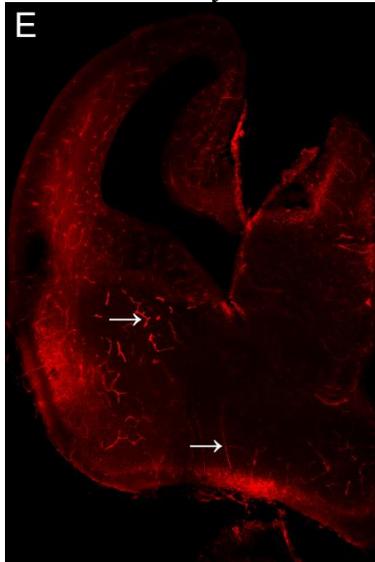
Goat-anti-guinea pig-Cy3



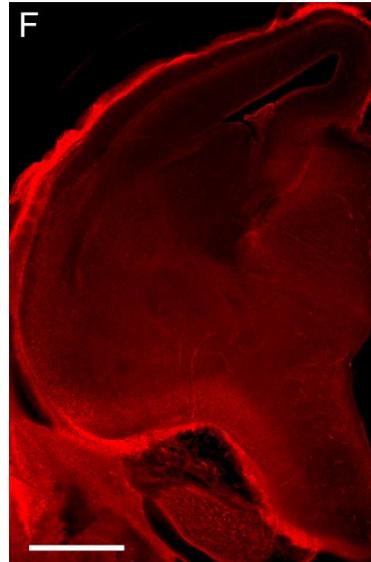
DCX



Goat-anti-mouse-Cy3



Nestin



3.2.1 Telencephalon

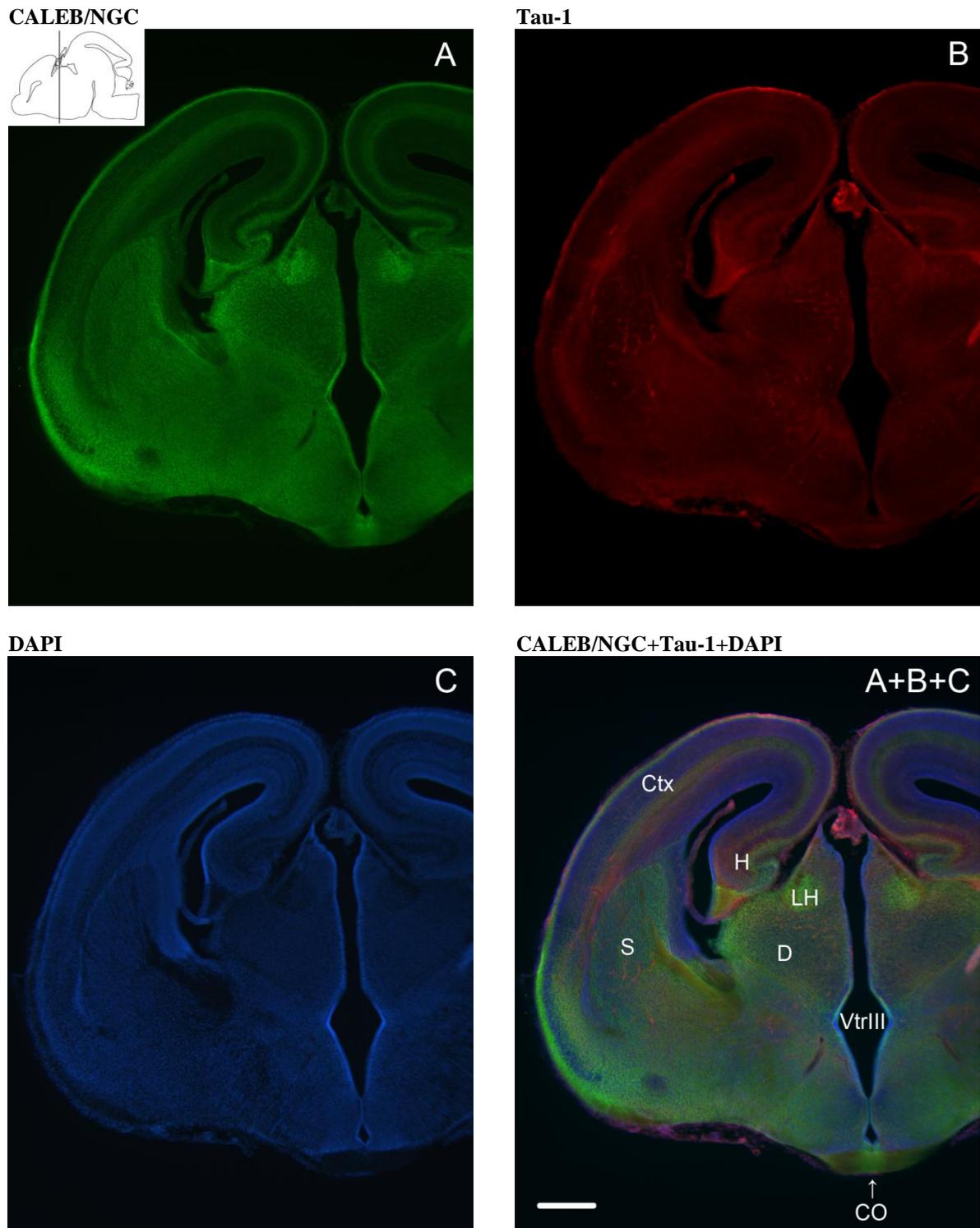


Abbildung 7: CALEB/NGC, Tau-1 und DAPI an E17. Coronare Schnitt Ebene. Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 $\mu\text{g/ml}$) wird im Gehirn stärker in zellarmen und somit tendenziell eher neuritenreichen Regionen exprimiert, wie die Kofärbungen mit dem Axonmarker Tau-1 (B; *M-anti-Tau-1*; 1 $\mu\text{g/ml}$) und dem Zellkernmarker DAPI (C; 1:5000) zeigen. Um die Ventrikel (VtrIII) entsteht eine sehr zelldichte Zone, die am Rand eine starke CALEB/NGC-Expression aufweist. CALEB/NGC wird unter anderem auch besonders stark im Chiasma opticum (CO), Striatum (S), Alveus des Hippocampus (H) und in der lateralen Habenula (LH) exprimiert. Ctx, Kortex; D, Diencephalon. Balken: 400 μm . Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Im Telencephalon zeigte sich ein eindrucksvoller Wandel des CALEB/NGC-Expressionsmusters im Laufe der Gehirnentwicklung. Quantitativ war an frühen untersuchten Entwicklungsstadien im Vergleich zu den perinatalen Stadien wenig CALEB/NGC vorhanden, das Expressionsmuster war jedoch regional sehr differenziert.

Auffällig war, dass CALEB/NGC generell eine starke Expression in neuritenreichen Regionen aufwies, jedoch in ausgewählten Fasertrakten nur sehr wenig CALEB/NGC exprimiert wurde. Dies fiel vor allem zu späteren Entwicklungszeitpunkten mit der Reifung der großen Fasertrakte und einer quantitativ höheren, weitestgehend flächendeckenden, Immunfluoreszenz im Gehirn auf. So war die ab E16 gut zu erkennende Capsula externa frei von CALEB/NGC-Expression. Weitere Axon-führende Strukturen wie das Corpus callosum und die Intermediärzone (IZ) des Kortex wiesen ebenfalls eine nur geringe CALEB/NGC-Expression auf (Abbildung 8, 11).

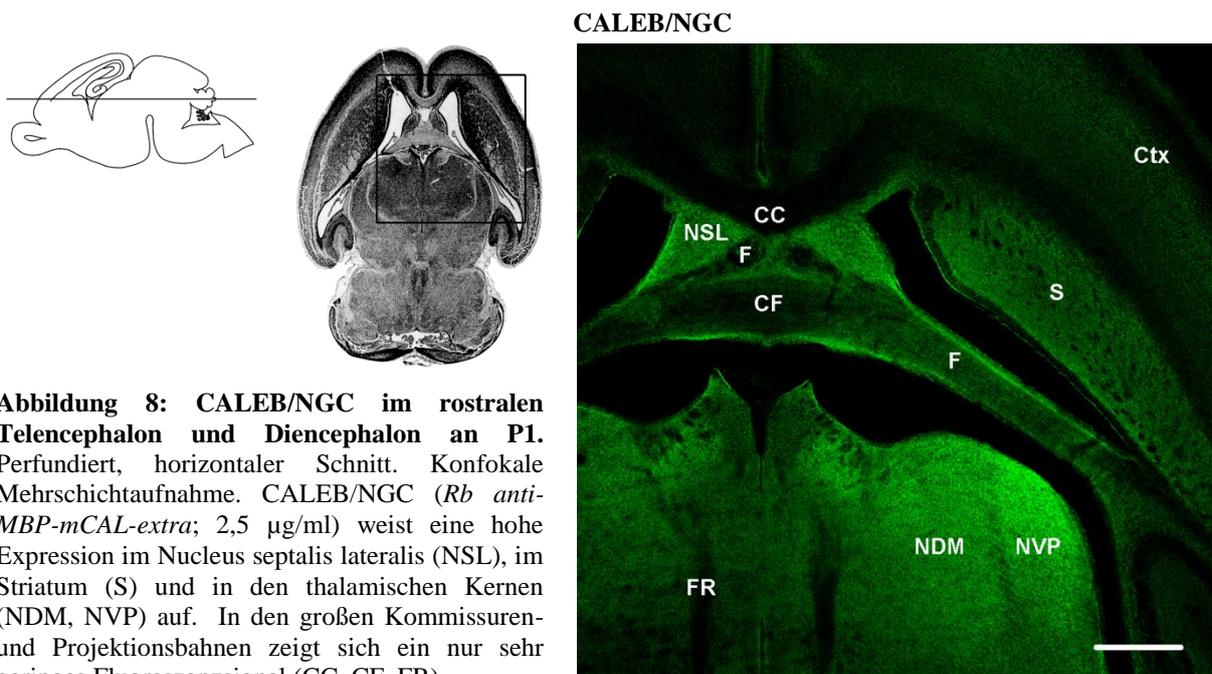


Abbildung 8: CALEB/NGC im rostralen Telencephalon und Diencephalon an P1. Perfundiert, horizontaler Schnitt. Konfokale Mehrschichtaufnahme. CALEB/NGC (*Rb anti-MBP-mCAL-extra*; 2,5 µg/ml) weist eine hohe Expression im Nucleus septalis lateralis (NSL), im Striatum (S) und in den thalamischen Kernen (NDM, NVP) auf. In den großen Kommissuren- und Projektionsbahnen zeigt sich ein nur sehr geringes Fluoreszenzsignal (CC, CF, FR).

Um einige dieser Trakte herum, beispielsweise den Fornix (F) und um die Commissura fornicis (CF), wird CALEB/NGC jedoch intensiv exprimiert. CC, Corpus callosum; Ctx, telencephaler Kortex; FR, Fasciculus retroflexus; NDM, Nucleus dorsomedialis thalami; NVP, Nucleus ventralis posterior thalami. Balken: 400 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

3.2.1.1 Neokortex

An E14 und weniger auch an E15 war im dorsomedialen telencephalen Kortex die Bildung der kortikalen Platte (KP) noch nicht vollzogen. Dort wo der Kortex nur aus Vorplatte, Marginal- und Ventrikularzone bestand, war die CALEB/NGC-Expression lediglich in der

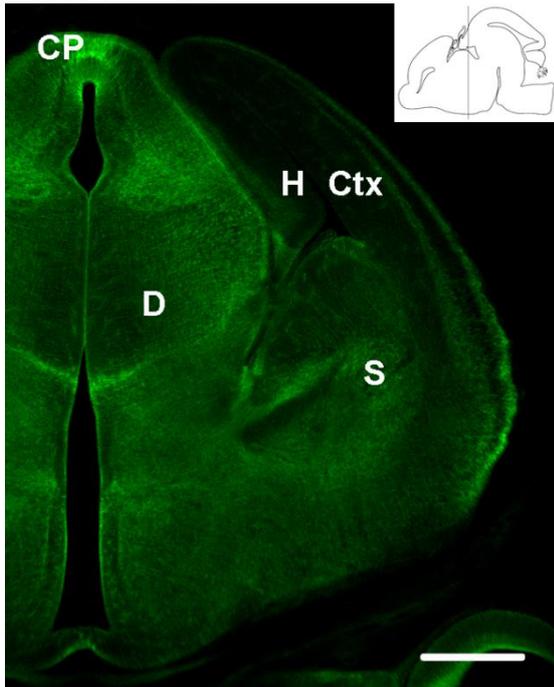
Marginalzone bedeutsam. Im Vergleich hierzu war die Expression in der Ventrikularzone und der Vorplatte sehr gering (Abbildung 9, 26). Bereits ab E14 deutete sich im ventrolateralen Neokortex eine Veränderung des Expressionsmusters an, die mit der Bildung der kortikalen Platte zusammenfällt (Abbildung 11). Einem ventrolateralen nach dorsomedialen Gradienten folgend entwickelte sich die KP. Mit ihrer Bildung ging eine ausgeprägte, sie umgebende CALEB/NGC-Expression einher (Abbildung 12, 13). So war in der Unterplatte (UP), der KP direkt medial anliegend, ein intensives CALEB/NGC-Fluoreszenzsignal vorhanden. Wie Kofärbungen mit Reelin zeigten, war die Expression lateral der KP, in der Marginalzone (MZ) bis in den äußersten Rand der KP reichend ebenfalls sehr ausgeprägt (Abbildung 10). In der zellichten KP wurde CALEB/NGC, bis auf die Angrenzung zur MZ, nur in radial orientierten, später vermehrt verzweigten Fluoreszenzstreifen exprimiert (Abbildung 11).

Ab E16/17 vollzog sich ein weiterer wesentlicher Wandel der CALEB/NGC-Expression im Neokortex. So nahm die CALEB/NGC-Expression in der kortikalen Platte zu, das dortige Fluoreszenzmuster erschien verzweigter im Vergleich zu dem radial anmutenden Expressionsmuster früherer Entwicklungsstadien und zeigte schließlich einen fließenden Übergang zum Fluoreszenzsignal in der Unterplatte (Abbildung 11). Ventrolateral beginnend setzte sich diese Veränderung im Expressionsmuster entsprechend dem Entwicklungsgradienten nach dorsomedial fort, so dass sie an P1 im gesamten Neokortex vollzogen war. Die DAPI-Färbung zeigte eine Auflockerung der Zelldichte in der KP. Nur im äußeren Teil nahe der Marginalzone befand sich auch an P1 noch immer ein dichter Zellstreifen, welcher eine deutlich geringere CALEB/NGC-Expression aufwies (Abbildung 13).

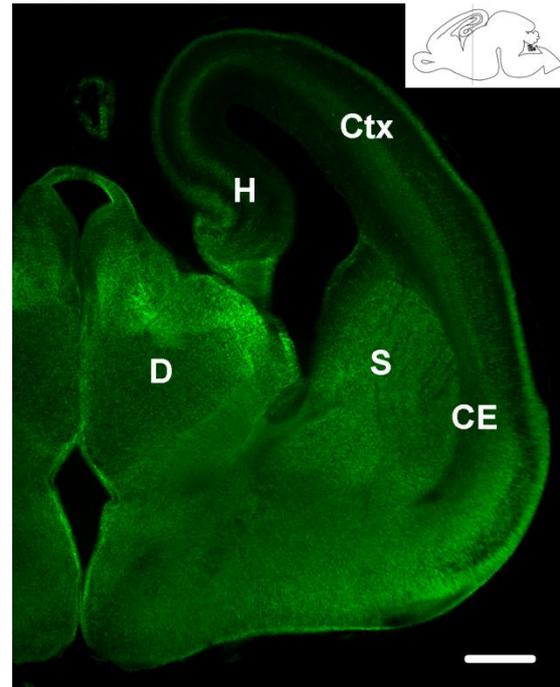
Die radial orientierten CALEB/NGC-Fluoreszenzen in der kortikalen Platte zeigten eine Koexpression mit Tau-1, so dass angenommen werden kann, dass diese immunpositiven Strukturen Axone sind. Gleichfalls weist eine Koexpression in der Marginalzone auf ein starkes Vorkommen von CALEB/NGC in den dortigen Axonen hin (Abbildung 15).

Neben einer Koexpression mit Tau-1 zeigte sich in den radial orientierten Strukturen der kortikalen Platte auch eine teilweise Koexpression von CALEB/NGC mit Nestin (Abbildung 14). In der Ventrikularzone und der Subventrikularzone wurde CALEB/NGC vergleichsweise sehr schwach exprimiert, jedoch fand sich auch in diesen immunpositiven Neuriten eine Koexpression mit Nestin (Abbildung 16). Daraus kann geschlossen werden, dass CALEB/NGC im Neokortex auch von neuronalen Vorläufer- und Stammzellen und/ oder den Radialglia exprimiert wird.

CALEB/NGC: E15



CALEB/NGC: E18



CALEB/NGC: P1

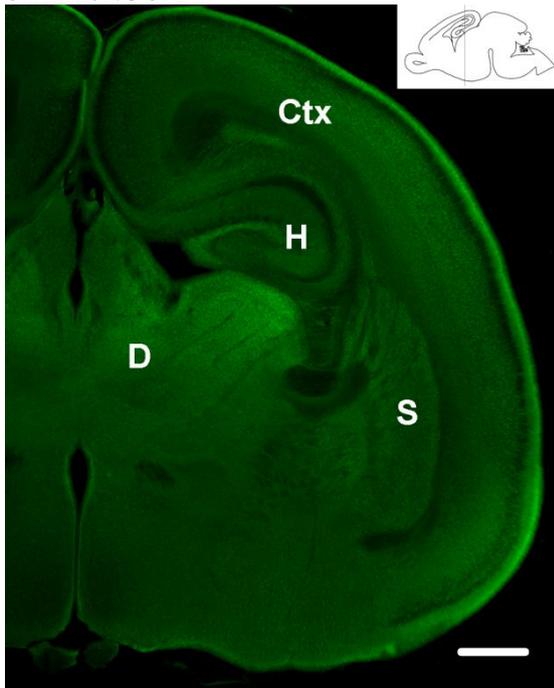


Abbildung 9: CALEB/NGC an E15, E18 und P1. Coronare Schnittebene. Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (E15, P1), konfokale Mehrschichtaufnahme (E18). Die Aufnahmen machen den Wandel des CALEB/NGC-Expressionsmusters (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; E15: 1 µg/ml; E18: 2 µg/ml; P1: 2,5 µg/ml) deutlich, welcher einem ventrolateralen nach dorsomedialen Gradienten folgt. So ist an E15 die Entwicklung der kortikalen Platte im dorsomedialen Neokortex (Ctx) noch nicht vollzogen. An E18 zeichnet sich eine verstärkte CALEB/NGC-Expression im ventrolateralen Kortex ab, an P1 ist diese Entwicklung auch dorsomedial erfolgt. Eine schichtspezifische CALEB/NGC-Expression im Hippocampus (H) ist an E15 noch nicht erkennbar, jedoch stellt sich der Alveus bereits deutlich immunpositiv dar. CE, Capsula externa; CP, Commissura posterior; D, Diencephalon; S, Striatum. Balken: 400 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

In der MZ, KP, UP und der IZ bestand vor allem zwischen E14 und E17 eine teilweise Koexpression von CALEB/NGC und Doublecortin (Abbildung 17, 18). In der KP findet eine Kolokalisation beider Proteine vor allem in radial orientierten Zellfortsätzen, in der Intermediärzone (IZ) vor allem in tangential verlaufenden Neuriten, statt. In der VZ und der SVZ bestand in den frühen Entwicklungsstadien keine Koexpression, da DCX im Gegensatz zu CALEB/NGC dort zunächst nicht exprimiert wurde. Da Doublecortin auch ein Marker für

migrierende Neurone ist, kann aus der Kolo-kalisation der Immunfluoreszenzen geschlossen werden, dass CALEB/NGC zumindest von einigen dieser Neurone exprimiert wird.

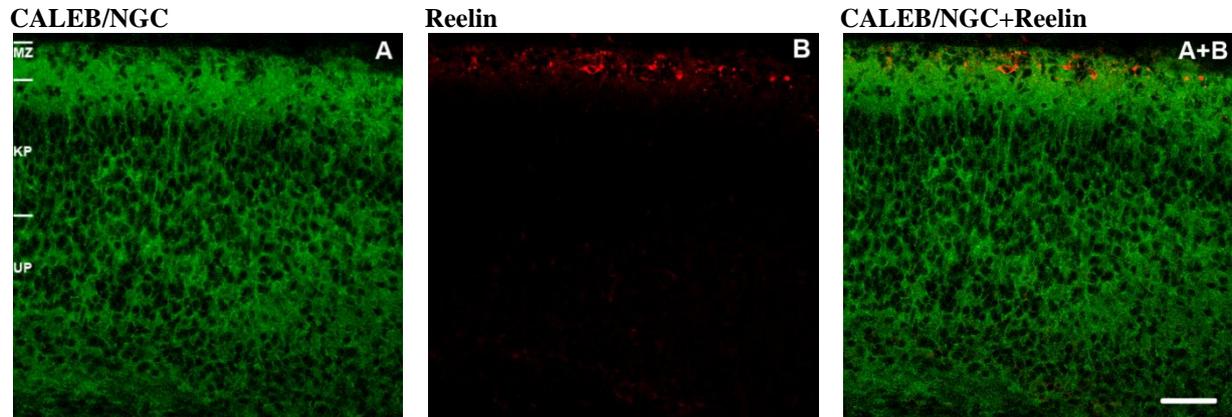


Abbildung 10: CALEB/NGC und Reelin im Neokortex an E17. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 1 µg/ml) wird stark in der Marginalzone (MZ) exprimiert, in der sich die Reelin-exprimierenden (B; *M-anti-Reelin*; 1 µg/ml) Cajal-Retzius-Zellen befinden, jedoch auch in der angrenzenden kortikalen Platte (KP). UP, Unterplatte. Balken: 50 µm.

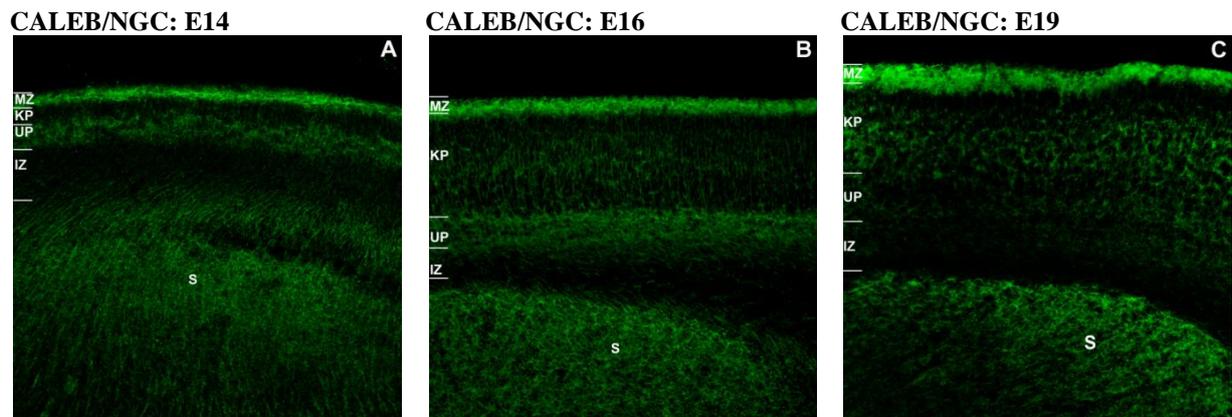


Abbildung 11: CALEB/NGC im Neokortex an E14, E16, E19 und P1. Horizontaler Schnitt. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Bei gleicher Vergrößerung wird die beträchtliche Dickenzunahme des Kortex deutlich. Während die Marginalzone (MZ) in allen Stadien eine starke CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml (A,B,C); 2,5 µg/ml (D)) aufweist, nimmt die Expression in der kortikalen Platte (KP) erst ab E16 zu. IZ, Intermediärzone; NK, Negativkontrolle (E; Stadium: P1; *Goat anti rabbit-A1488*; 1:1000); S, Striatum; UP, Unterplatte. Balken: 200 µm.

(KP) erst ab E16 zu. IZ, Intermediärzone; NK, Negativkontrolle (E; Stadium: P1; *Goat anti rabbit-A1488*; 1:1000); S, Striatum; UP, Unterplatte. Balken: 200 µm.

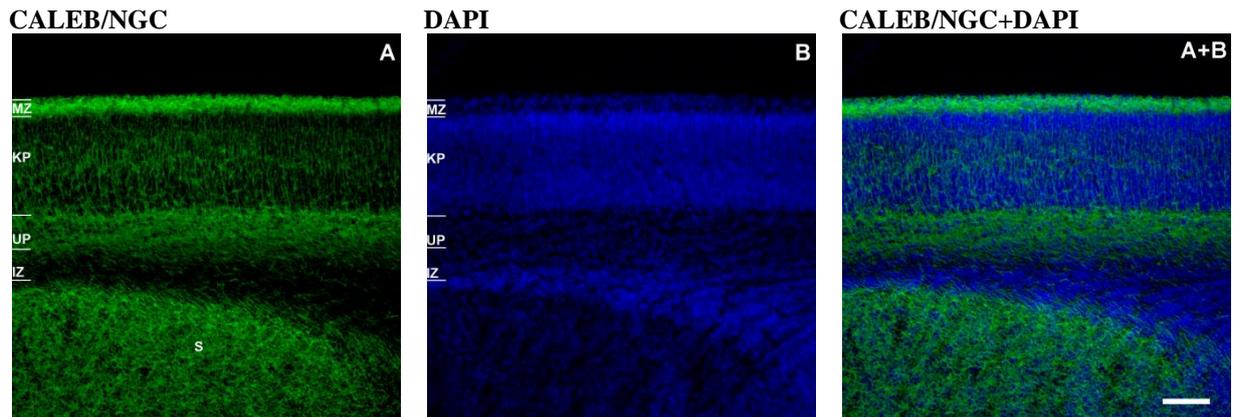


Abbildung 12: CALEB/NGC und DAPI im Neokortex an E16. Horizontaler Schnitt. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. In der Kofärbung mit DAPI (B; 1:5000) wird deutlich, dass CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) vor allem in zellarmen Regionen exprimiert wird, in denen sich zumeist Neuriten befinden. IZ, Intermediärzone; KP, kortikale Platte; Marginalzone (MZ); UP, Unterplatte. Balken 100 µm.

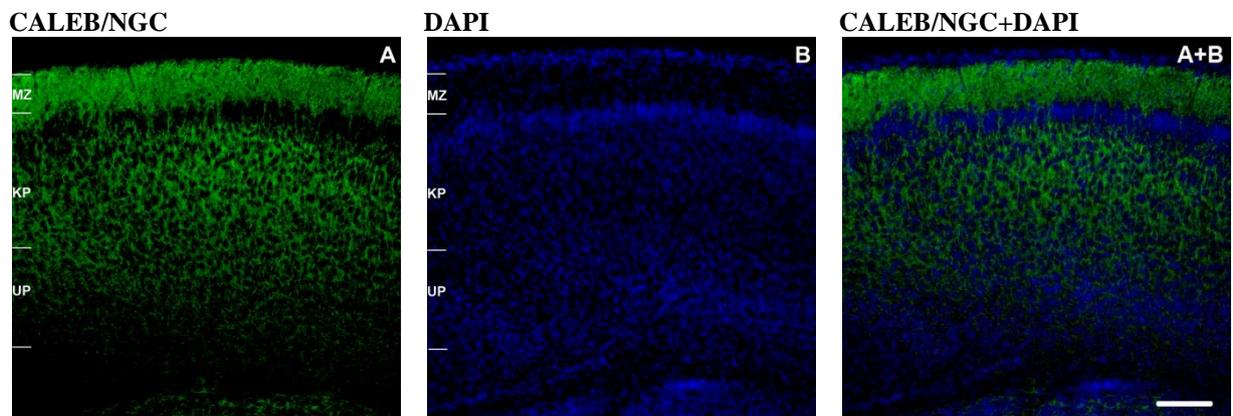


Abbildung 13: CALEB/NGC und DAPI im Neokortex an P1. Perfundiert, coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die Kofärbung mit DAPI (B; 1:5000) zeigt, dass an P1 die CALEB/NGC-Expression (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) in einem zellreichen Kerngebiet dicht unterhalb der Marginalzone (MZ) geringer ist als in der restlichen kortikalen Platte (KP). IZ, Intermediärzone; UP, Unterplatte. Balken 100 µm.

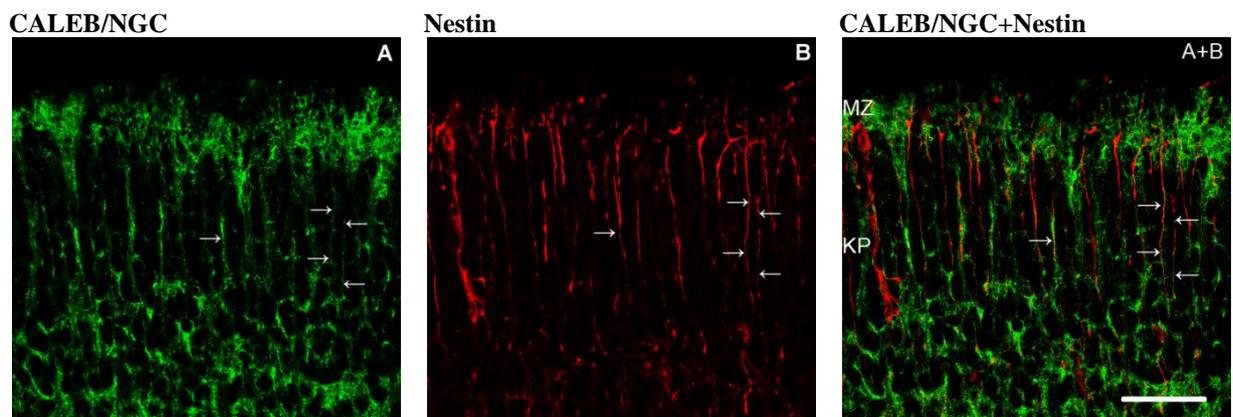


Abbildung 14: CALEB/NGC und Nestin im Neokortex an P1. Perfundiert, coronare Schnittebene. Konfokale Einzelschichtaufnahmen. In der Marginalzone (MZ) und der kortikalen Platte (KP) findet eine Koexpression von CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) und Nestin (B; *M-anti-Nestin*; 2 µg/ml) in einigen Neuriten statt. Die Pfeile zeigen auf beispielhafte Kolokalisationen. Die immunhistochemische Färbung mit dem Nestin-Antikörper stellt durchgehende immunpositive Neuriten dar, während der CALEB/NGC-Antikörper ein eher punktuell und breiteres Fluoreszenzmuster hervorruft. Balken: 50µm.

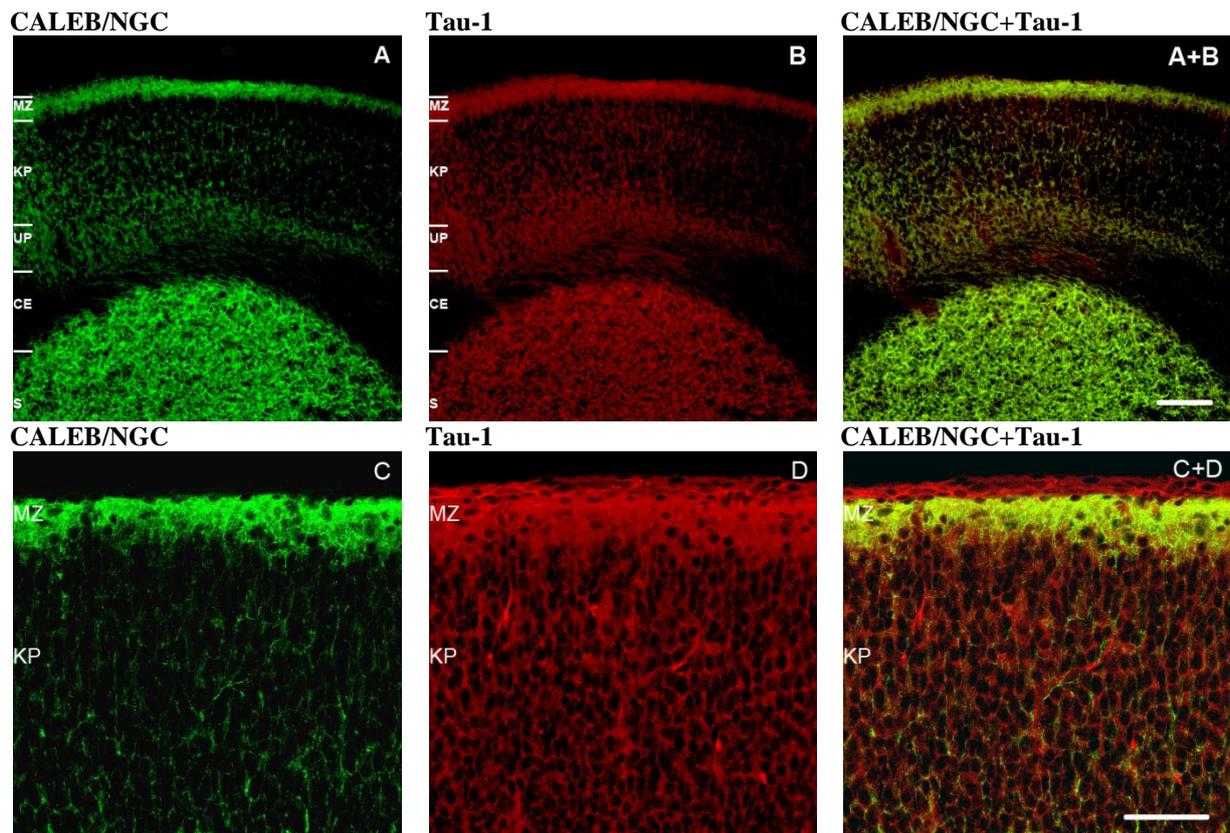


Abbildung 15: CALEB/NGC und Tau-1 im Neokortex an E17. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. CALEB/NGC (A, C; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) und Tau-1 (B, D; *M-anti-Tau-1*; 1 µg/ml) werden im telencephalen Kortex und Striatum koexprimiert. In der hochauflösenden Nahaufnahme (C, D) der äußeren Hirnrinde wird deutlich, dass CALEB/NGC größtenteils mit Tau-1 koexprimiert wird. Die Fluoreszenzen sind jedoch nicht vollständig deckungsgleich, die CALEB/NGC-Expression scheint vielmehr punktuell in den Tau-1-positiven Axonen stattzufinden. CE, Capsula externa; KP, kortikale Platte; MZ, Marginalzone; S, Striatum; UP, Unterplatte. Balken: 100 µm (A, B); 50 µm (C, D).

In Anbetracht der Morphologie der CALEB/NGC-Expression im Sinne dünner langer Fluoreszenzstreifen, der Koexpression mit Tau-1, sowie dem Vorkommen insbesondere in zellarmen und faserreichen Regionen des Gehirns ist das CALEB/NGC-Vorkommen wahrscheinlich insbesondere an Zellfortsätze gebunden. Der Wechsel des Fluoreszenzmusters in der kortikalen Platte korreliert überdies mit zunehmend auswachsenden und sich verzweigenden Neuriten. Zudem wurde eine Koexpression mit DCX sowie Nestin beobachtet, was für eine Expression von CALEB/NGC in neuronalen Vorläuferzellen, Radialglia und/oder migrierenden Neuronen spricht.

CALEB/NGC

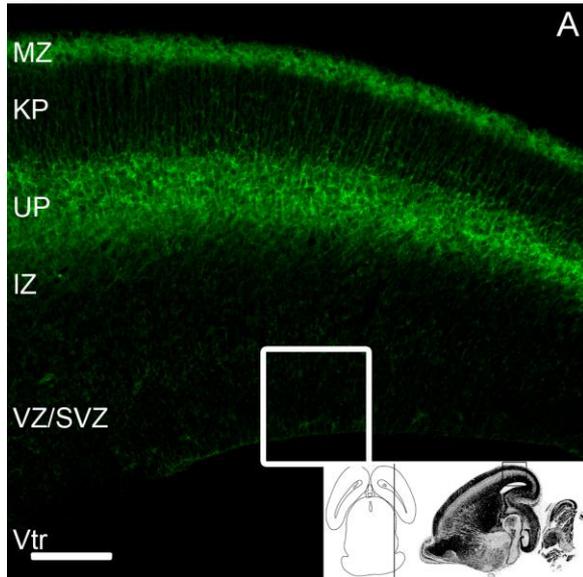
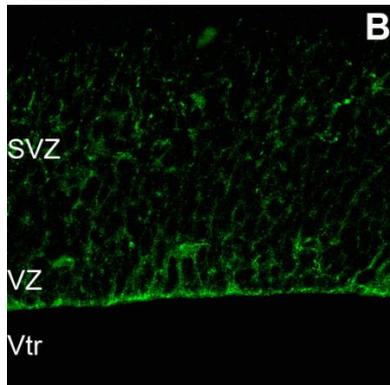
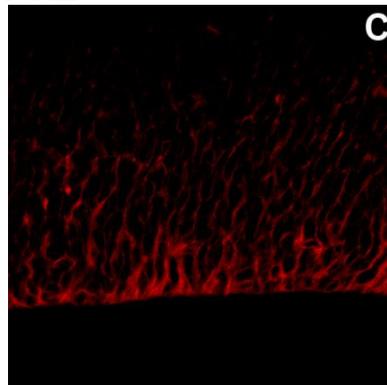


Abbildung 16: CALEB/NGC in der Ventrikularzone an E16. Sagittale Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. CALEB/NGC (A, B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) wird in der Ventrikularzone (VZ) und der Subventrikularzone (SVZ) quantitativ nicht besonders stark exprimiert im Vergleich zur Marginalzone (MZ) und der Unterplatte (UP). Die Nahaufnahmen (B) und (C) machen jedoch deutlich, dass das Protein in diesen Regionen in dünnen Nestin-positiven (C; *M-anti-Nestin*; 2 µg/ml) Zellen vorhanden ist. Diese Zellen besitzen radial orientierte Neuriten, die sich an der Ventrikeloberfläche verzweigen. KP, kortikale Platte; Vtr, Seitenventrikel. Balken: 100 µm (A), 50 µm (B, C). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

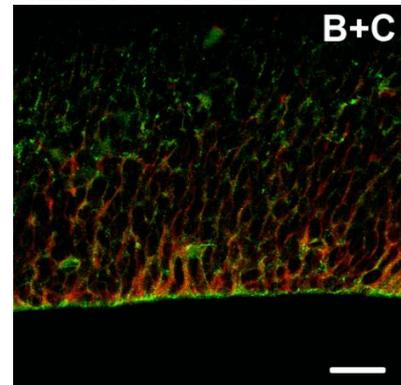
CALEB/NGC



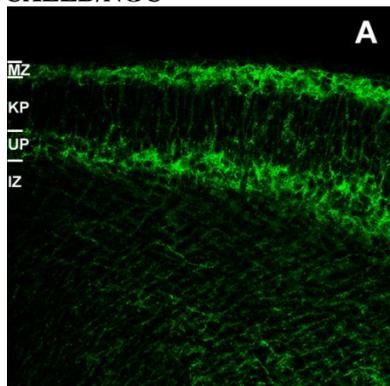
Nestin



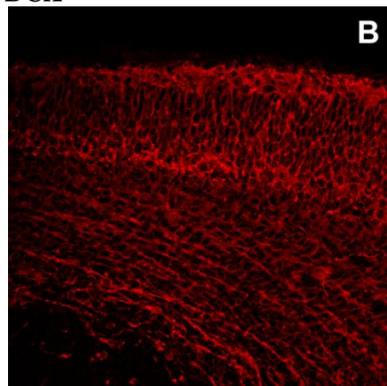
CALEB/NGC+Nestin



CALEB/NGC



DCX



CALEB/NGC+DCX

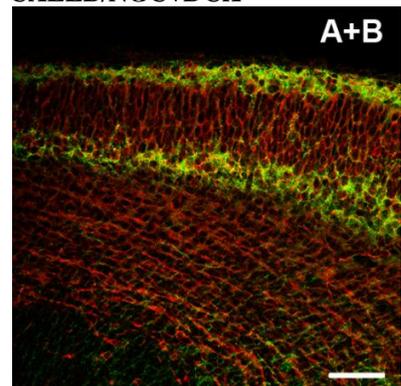


Abbildung 17: CALEB/NGC und Doublecortin im Neokortex an E14. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 1 µg/ml) und Doublecortin (DCX) (B; *GP-anti-Doublecortin*; 1:2000) werden in der Marginalzone (MZ) und der Unterplatte (UP) stark exprimiert. Es liegt eine Koexpression beider Proteine vor allem in radial verlaufenden Neuriten in der kortikalen Platte (KP) und in tangential orientierten Zellfortsätzen der Intermediärzone (IZ) vor. Balken: 50 µm.

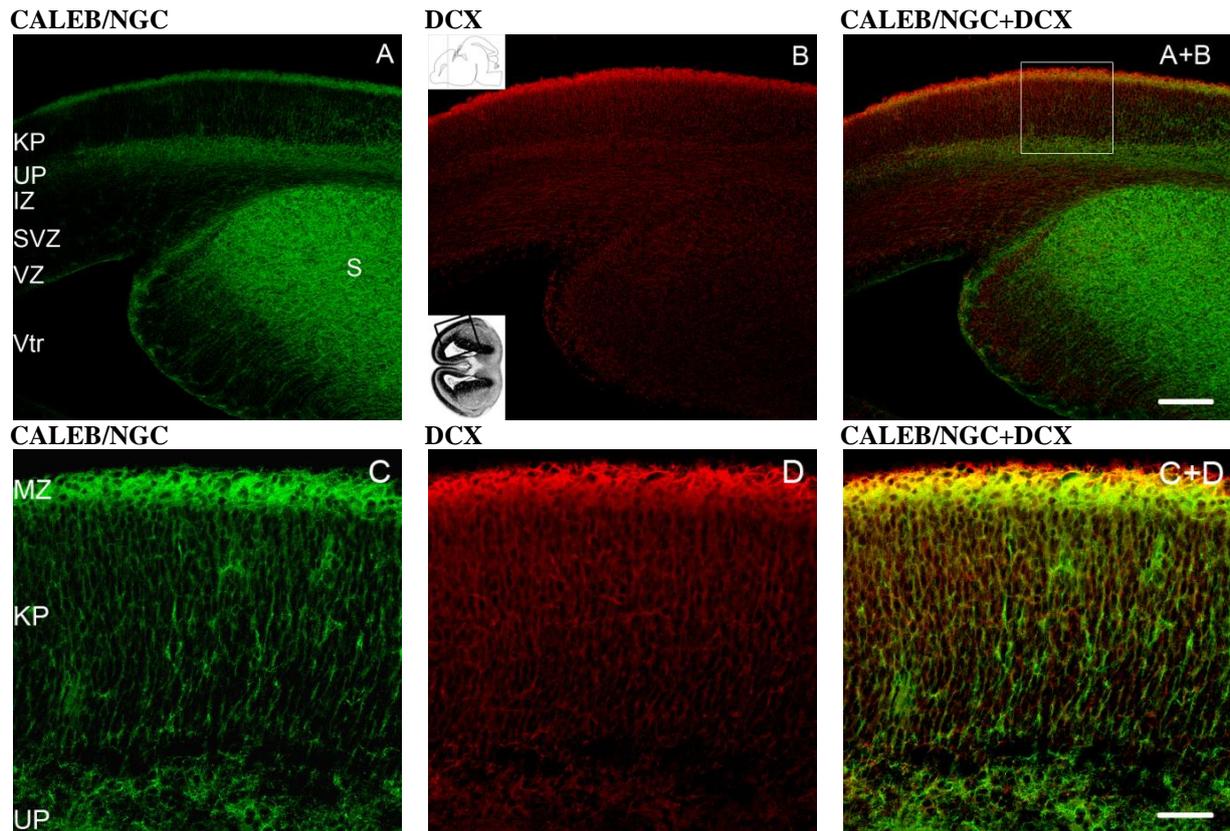


Abbildung 18: CALEB/NGC und Doublecortin (DCX) im Neokortex an E16. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. In der Übersicht des lateralen Telencephalons wird deutlich, dass CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 1 µg/ml) und DCX (B; *GP-anti-Doublecortin*; 1:2000) insbesondere in den äußeren Kortexschichten (Marginalzone (MZ), der Kortalen Platte (KP), der Unterplatte (UP) und der Intermediärzone (IZ)) koexprimiert werden. Im Striatum (S) hingegen wird CALEB/NGC deutlich stärker exprimiert als DCX, ebenso in der Ventrikularzone (VZ), wohingegen Doublecortin in der Subventrikularzone (SVZ) dominiert. Der vergrößerte Ausschnitt (C, D) verdeutlicht die CALEB/NGC-Koexpression in den äußeren Kortexschichten. Balken: 200 µm (A, B); 50 µm (C, D). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

3.2.1.2 Basalganglien

Dorsal im Telencephalon zwischen VZ und Neokortex befinden sich die Ganglienhügel – die Ursprungsregion der kortikalen Interneurone und zugleich Vorläuferstruktur der Basalganglien. Ab E14 zeichnete sich in der Intermediärzone der Ganglienhügel immer mehr das Striatum ab, welches durch eine intensive CALEB/NGC-Expression imponierte (Abbildung 19). Diese Fluoreszenz war von dichtem, retikulärem Charakter und wies wenig Koexpression mit Tau-1, DCX und Nestin auf (Abbildung 15, 18, 19). Das Striatum behielt auch an P1 eine starke CALEB/NGC-Expression bei (Abbildung 20).

In der Ventrikularzone der Ganglienhügel, die sich zwischen dem entstehenden Striatum und den Seitenventrikeln befindet, wurde CALEB/NGC ab E14 in radial orientierten Nestin-positiven Zellen exprimiert, deren Fortsätze von den Ventrikeln in Richtung Pia zogen. Die Ventrikeloberfläche wies in dieser Region des Gehirns eine CALEB/NGC-Expression auf

(Abbildung 19). Eine Koexpression mit DCX, welches an E14/15 in der VZ nicht exprimiert wurde, fand hier nicht statt (auch an E16 noch sichtbar in Abbildung 18). Eine klare Koexpression mit Tau-1 gab es dort ebenfalls nicht (Abbildung 7). Die radial orientierten CALEB/NGC/Nestin-positiven Zellen in der VZ und Subventrikularzone (SVZ) der Ganglienhügel blieben auch im weiteren Verlauf der Gehirnentwicklung bestehen und stellten sich auch in der Capsula interna – zwischen Seitenventrikeln und Striatum – dar (Abbildung 18). Die Koexpression mit Nestin deutet auch hier darauf hin, dass CALEB/NGC unter anderem von den Nestin exprimierenden Radialglia und/ oder Neuroblasten exprimiert wird.

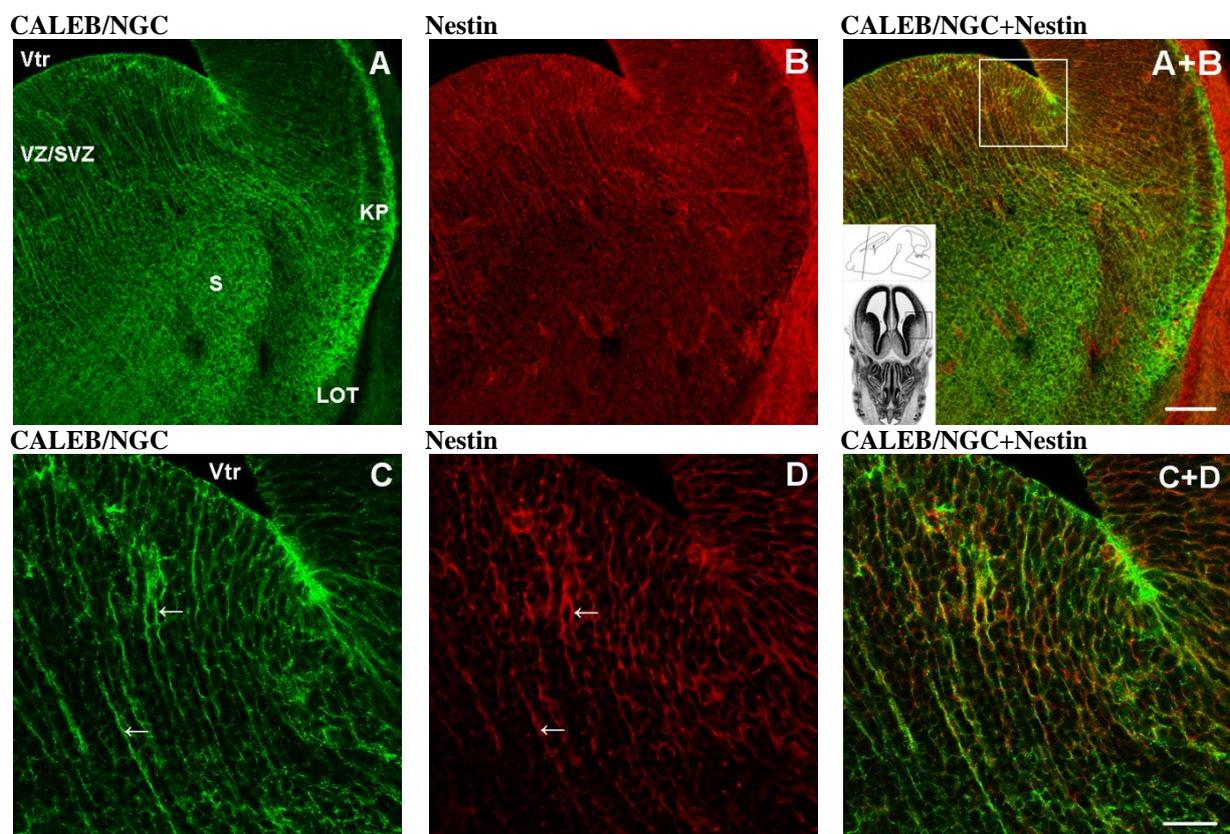


Abbildung 19: CALEB/NGC und Nestin in den Ganglienhügeln/Striatum an E14. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die Vergrößerung des eingekasteten Bereichs (C, D) verdeutlicht eine Koexpression von CALEB/NGC (A und C; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) und Nestin (B und D; *M-anti-Nestin*; 2 µg/ml) in radial ausgerichteten Neuriten der Subventrikularzone/Ventrikularzone der Ganglienhügel/ des Striatums. Die Pfeile zeigen auf beispielhafte Kolokalisationen. Auffällig ist, dass CALEB/NGC zudem in der Intermediärzone der Ganglienhügel/ des Striatums (S) eine sehr starke Expression aufweist, ebenso an der medialen Begrenzung des lateralen olfaktorischen Traktes (LOT). KP, kortikale Platte. Balken: 100 µm (A, B); 50 µm (C, D). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Ein ähnliches Bild einer intensiven, zu radial ausgerichteten Strängen geformten CALEB/NGC-Expression erschien im übrigen Telencephalon ab E17 ebenfalls zwischen den Seitenventrikeln und den Nuclei septales. Auch dort war die CALEB/NGC-Expression an der Ventrikeloberfläche sehr ausgeprägt (Abbildung 8). An der übrigen Begrenzung der

Seitenventrikel und des III. und IV. Ventrikels war ansonsten in den früheren Entwicklungsstadien eine vergleichsweise schwache Expression zu verzeichnen. Diese wurde ab E17 zunehmend stärker und war an P1 deutlich erkennbar. Sie ging einher mit der Ausbildung einer sehr zellichten Zone um die Ventrikel herum, die am Rand von kräftiger CALEB/NGC-Expression umgeben war (Abbildung 7, 20).

CALEB/NGC

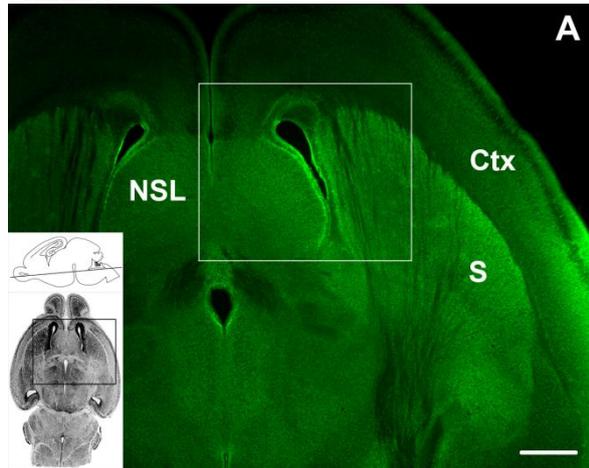
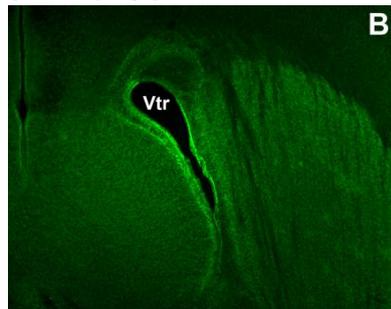
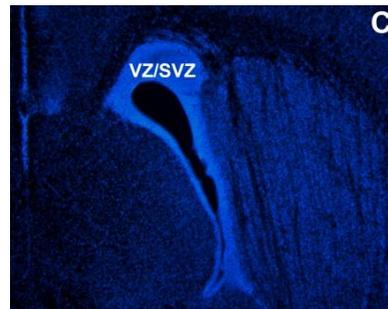


Abbildung 20: CALEB/NGC und DAPI um die Seitenventrikel an P1. Perfundiert, horizontale Schnittebene. Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. An P1 besteht um die Seitenventrikel (Vtr) eine sehr zellichte (C; DAPI; 1:5000) Ventrikularzone (VZ), welche am äußeren wie am inneren Rand zum Ventrikel eine starke CALEB/NGC-Expression (A, B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) aufweist. Ctx, Kortex; S, Striatum; NSL, Nucleus septalis lateralis; SVZ, Subventrikularzone. Balken: 400 µm (A); 100 µm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

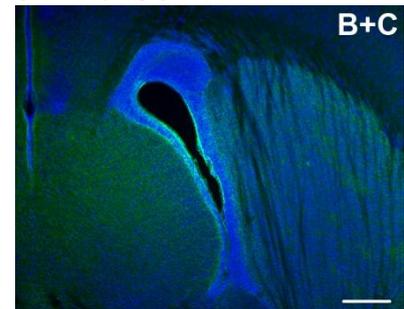
CALEB/NGC



DAPI

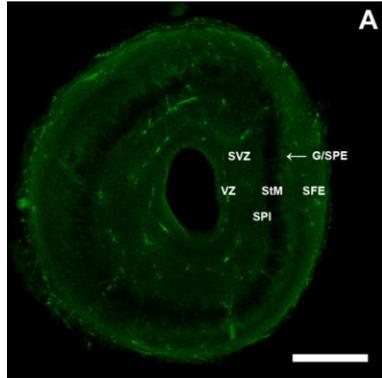


CALEB/NGC+DAPI

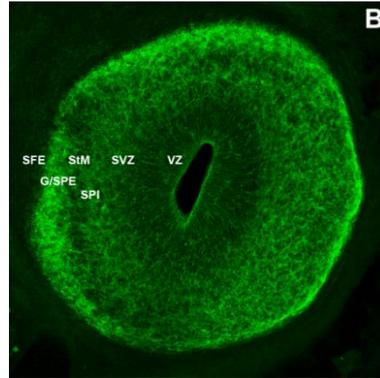


3.2.1.3 Rhinencephalon

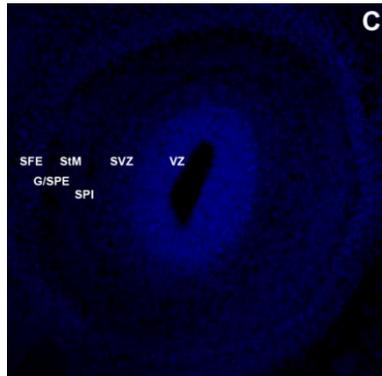
Der Bulbus olfactorius ist der Teil des Rhinencephalons, in dem die Afferenzen aus der Nase verschaltet werden. An E14 und E15 zeigte sich hier eine nur geringe CALEB/NGC-Expression. Ab E16 veränderte sich das Expressionsmuster einhergehend mit der Schichtenbildung im Bulbus olfactorius (Abbildung 21). Es trat eine starke Expression in der Glomerularschicht (Stratum glomerulare) sowie in der inneren und der äußeren plexiformen Schicht (Stratum plexiforme internum et externum) hervor, welche jeweils ein komplexes Netzwerk von Dendriten und Axonen sowie einige Interneurone beherbergen (Simpson und Sweazey, 2012). Die Mitralzellschicht (Stratum mitrale) wies hingegen nur einige radial orientierte immunpositive Strukturen und sonst fast keine CALEB/NGC-Expression auf. In der dem Stratum glomerulare außen anliegenden Nervenfaserschicht (Stratum fibrosum externum) wurde kein CALEB/NGC exprimiert (Abbildung 21, 22, 23).

NK: *Goat anti rabbit-A1488*

CALEB/NGC



DAPI



CALEB/NGC+DAPI

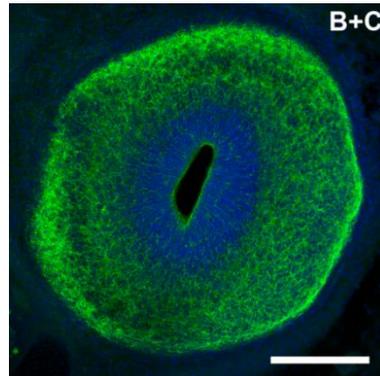


Abbildung 21: CALEB/NGC und DAPI im Bulbus olfactorius an E16. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Ab E16 wird die schichtspezifische CALEB/NGC-Expression deutlicher (B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 $\mu\text{g/ml}$). So wird im Stratum fibrosum externum (SFE) kein und im Stratum mitrale (StM) kaum CALEB/NGC exprimiert. G, Stratum glomerulare; NK, Negativkontrolle (A; *Goat anti rabbit-A1488*; 1:1000); SPE, Stratum plexiforme externum; SPI, Stratum plexiforme internum; SVZ, Subventrikularzone; VZ, Ventrikularzone. Balken: 200 μm . Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

CALEB/NGC

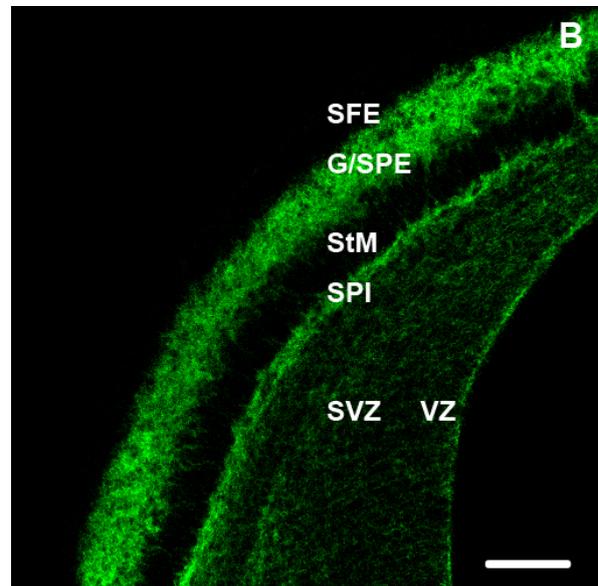
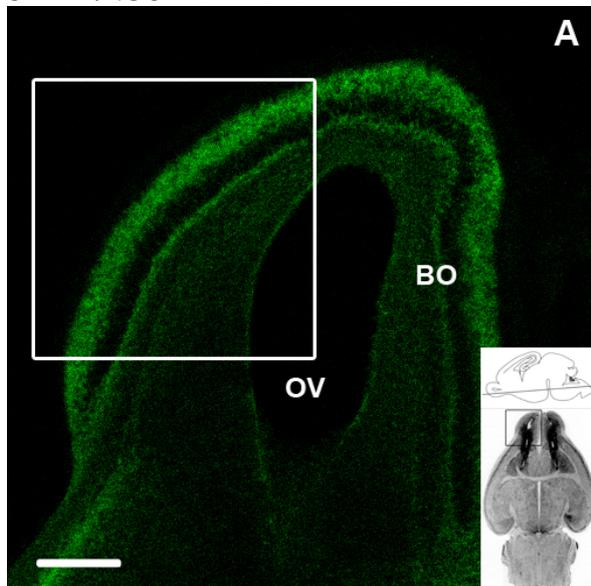


Abbildung 22: CALEB/NGC im Bulbus olfactorius an E19. Horizontale Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. CALEB/NGC (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 $\mu\text{g/ml}$) wird in den faserreichen Schichten Stratum glomerulare (G) bzw. Stratum plexiforme externum (SPE) sowie im Stratum plexiforme internum (SPI) exprimiert. Das Stratum mitrale (StM) weist nur wenig, das Stratum fibrosum externum (SFE) keine CALEB/NGC-Expression auf. BO, Bulbus olfactorius; OV, olfaktorischer Ventrikel; SVZ, Subventrikularzone; VZ, Ventrikularzone. Balken: 200 μm (A); 100 μm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Die Glomeruli bilden sich als CALEB/NGC-exprimierende Strukturen ab E19 im Stratum glomerulare aus (Abbildung 22, 23). In ihnen findet die Verschaltung zwischen den

Rezeptorzellaxonen und den Mitralzellen statt, sowie die Modulation der Signalverarbeitung durch Interneurone (Simpson und Sweazey, 2012). Die Axone der Mitralzellen bündeln sich im lateralen olfaktorischen Trakt, der bereits an E14 an seiner medialen Begrenzung eine kräftige CALEB/NGC-Expression aufwies, wobei der Trakt selber (ab E15) eine zu wenigen, dünnen, radialen Strängen gruppierte CALEB/NGC-positive Fluoreszenz besaß (Abbildung 19).

CALEB/NGC

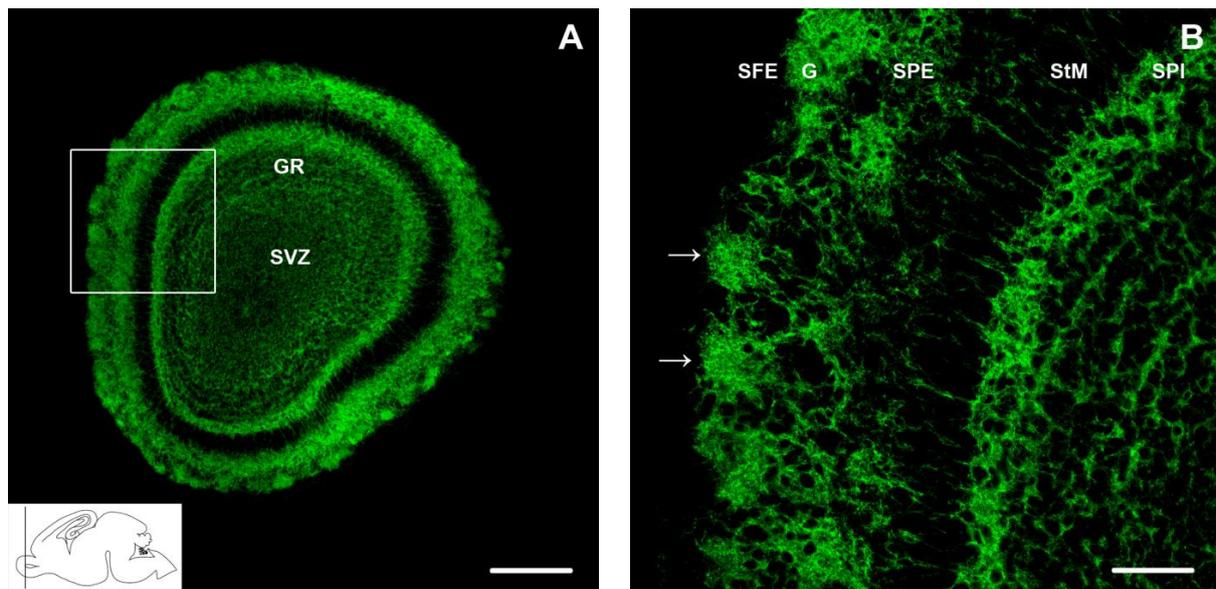


Abbildung 23: CALEB/NGC im Bulbus olfactorius an P1. Perfundiert, coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. An P1 werden im Stratum glomerulare (G) die Glomeruli (Pfeile) sichtbar, die eine starke CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) aufweisen. In der Vergrößerung (B) wird deutlich, dass das Stratum mitrale (StM) von dünnen, radialen, immunpositiven Fasern durchzogen wird. GR, Stratum granulosum; SFE, Stratum fibrosum externum; SPE, Stratum plexiforme externum; SPI, Stratum plexiforme internum; SVZ, Subventrikulärzone. Balken: 200 µm (A); 50 µm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

3.2.1.4 Hippocampus

Bereits an E14,5 sind die meisten Zellen des Cornu ammonis von der VZ an ihren Bestimmungsort gelangt und beginnen daraufhin ihre Differenzierung sowie das Ausbilden von Axonen und Dendriten (Taupin, 2007). Lediglich die Körnerzellen des Gyrus dentatus entstehen später, nur ca. 15% von ihnen existieren bereits pränatal (Taupin, 2007).

Der Hippocampus wies an E14 eine sehr geringe CALEB/NGC-Expression auf. Eine ausgeprägte schichtspezifische Expression von CALEB/NGC wurde erst ab E16 deutlich (Abbildung 7, 9). Während in den Regionen Cornu ammonis (CA) 1-4 des kernreichen, glutamaterge Neurone beherbergenden Stratum pyramidale fast keine CALEB/NGC-Expression stattfand, wurde in den umgebenden hippocampalen Schichten eine starke

Expression verzeichnet (Abbildung 25). Diese intensiv CALEB/NGC exprimierenden Schichten entsprachen außen dem Stratum oriens (pränatal als Unterplatte bezeichnet), wo sich Korbzellen sowie Verzweigungen der basalen Dendriten der Pyramidenzellen befinden, und innen dem Stratum radiatum (pränatal: Marginalzone), welches interneuronale Vernetzungen zwischen Pyramidenzellen und Korbzellen enthält (Willis und Haines, 2012).

CALEB/NGC

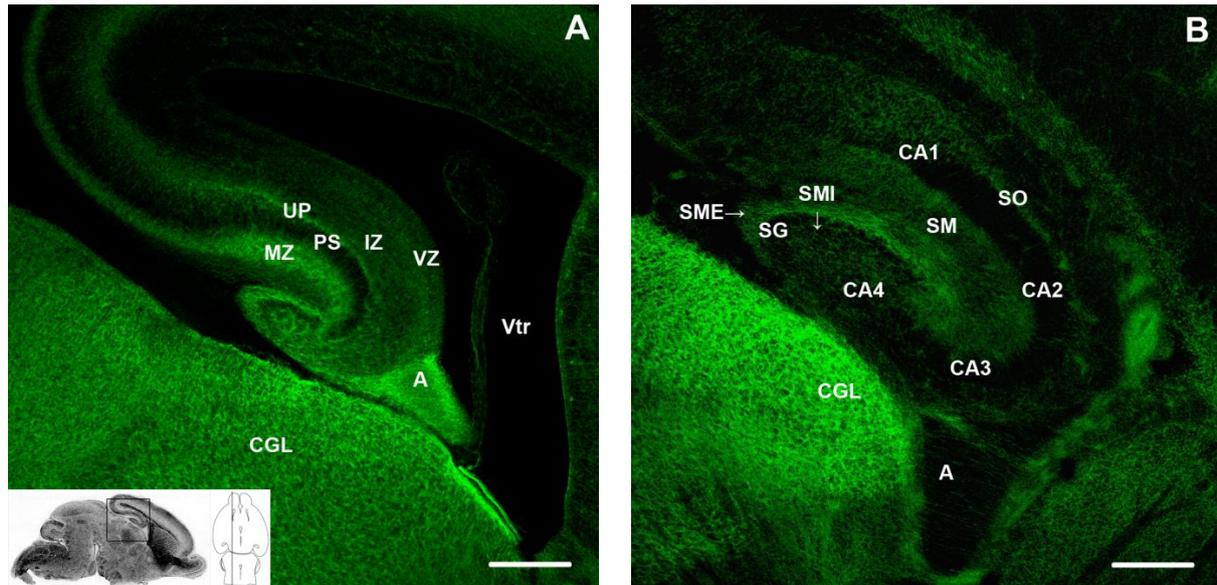


Abbildung 24: CALEB/NGC im Hippocampus an E18 und P1. Sagittale Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die neuritenreichen Regionen um die Pyramidenzellen weisen eine besonders intensive CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) auf. Auch der Alveus (A), der die Efferenzen im weiteren Verlauf und die Kommissurenfasern aus dem gegenseitigen Hippocampus führt (Willis und Haines, 2012), ist an E18 (A) noch stark immunpositiv insbesondere in seinen Randregionen. An P1 (B) hat die Fluoreszenzstärke dort bereits abgenommen. Als weitere Region mit einer hohen CALEB/NGC-Expression stellt sich das Corpus geniculatum laterale (CGL) dar. CA1-4, Cornu ammonis 1-4; IZ, Intermediärzone; MZ, Marginalzone; PS, Pyramidenzellschicht; SG, Stratum granulosum; SM, Stratum moleculare; SME, Stratum moleculare externum; SMI, Stratum moleculare internum; SO, Stratum oriens; UP, Unterplatte, Vtr, Seitenventrikel; VZ, Ventrikularzone. Balken: 200 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Im Gyrus dentatus – gut identifizierbar ab E17 anhand der Zellschichtung sowohl in der DAPI- als auch in der CALEB/NGC-Färbung – war das Stratum granulosum ebenfalls weitestgehend frei von CALEB/NGC-Vorkommen (Abbildung 24, 25). Entsprechend trat in den neuritenreichen Schichten, die das Stratum granulosum innen und außen umgeben, eine starke Expression auf. So wurde CALEB/NGC im Stratum moleculare externum, in dem die Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex enden, etwas stärker exprimiert als im Stratum moleculare internum, in dem die Körnerzellen mit Afferenzen des kontralateralen Hippocampus verschaltet werden (Abbildung 24, 25) (Willis und Haines, 2012).

NK: Goat anti rabbit-A1488

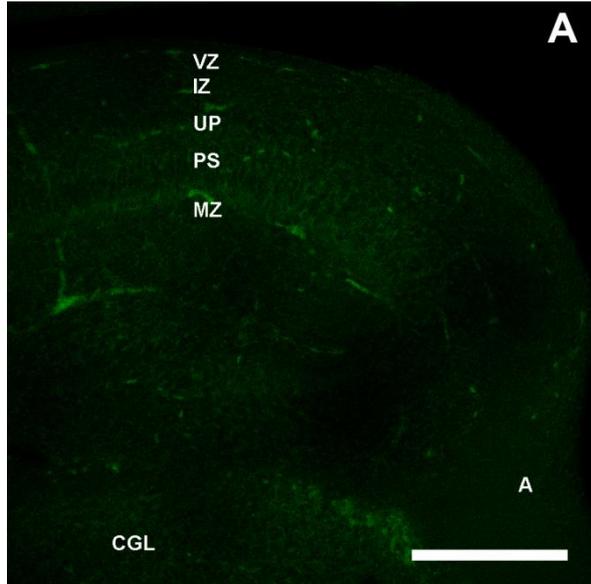
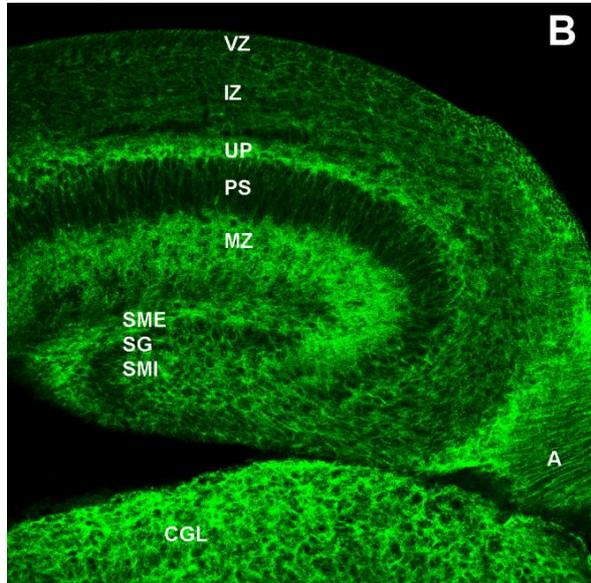
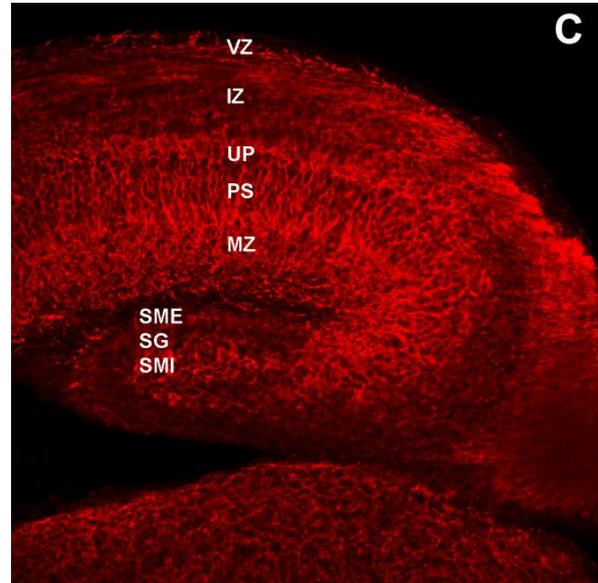


Abbildung 25: CALEB/NGC, Doublecortin und DAPI im Hippocampus an E19. Sagittale Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die Kofärbung mit DAPI (D; 1:5000) macht deutlich, dass CALEB/NGC vornehmlich in den kernarmen Schichten des Hippocampus exprimiert wird. Doublecortin (C; GP-anti-Doublecortin; 1:2000) weist eine geringe Mehrexpression in der Marginalzone (MZ) auf, wird jedoch in allen Schichten des Hippocampus rege exprimiert. Die Bezeichnung der Schichten ändert sich postnatal und entspricht dann der Nomenklatur beim adulten Tier. A, Alveus; CGL, Corpus geniculatum laterale; IZ, Intermediärzone; NK, Negativkontrolle (A; Goat anti rabbit-A1488; 1:1000); PS, Pyramidenzellschicht; SG, Stratum granulosum; SME, Stratum moleculare externum; SMI, Stratum moleculare internum; UP, Unterplatte; VZ, Ventrikularzone. Balken: 200 µm.

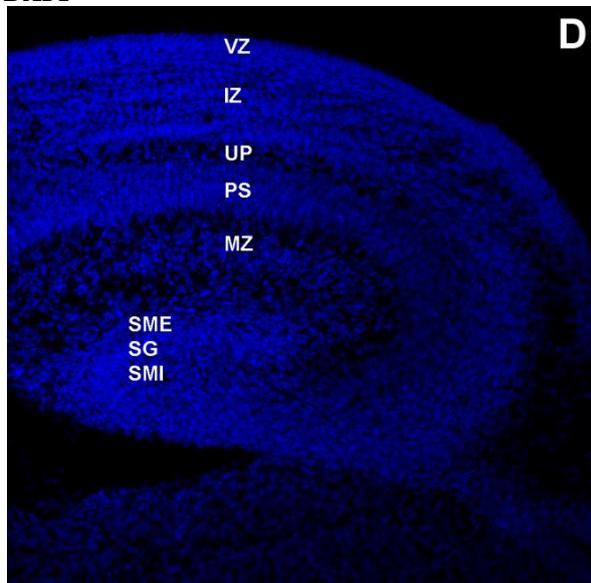
CALEB/NGC



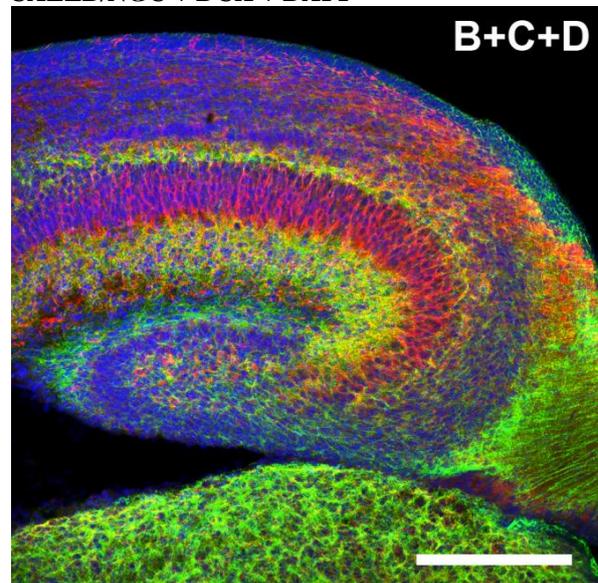
DCX



DAPI



CALEB/NGC + DCX + DAPI



An E14 bestand die stärkste hippocampale CALEB/NGC-Expression im Alveus und in den Fimbrien, welche Efferenzen aus dem Hippocampus als Teil des Papez-Neuronenkreises führen (Willis und Haines, 2012). Diese nahm zwischen E16 und E19 zu und war insbesondere an der Begrenzung deutlich, wobei die Fimbrien und der Alveus ansonsten von sehr dünnen CALEB/NGC-positiven Fasern durchzogen wurden (Abbildung 7, 9, 24). In unmittelbarer Nähe fiel ab E19 der Nucleus septalis lateralis als intensiv CALEB/NGC-exprimierende Struktur auf (Abbildung 8, 20).

3.2.2 Diencephalon

Im Diencephalon fand auf eindrucklichste Weise ein Wandel des CALEB/NGC-Expressionsmusters von radialem Charakter hin zu einer großflächigen, retikulär anmutenden Expression statt, wobei auch in dieser Region des Gehirns das CALEB/NGC-Vorkommen insbesondere an kernarme Bereiche gebunden war (Abbildung 7, 9).

CALEB/NGC

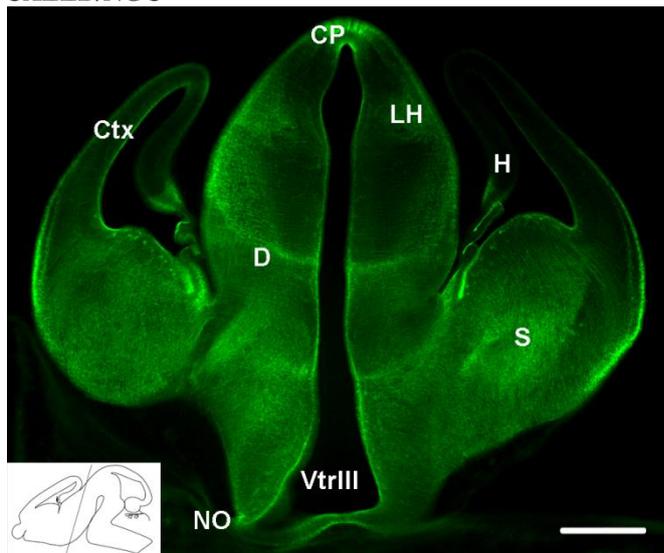


Abbildung 26: CALEB/NGC im Kortex und Diencephalon an E14. Coronare Schnitt Ebene. Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme. CALEB/NGC (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) wird im Diencephalon in langen radialen Neuriten exprimiert, die vom dritten Ventrikel (VtrIII) zur Pia mater ziehen. Mit der fortschreitenden Kernbildung, erscheint eine verstärkte CALEB/NGC-Expression in einigen Kerngebieten; so wird bereits an E14 die immunpositive, laterale Habenula (LH) sichtbar. Weitere Regionen mit einer starken CALEB/NGC-Expression sind das Striatum (S) und die Commissura posterior (CP). Ventrolateral im Kortex (Ctx) wird die kortikale Platte sichtbar. D, Diencephalon; H, Hippocampus; NO, Nervus opticus. Balken: 400 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

An E14 dominierte im Diencephalon eine CALEB/NGC-Expression in Form von langen, zwischen drittem Ventrikel und Pia mater radial ausgerichteten Zellen (Abbildung 26, 27). Ab E14 wandern vermehrt Proneurone aus der VZ aus und gruppieren sich in der Intermediärzone (IZ) zu den thalamischen Kerngebieten (Asan und Kugler, 2004). Diese Veränderung der zellulären Struktur des Diencephalons korrelierte mit einer Zunahme der CALEB/NGC-Expression in der IZ. Das radiale CALEB/NGC-Expressionsmuster wich mit fortschreitender Gehirnentwicklung hochverzweigten immunpositiven Strukturen, so dass an E17 bereits das gesamte Diencephalon von diesem retikulär anmutenden Fluoreszenzmuster

bedeckt war. In den einzelnen thalamischen Kernen war die Expression etwas stärker, wobei sie im Corpus geniculatum laterale als besonders intensiv auffiel (Abbildung 24, 27). In diesem Teil des Thalamus bilden die retinalen Axone den größten Teil ihrer diencephalen Verschaltungen aus (Watson, 2011). Desweiteren wurde an E14 eine leicht, später deutlich erhöhte CALEB/NGC-Expression in der lateralen Habenula des Epithalamus beobachtet (Abbildung 7, 26). Sie erhält Afferenzen aus den Basalganglien und dem limbischen System und spielt eine Rolle in der Kontrolle von kognitivem und motorischem Verhalten, basierend auf dem Belohnungssystem (Hikosaka et al., 2008).

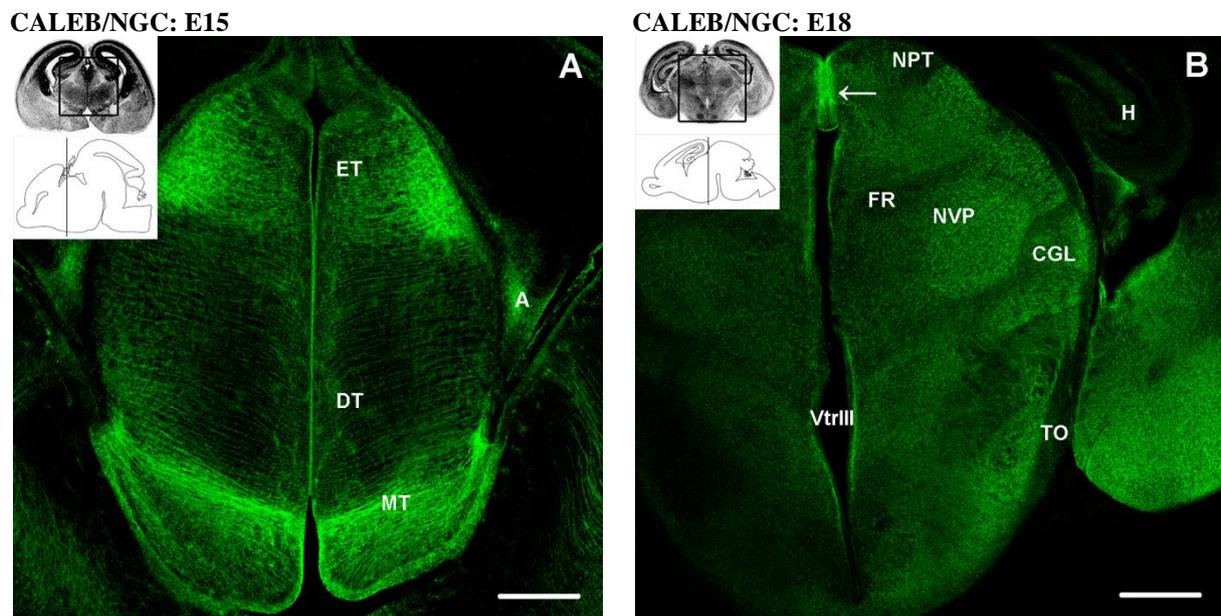


Abbildung 27: CALEB/NGC im Diencephalon an E15 und an E18. Coronare Schnittebene. Kofokale Mehrschichtaufnahmen. Es wird eine Veränderung des Expressionsmusters von CALEB/NGC (*Rb-anti-MBP-mCALExtra*; (A) 1 µg/ml; (B) 2 µg/ml) deutlich. Das Fluoreszenzmuster wandelt sich von einer radialen Streifung an E15 (A) zugunsten eines komplexeren Musters an E18 (B) mit einer Mehrexpression in den thalamischen Kernen. Der Pfeil in (B) zeigt auf den medialen Kreuzungsbereich der Commissura posterior. A, Alveus; CGL, Corpus geniculatum laterale thalami; DT, dorsaler Thalamus; ET, Epithalamus; FR, Fasciculus retroflexus; H, Hippocampus; MT, mamillothalamischer Trakt; NPT, Ncl. praetectalis; NVP, Nucleus ventralis posterior thalami; TO, Tractus opticus. Balken: 200 µm (A); 400 µm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

In den langen radialen CALEB/NGC-positiven Neuriten fand wie im Telencephalon eine Koexpression mit Nestin statt. Diese Koexpression wurde jedoch mit dem Wandel zu einem verzweigteren Expressionsmuster weniger deutlich. Mit Tau-1 und Doublecortin wurde CALEB/NGC im Diencephalon kaum koexprimiert (Abbildung 6, 7).

Um den dritten Ventrikel herum erschien die CALEB/NGC-Fluoreszenz bereits an E14 etwas kräftiger (Abbildung 27). Dieses Phänomen schien durch eine verstärkte Verzweigung der immunpositiven radial ausgerichteten Strukturen an dieser Stelle hervorgerufen zu werden. Ab E16 entstand eine schmale, sehr kernreiche Ventrikularzone, die an ihrer äußeren und

inneren Begrenzung eine gesteigerte CALEB/NGC-Expression aufwies – wie zu späteren Entwicklungszeitpunkten in gleicher Art um die Seitenventrikel und das Aquädukt (Abbildung 7).

Vergleichbar mit den Strukturen im Telencephalon stellten sich auch im Diencephalon zahlreiche Axontrakte ab E14 als Regionen mit fehlender oder sehr geringer CALEB/NGC-Expression dar, so etwa der Fasciculus retroflexus, der Tractus mamillo-tegmentalis, der Tractus opticus, die Commissura anterior und der Fornix (Abbildung 8, 27). Umso eindrucksvoller war eine erhöhte CALEB/NGC-Expression dorsal und ventral um den Fornix herum (Abbildung 8).

Eine auffällig CALEB/NGC-reiche Region war ab E14 der paarig angelegte Ncl. suprachiasmaticus, welcher sich in der medialen Region zwischen dem Chiasma opticum und dem III. Ventrikel befindet (Abbildung 32). Dieser Kern erhält ebenfalls Afferenzen aus der Retina und ist für die Kontrolle des zirkadianen Rhythmus verantwortlich (Birbaumer und Schmidt, 2006).

3.2.5 Retina

Die Retina gehört zu den Regionen, die schon früh eine sehr starke CALEB/NGC-Expression aufwiesen. Ab E14 erstreckten sich radial orientierte CALEB/NGC-positive Neuriten über die gesamte Retinadicke. In der Ganglienzellschicht waren diese radialen Fasern verstärkt immunpositiv. Auch in der Optikusfaserschicht, die direkt an den Glaskörper angrenzt, war die CALEB/NGC-Expression erhöht. Auffällig war überdies schon an E14 ein stärkeres punktuell CALEB/NGC-Vorkommen um das Pigmentepithel herum (Abbildung 28).

Im Laufe der weiteren Entwicklung wurde die CALEB/NGC-Expression in der Ganglienzellschicht ab E17 immer stärker (Abbildung 29). Parallel dazu manifestierte sich eine intensive Expression in der entstehenden inneren plexiformen Schicht (IPS, Stratum plexiforme internum). Sie beherbergt die Dendriten der Ganglienzellen, mittels derer sie Synapsen mit den bipolaren und den amakrinen Zellen bilden (Lynch und Corbett, 2012). Im Laufe der Embryonalphase nahm die Expression im SPI stark an Intensität zu, so dass es an P1 die Region mit dem intensivsten CALEB/NGC-Vorkommen in der Retina war (Abbildung 30, 49). Die radialen immunpositiven Neuriten stellten sich ab E17 weniger intensiv dar, waren aber auch perinatal noch vorhanden.

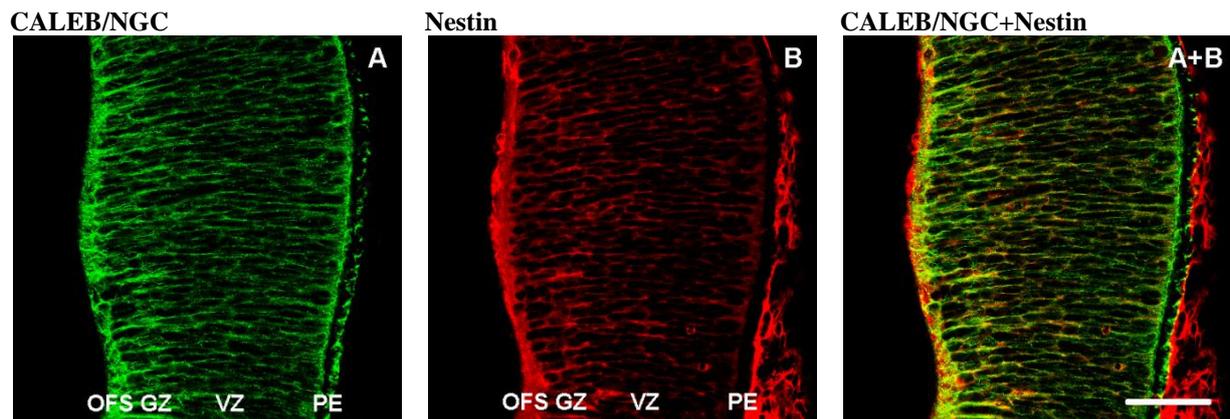


Abbildung 28: CALEB/NGC und Nestin in der Retina an E14. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) wird in radial orientierten, dünnen Fasern exprimiert, die die gesamte Retinadicke überspannen. Ein besonders hohes CALEB/NGC-Vorkommen weist die Optikusfaserschicht (OFS) auf. Auffällig ist auch eine intensive Expression im retinalen Pigmentepithel (PE). In der Ganglienzellschicht (GZ) deutet sich bereits eine stärkere CALEB/NGC-Expression an als in der Ventrikularzone (VZ). Die Kofärbung mit Nestin (B; *M-anti-Nestin*; 2 µg/ml) macht deutlich, dass die Proteine in der Retina koexprimiert werden. Balken: 50 µm.

Eine deutliche Koexpression von CALEB/NGC und Doublecortin sowie Nestin zeigte sich in der Retina insbesondere in der inneren plexiformen Schicht und in der Optikusfaserschicht (Abbildung 28, 29). Die CALEB/NGC-positiven radialen Strukturen in der retinalen Ventrikularzone wiesen zudem eine deutliche Koexpression mit Nestin auf (Abbildung 28). Insgesamt deuten diese Koexpressionen auf eine CALEB/NGC-Expression in neuronalen (migrierenden) Vorläuferzellen in der Retina hin. Ein Vorkommen in den Calbindin- und DCX-exprimierenden Horizontalzellen, die ab E17 als radial ausgerichtete immunpositive Zellen in der Ventrikularzone sichtbar wurden, ist aufgrund einer Koexpression ebenfalls wahrscheinlich (Abbildung 29).

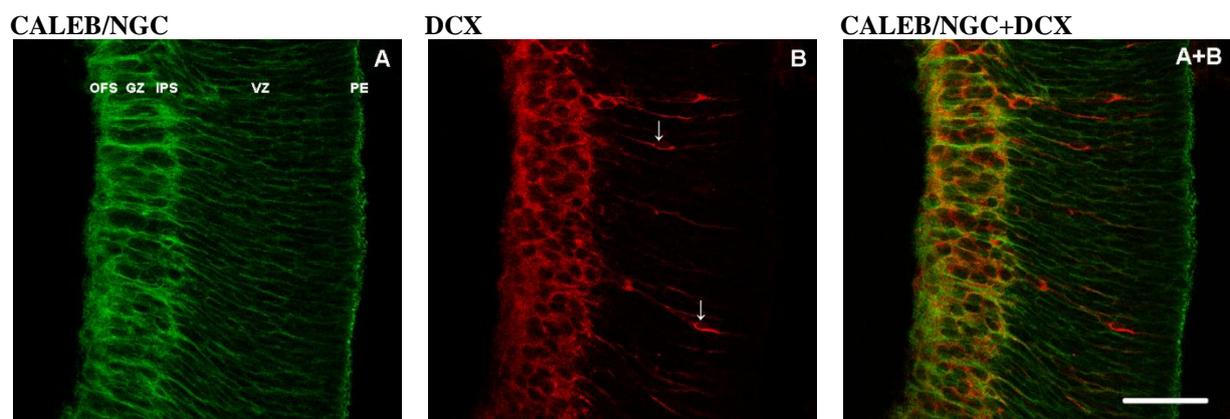


Abbildung 29: CALEB/NGC und Doublecortin in der Retina an E17. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Ab E17 wird eine Mehrexpression an CALEB/NGC (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 1 µg/ml) in der sich ausbildenden inneren plexiformen Schicht (IPS) deutlich. Die immunpositiven radialen Fasern sind nach wie vor vorhanden und auch die starke Expression in der Ganglienzellschicht (GZ) ist deutlich. Eine Koexpression mit Doublecortin (B; *GP-anti-Doublecortin*; 1:2000) besteht insbesondere in der Optikusfaserschicht (OFS) und in der IPS. In der GZ weist CALEB/NGC im Vergleich zu DCX ein etwas abweichendes eher radiales Expressionsmuster auf. Überdies wird DCX besonders intensiv in den sich differenzierenden Horizontalzellen (Pfeile) exprimiert, welche auch CALEB/NGC-positiv erscheinen. PE, Pigmentepithel; VZ, Ventrikularzone. Balken: 50 µm.

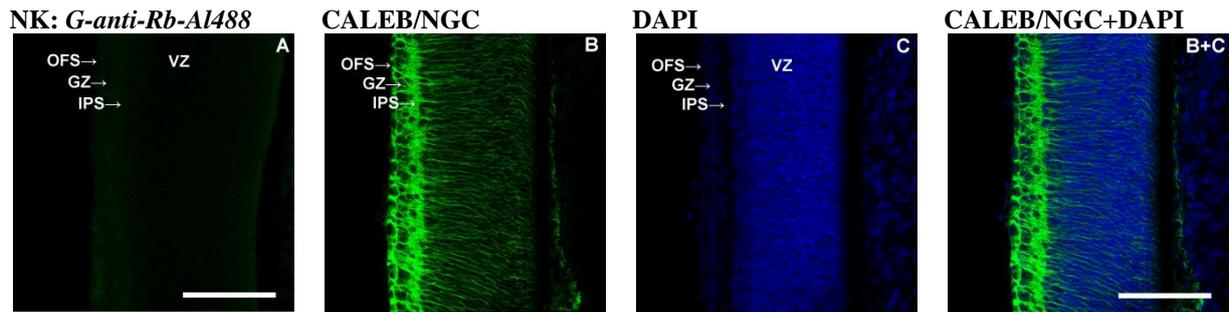


Abbildung 30: CALEB/NGC und DAPI im Auge an P1. Perfundiert. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. An P1 stellt die innere plexiforme Schicht (IPS) die Region mit der intensivsten CALEB/NGC-Expression (B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 $\mu\text{g/ml}$) dar. Die Kofärbung mit dem Zellkernmarker DAPI (C; 1:5000) verdeutlicht, dass das CALEB/NGC-Vorkommen in zellarmen Regionen besonders hoch ist. GZ, Ganglienzellschicht; OFS, Optikusfaserschicht; NK, Negativkontrolle (A; *Goat anti rabbit-Al488*; 1:1000); VZ, Ventrikularzone. Balken: 100 μm .

An E14 war die CALEB/NGC-Expression im Bereich der retinalen Axone im N. opticus insgesamt schwach (Abbildung 31). Indessen zeigte sich im weiteren Verlauf des Nervus opticus vor allem im medialen Bereich des Chiasma opticum eine überaus markante CALEB/NGC-Expression (Abbildung 32, 33). Hier treffen ab E13 die ersten retinalen Axone ein (Godement et al., 1990).

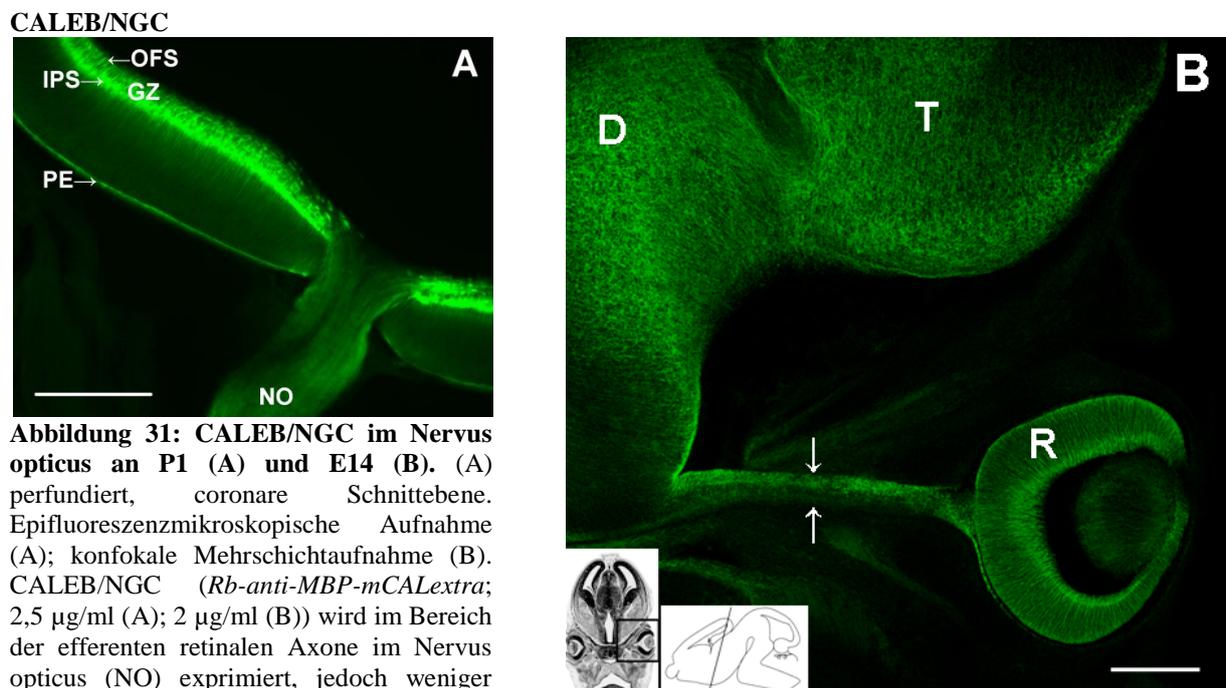
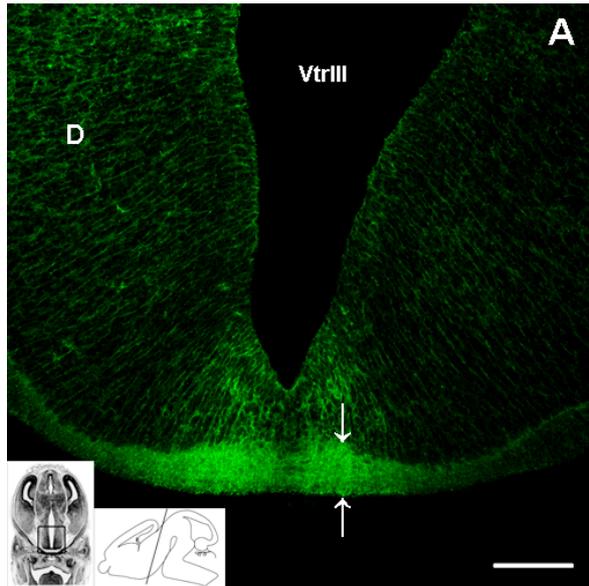


Abbildung 31: CALEB/NGC im Nervus opticus an P1 (A) und E14 (B). (A) perfundiert, coronare Schnittebene. Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme (A); konfokale Mehrschichtaufnahme (B). CALEB/NGC (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (A); 2 $\mu\text{g/ml}$ (B)) wird im Bereich der efferenten retinalen Axone im Nervus opticus (NO) exprimiert, jedoch weniger stark als in der Optikusfaserschicht (OFS).

Zwischen den Pfeilen ist der Augenstiel dargestellt. D, Diencephalon; GZ, Ganglienzellschicht; IPS, innere plexiforme Schicht; PE, Pigmentepithel; R, Retina; T, Telencephalon. Balken: 100 μm (A); 200 μm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

CALEB/NGC: E14



CALEB/NGC: E16

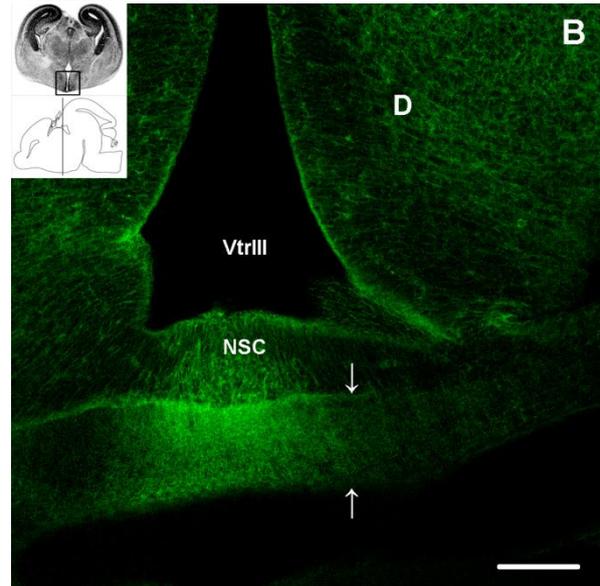
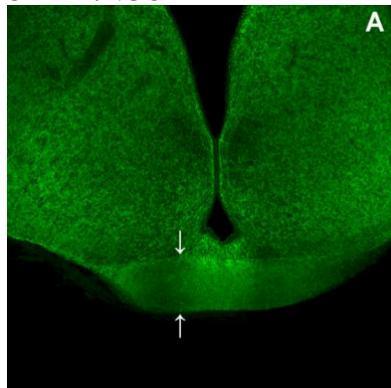
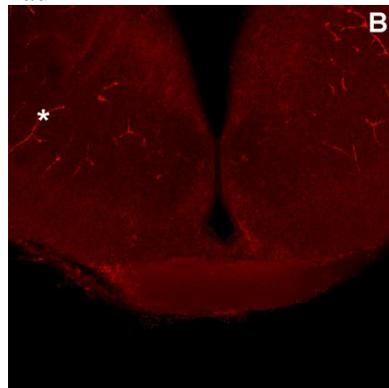


Abbildung 32: CALEB/NGC im Chiasma opticum an E14 und E16. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. In der medialen Region des Chiasma opticum (Pfeile umgeben das Chiasma) findet sich eine deutliche CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 1 µg/ml), hier beispielhaft an E14 (A) und an E16 (B). Der Nucleus suprachiasmaticus (NSC), welcher auch Afferenzen aus der Retina erhält, weist im Vergleich zur Umgebung eine höhere CALEB/NGC-Expression auf. Im Diencephalon (D) deutet sich an E16 die zunehmende Verzweigung der CALEB/NGC-positiven Neuriten an. VtrIII, III. Ventrikel. Balken: 200 µm (A); 100 µm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

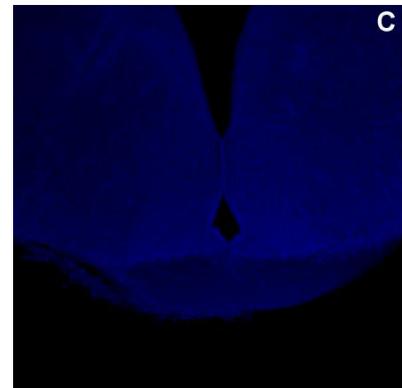
CALEB/NGC



Tau-1



DAPI



CALEB/NGC+Tau-1+DAPI

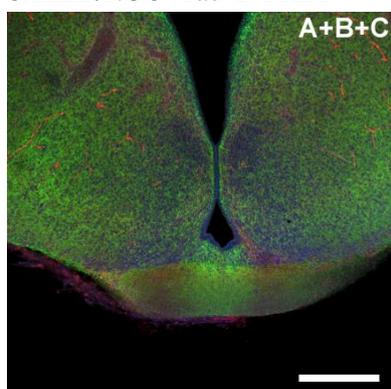


Abbildung 33: CALEB/NGC, Tau-1 und DAPI im Chiasma opticum an E17. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Das Chiasma opticum (zwischen den Pfeilen) befindet sich in der kernarmen Zone (C; DAPI; 1:5000). Das Tau-1-Vorkommen (B; *M-anti-Tau-1*; 1 µg/ml) bestätigt dort die Existenz von Axonen, welche insbesondere in der Kreuzungsregion eine starke CALEB/NGC-Expression (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) aufweisen. Das Sternchen deutet auf immunpositive Blutgefäße. Balken: 250 µm.

3.2.3 Mesencephalon

Das Mesencephalon beherbergt die Regionen des Gehirns mit der intensivsten CALEB/NGC-Expression. Schon an E14 wurde CALEB/NGC besonders stark in der Medianebene des dorsalen Mesencephalons exprimiert. Am deutlichsten zeigte sich dieses regionale Expressionsmuster in der Commissura posterior, hier speziell im kernarmen Bereich dorsal des Subcomissuralorgans (Abbildung 37). Diese überaus starke CALEB/NGC-Expression hatte in allen untersuchten Altersstufen Bestand (Abbildung 34, 36).

Gleichfalls war der mediane Bereich der sich caudal anschließenden Colliculi superior et inferior ab E14 zunehmend CALEB/NGC-positiv (Abbildung 38, 39, 40). Es fiel jedoch auf, dass auch hier die Expression über die Mittellinie hinweg nicht gleichmäßig stark war, sondern über der Deckplatte des Colliculus superior fehlte (Abbildung 39, 40).

CALEB/NGC

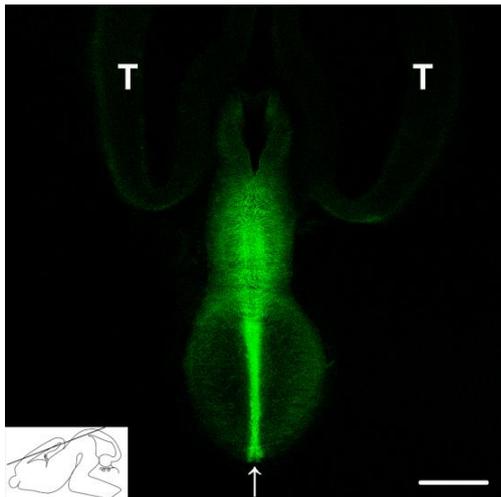


Abbildung 34: CALEB/NGC in der Commissura posterior an E14. Horizontale Schnitt Ebene. Konfokale Mehrschichtaufnahme. Die Mittellinie (Pfeil), in der die Axone der Commissura posterior kreuzen, besitzt eine überaus hohe CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml). T, Telencephalon. Balken: 400 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

CALEB/NGC

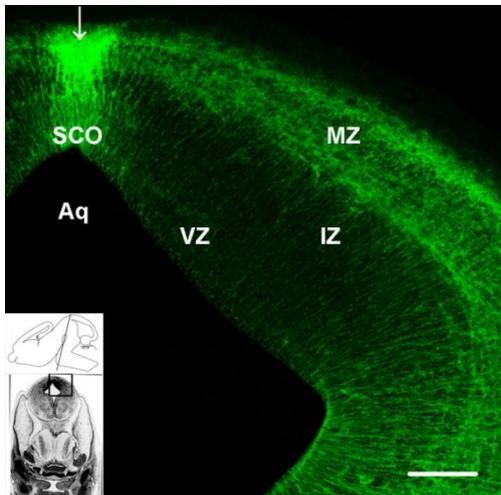


Abbildung 35: CALEB/NGC im Colliculus superior an E14. Coronare Schnitt Ebene. Konfokale Mehrschichtaufnahme. In der Medianebene (Pfeil) und somit der Kreuzungsregion der caudalen Commissura posterior (CP) erfolgt eine äußerst intensive CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml). Das Subcommissuralorgan (SCO) stellt sich als etwas weniger immunpositive Region zwischen CP und Aquädukt dar. Zwischen dem Aquädukt (Aq) und der Pia mater befinden sich im Colliculus superior (CS) radiale CALEB/NGC-positive Neuriten. In der Marginalzone (MZ) des CS bestehen zudem tangential ausgerichtete, CALEB/NGC-exprimierende Neuriten oder Verzweigungen. IZ, Intermediärzone des CS; VZ, Ventrrikularzone des CS. Balken: 100 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

CALEB/NGC

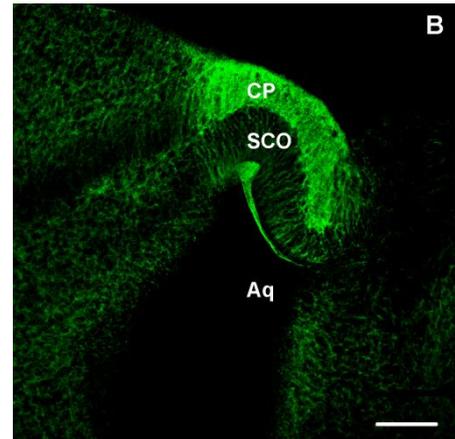
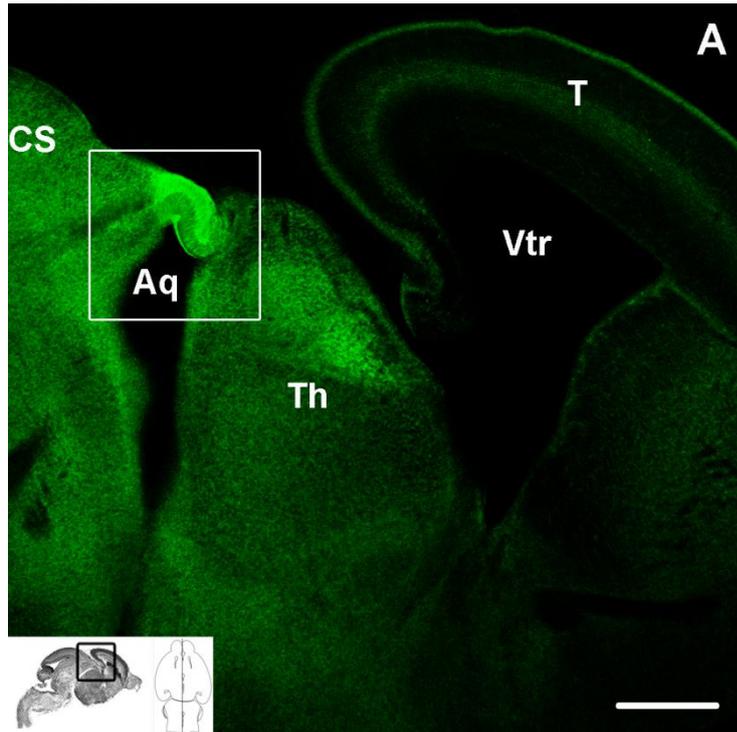
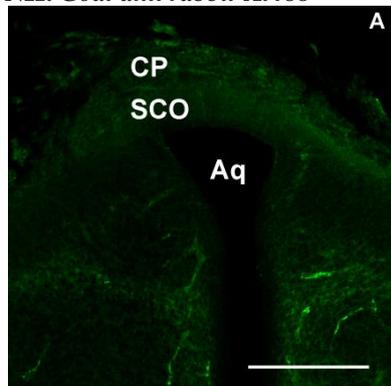


Abbildung 36: CALEB/NGC in der Medianebene der Commissura posterior an E18. Sagittale Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Auch an E18 ist eine starke CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) in der Commissura posterior (CP) deutlich. Sichtbar sind auch die thalamischen Kerne (Th) als kräftig CALEB/NGC-

exprimierende Strukturen. Aq, Aquaeductus mesencephali; CS, Colliculus superior; SCO, Subcommissuralorgan; T, Telencephalon; Vtr, Seitenventrikel. Balken: 400 µm (A); 100 µm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992 (rechts) und Allen Developing Mouse Brain Atlas (Stand: 31.03.2012) (links).

NK: Goat anti rabbit-A1488



CALEB/NGC

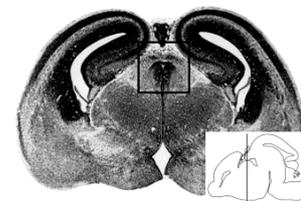
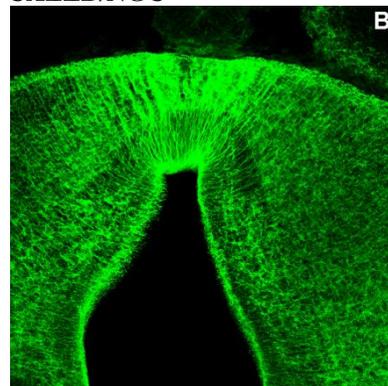
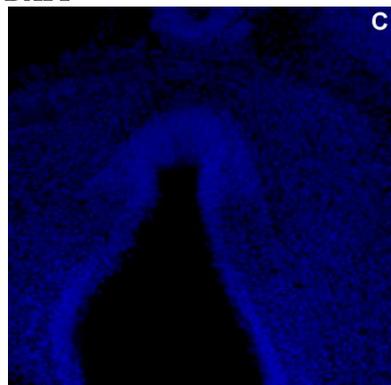
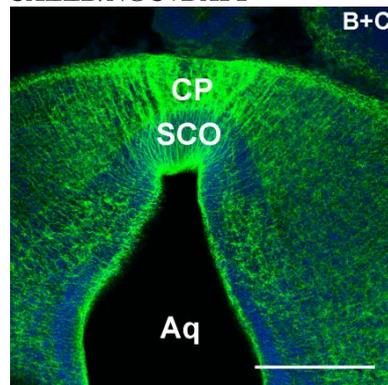


Abbildung 37: CALEB/NGC und DAPI der Commissura posterior an E16. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Im Vergleich zur Kernfärbung mittels

DAPI



CALEB/NGC+DAPI



DAPI (C; 1:5000) wird deutlich, dass CALEB/NGC (B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) in der kernarmen Schicht dorsal des Subcommissuralorgans (SCO) exprimiert wird, also in der Kreuzungsregion der Axone der Commissura posterior. Aq, Aquaeductus mesencephali; NK, Negativkontrolle (A; *Goat anti rabbit-A1488*, 1:1000). Balken: 200 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Es ist bekannt, dass Nestin in Mittellinienregionen des Gehirns ein Marker für die sogenannten Mittellinien-Raphe-Gliazellen ist, die an der Selektion der die Mittellinie kreuzenden Axone beteiligt sind (Jhaveri, 1993). Passend zeigte sich eine deutliche Nestin-Fluoreszenz in den Mittellinienregionen, welche mit der CALEB/NGC-Fluoreszenz zusammenfiel. Diese Koexpression deutet somit auf eine mögliche Expression von CALEB/NGC nicht nur in Neuronen sondern auch in Gliazellen hin (Abbildung 42).

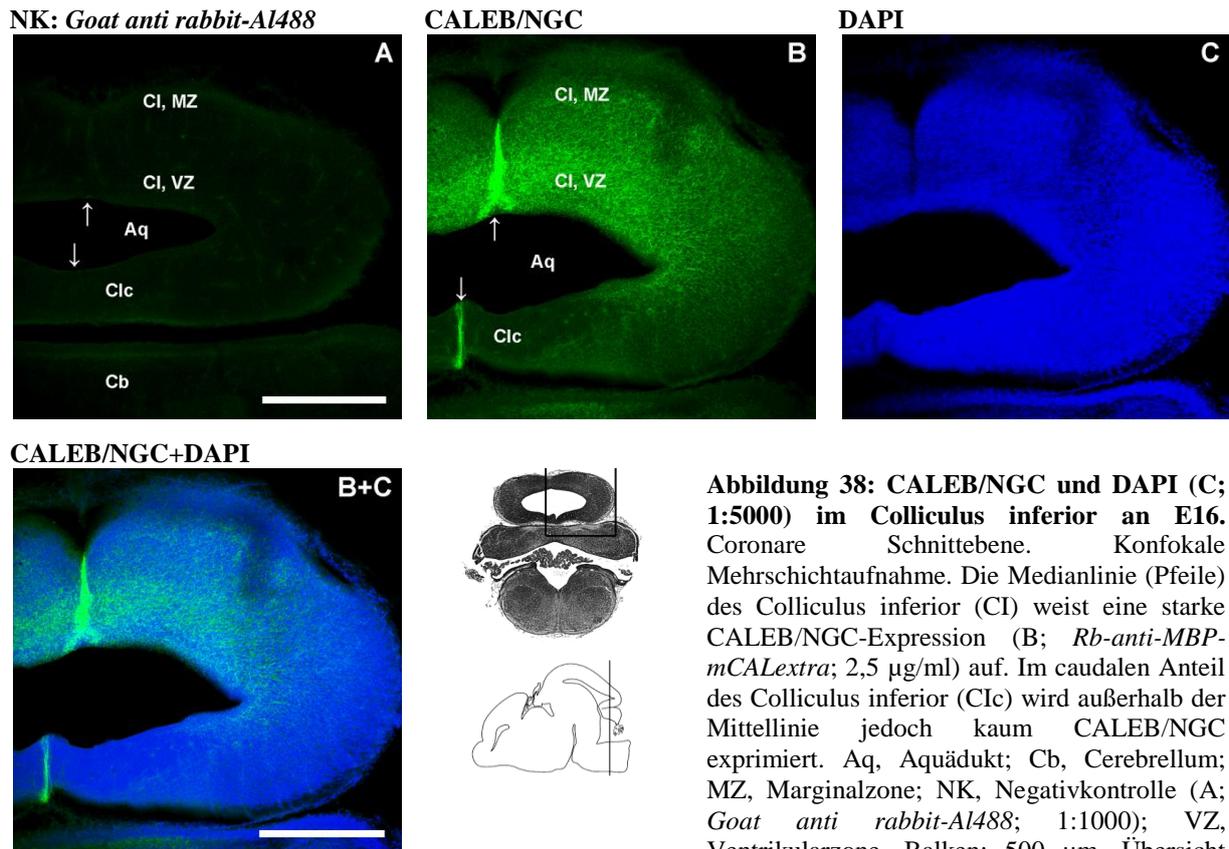


Abbildung 38: CALEB/NGC und DAPI (C; 1:5000) im Colliculus inferior an E16. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahme. Die Medianlinie (Pfeile) des Colliculus inferior (CI) weist eine starke CALEB/NGC-Expression (B; *Rb-anti-MBP-mCALExtra*; 2,5 µg/ml) auf. Im caudalen Anteil des Colliculus inferior (Clc) wird außerhalb der Mittellinie jedoch kaum CALEB/NGC exprimiert. Aq, Aquädukt; Cb, Cerebellum; MZ, Marginalzone; NK, Negativkontrolle (A; *Goat anti rabbit-Al488*; 1:1000); VZ, Ventrikularzone. Balken: 500 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992 (unten) und Rosen et al., 2000 (oben).

Im Gegensatz zum dorsalen Mesencephalon mit den Colliculi inferiores et superiores konnte im ventralen Mesencephalon zu keinem der untersuchten Entwicklungszeitpunkte eine intensive Mittellinienexpression beobachtet werden (Abbildung 39). Ab E14 präsentierte sich in dieser Region eine zu radial orientierten Strängen gruppierte CALEB/NGC-Expression mit geringen ab E15 zunehmenden hierzu orthogonalen Strängen.

Um das Aquädukt entstand ab E16 eine zunehmend zellreiche Ventrikularzone – die zentrale graue Substanz (Abbildung 40). Analog der Ventrikel I-III reicherte sich CALEB/NGC vor allem am äußeren aber auch am inneren Rand dieser Zone an.

CALEB/NGC

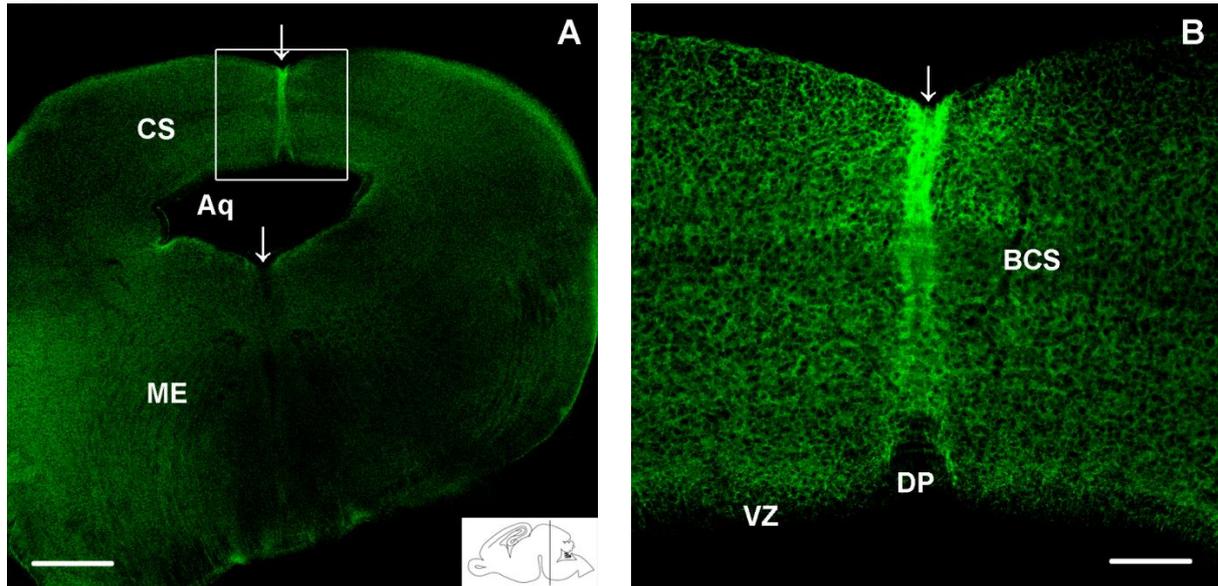


Abbildung 39: CALEB/NGC im ventralen und dorsalen Mesencephalon (A) und im Colliculus superior (B) an P1. Perfundiert, coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Im ventralen Mesencephalon (ME) existiert im Gegensatz zum dorsalen Mesencephalon (Colliculus superior, CS) keine Mittellinienexpression (Pfeile) von CALEB/NGC (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml). Im Bereich des Brachium des Colliculus superior (BCS) ist die intensive Expression in der Mittellinie leicht vermindert, in der Region der Deckplatte (DP) des CS erscheint sie nach lateral verdrängt. Aq, Aquaeductus mesencephali; VZ, Ventrikularzone. Balken: 400 µm (A); 100 µm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Außerhalb der Medianebene des Colliculus superior bestand das Expressionsmuster an E14 aus immunpositiven, radial zwischen Pia mater und Aquädukt ausgerichteten Strängen (Abbildung 35). In der Marginalzone wurde dieses Expressionsmuster ab E14 zunehmend durch parallel zur Pia mater verlaufende CALEB/NGC-positive Stränge ergänzt. In den folgenden Tagen weitete sich dieses retikulär anmutende CALEB/NGC-Expressionsmuster von der Marginalzone auf die Intermediär- und Ventrikularzone aus, so dass es ab E16 alle Schichten des Colliculus superior umfasste, mit einer etwas stärkeren Expression in den zellärmeren Zonen (Abbildung 39, 40).

Ein vom Colliculus superior abweichendes Expressionsverhalten zeigte CALEB/NGC im Colliculus inferior. In dieser Region wurde in den frühen untersuchten Entwicklungsstufen bis auf die starke Mittellinienexpression kaum CALEB/NGC exprimiert (Abbildung 38). Erst zwischen E18 und P1 breitete sich ein verzweigtes Expressionsmuster wie im Colliculus superior, einem rostral nach caudalen Gradienten folgend, zunehmend auf den Colliculus inferior aus.

CALEB/NGC

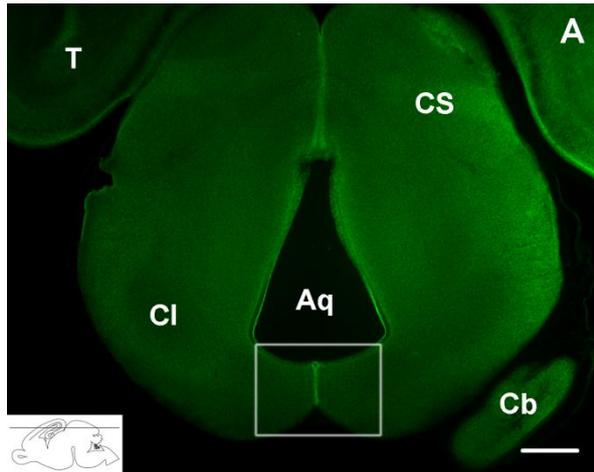
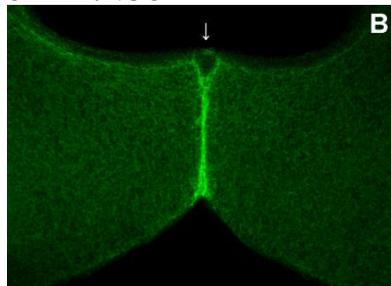


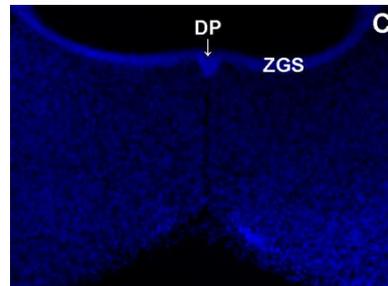
Abbildung 40: CALEB/NGC und DAPI im Colliculus inferior an P1. Perfundiert, horizontale Schnittebene. Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. An P1 weist fast der gesamte Colliculus inferior eine CALEB/NGC-Expression (A, B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) auf.

Am intensivsten wird CALEB/NGC in der Mittellinie (Pfeil) des Colliculus inferior (CI) et superior (CS) exprimiert. In der Vergrößerung (B, C) macht die DAPI-Färbung (C; 1:5000) die kernreiche Deckplatte (DP) und zentrale graue Substanz (ZGS) sichtbar. Die zentrale graue Substanz wird nach innen zum Aquädukt (Aq) hin sowie nach außen von einer verstärkten CALEB/NGC-Expression umgeben. Cb, Cerebellum; T, Telencephalon. Balken: 400 µm (A); 100 µm (B, C). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

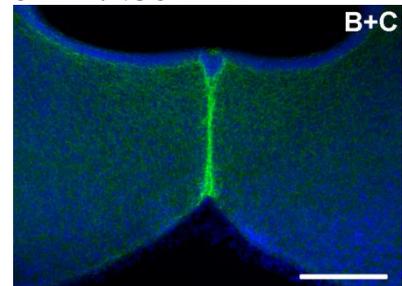
CALEB/NGC



DAPI



CALEB/NGC+DAPI



3.2.4 Rhombencephalon: Pons, Medulla oblongata, Cerebellum

In Analogie zum Expressionsmuster von CALEB/NGC im dorsalen Mesencephalon wiesen auch die sich caudal anschließenden Gehirnabschnitte ein hohes Vorkommen des Proteins in der Mittellinienregion auf. Vom Pons über die Medulla oblongata bis ins Rückenmark konzentrierte sich die Expression bereits an E14 in den lateralen Anteilen der Nestin-positiven Raphe-Gliazellen, während sich jedoch unmittelbar median eine CALEB/NGC-freie Region befand (Abbildung 41, 42, 43). Mit fortschreitender Gehirnentwicklung begann die Expression in den Mittellinien-Raphe-Gliazellen allmählich zu schwinden und zeigte sich an E16 nur noch in dorsalen und ventralen Bereichen des Pons und ab E17 schließlich nur noch an die ventrale Pia mater angrenzend in Form eines immunpositiven Keils (Abbildung 41). Auch in der Medulla oblongata verlor die Expression in der dorsalen Mittellinienregion ab E14 an Intensität (Abbildung 43).

CALEB/NGC

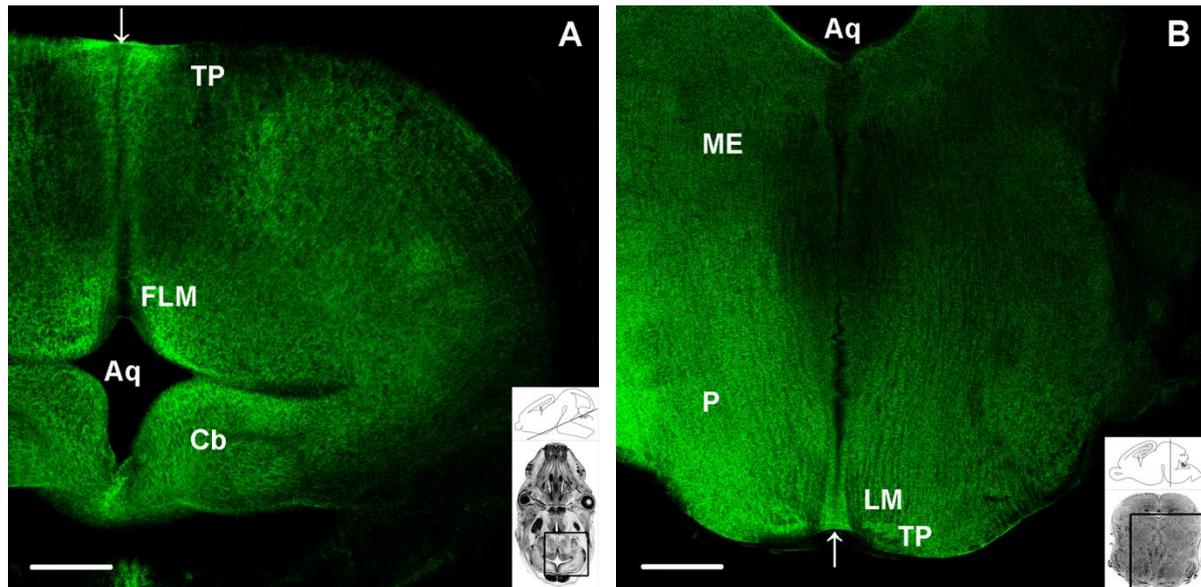
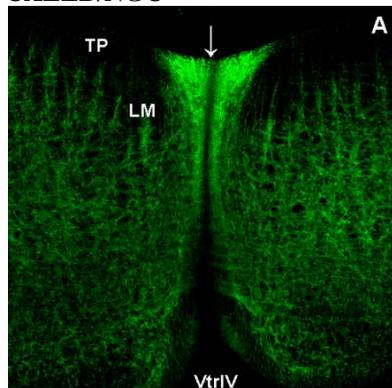
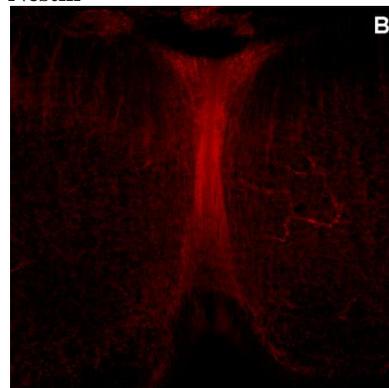


Abbildung 41: CALEB/NGC im Pons an E15 und an E18. Horizontale Schnittebene (A), coronare Schnittebene (B). Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Im Pons (P) erstreckt sich an E15 (A) eine Mehransammlung von CALEB/NGC (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (A); 2 $\mu\text{g/ml}$ (B)) in den lateralen Anteilen der Mittellinienregion (Pfeile auf Medianebene) von der Pia mater bis zum Aquädukt (Aquaeductus mesencephali, Aq). An E18 (B) ist die unmittelbare Mittellinie als CALEB/NGC-negative Region besonders deutlich. CALEB/NGC wird in der lateralen Mittellinienregion nur noch im ventralen Anteil des Pons intensiv exprimiert. Cb, Cerebellum; FLM, Fasciculus longitudinalis medialis; LM, Lemniscus medialis; ME, ventrales Mesencephalon; TP, Tractus pyramidalis. Balken: 200 μm (A); 400 μm (B). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

CALEB/NGC



Nestin



CALEB/NGC+Nestin

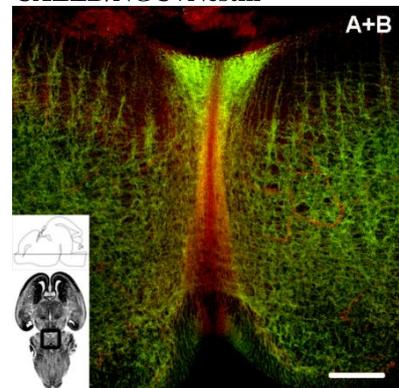


Abbildung 42: CALEB/NGC und Nestin in der Mittellinie des Pons an E15. Horizontale Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die CALEB/NGC-Expression (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 $\mu\text{g/ml}$) stellt sich in den lateralen Anteilen der Mittellinie (Pfeil) mit Betonung des dorsalen Bereichs dar. Es zeigt sich eine Koexpression mit Nestin (B; *M-anti-Nestin*; 2 $\mu\text{g/ml}$), welches in Mittellinienregionen von den sogenannten Mittellinien-Raphe-Gliazellen exprimiert wird. LM, Lemniscus medialis; TP, Tractus pyramidalis; VtrIV, vierter Ventrikel. Balken: 100 μm . Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Jenseits der Mittellinienregion präsentierte sich die CALEB/NGC-Expression an E14 in Pons und Medulla oblongata in Form eines Musters aus radialen, leicht verzweigten Fluoreszenzsträngen, in denen teilweise eine Koexpression mit Nestin vorlag. Dieses Expressionsmuster erstreckte sich bis ins Rückenmark. Die kernarme Marginalzone, in der sich die kortikofugalen Fasern der Pyramidenbahn befinden, wies stets weniger

CALEB/NGC-Fluoreszenzsignal auf. In dieser Region zeigten sich weniger orthogonal hierzu angeordnete Fluoreszenzstreifen. Umso mehr stach hier die oben beschriebene, starke Mittellinienexpression zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten hervor. Ab E14 nahm analog zu den übrigen Gehirnregionen auch im Pons und der Medulla oblongata der scheinbare Verzweigungsgrad der CALEB/NGC-positiven Strukturen zu und damit auch die Gesamtmenge an exprimiertem Protein (Abbildung 43).

CALEB/NGC

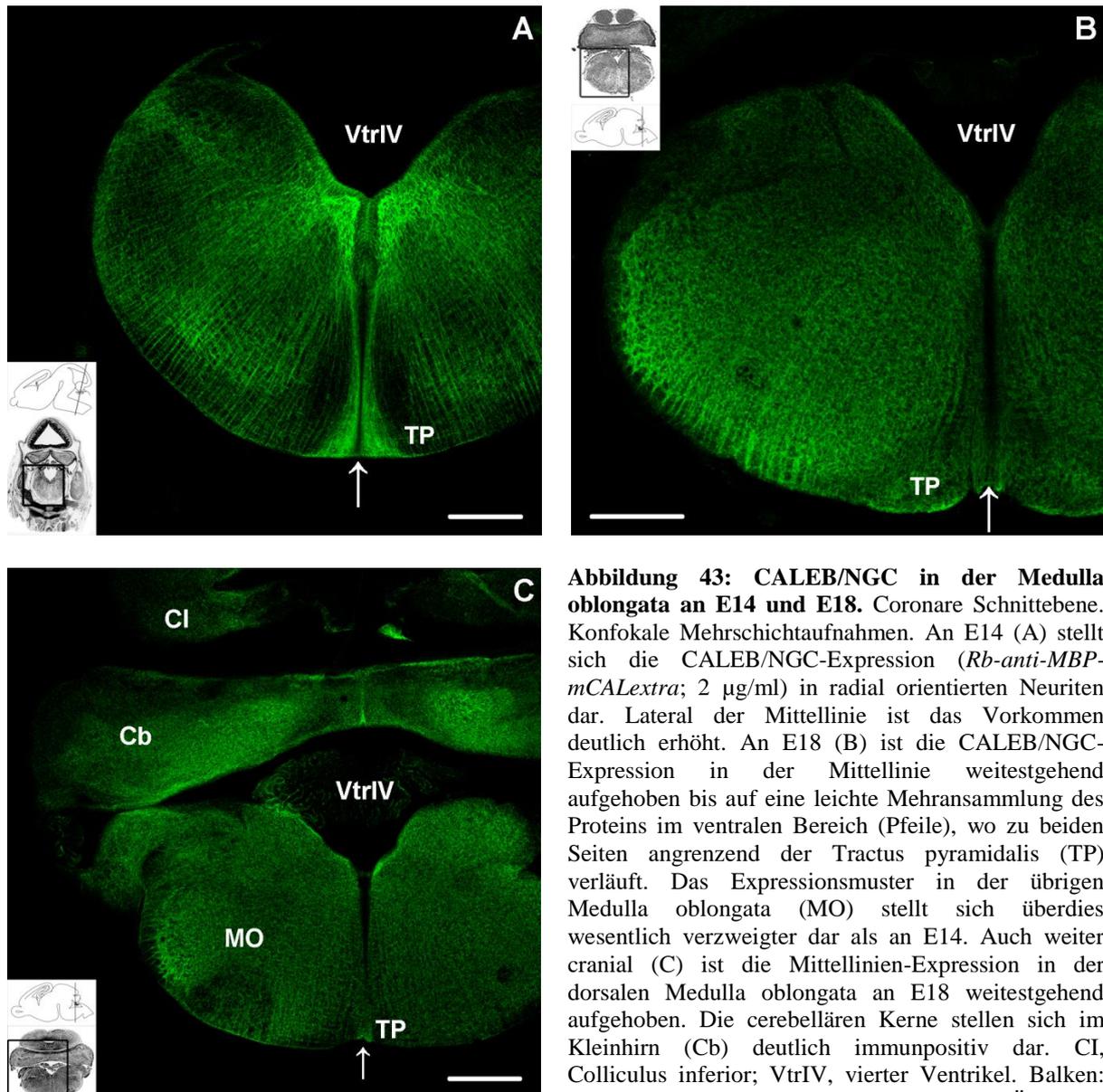


Abbildung 43: CALEB/NGC in der Medulla oblongata an E14 und E18. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. An E14 (A) stellt sich die CALEB/NGC-Expression (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2 µg/ml) in radial orientierten Neuriten dar. Lateral der Mittellinie ist das Vorkommen deutlich erhöht. An E18 (B) ist die CALEB/NGC-Expression in der Mittellinie weitestgehend aufgehoben bis auf eine leichte Mehransammlung des Proteins im ventralen Bereich (Pfeile), wo zu beiden Seiten angrenzend der Tractus pyramidalis (TP) verläuft. Das Expressionsmuster in der übrigen Medulla oblongata (MO) stellt sich überdies wesentlich verzweigter dar als an E14. Auch weiter cranial (C) ist die Mittellinien-Expression in der dorsalen Medulla oblongata an E18 weitestgehend aufgehoben. Die cerebellären Kerne stellen sich im Kleinhirn (Cb) deutlich immunpositiv dar. CI, Colliculus inferior; VtrIV, vierter Ventrikel. Balken: 200 µm (A); 300 µm (B); 400 µm (C). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

CALEB/NGC

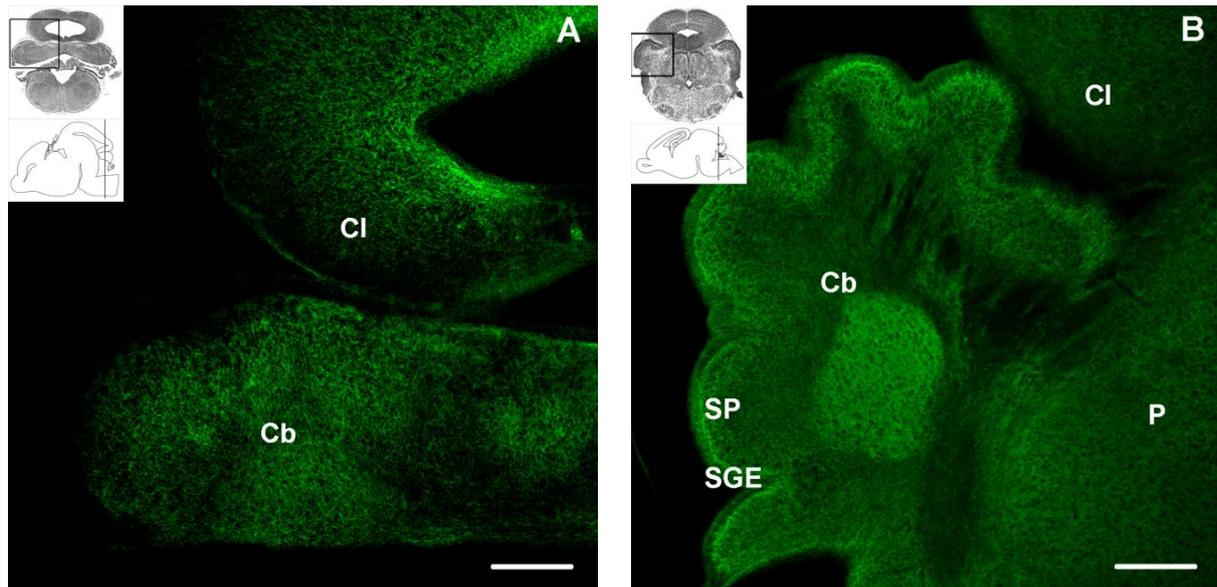


Abbildung 44: CALEB/NGC im Cerebellum an E16 und an P1. P1 perfundiert, coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Im Vergleich zu E16 (A) stellen sich die Kleinhirnerne an P1 (B) deutlich CALEB/NGC-positiv (*Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) dar. An P1 heben sich die Schichten des Kleinhirns (Cb, Cerebellum) ab und es besteht eine starke Expression in der Purkinjezellschicht (SP, Stratum purkinjense). CI, Colliculus inferior; P, Pons; SGE, Stratum granulosum externum. Balken: 200 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Das Cerebellum wies an E14/15 eine insgesamt sehr geringe CALEB/NGC-Expression auf, die sich als lichtetes radiales Expressionsmuster präsentierte. Die Expression nahm ab E14, wie in den übrigen Teilen des Gehirns, an Komplexität im Sinne zunehmender Verzweigungen zu. Ab E16 zeigte sich überdies in den cerebellären Kernen eine erhöhte CALEB/NGC-Expression (Abbildung 44). Die äußere Körnerzellschicht (Stratum granulosum externum) wies an E14 kein CALEB/NGC auf (Abbildung 45). Ab E15 stieg die Expression an der inneren Begrenzung zur Purkinjezellschicht stetig an. Mit der weiteren Migration und Differenzierung der Purkinjezellen ging ab E16 eine markante Expression von CALEB/NGC in ihrer unmittelbaren perizellulären Umgebung einher, in der sich die Dendriten und Axone befinden (Abbildung 44, 45, 46). Die äußere Körnerzellschicht wurde zunehmend von dünnen CALEB/NGC-positiven Strukturen durchzogen (Abbildung 47).

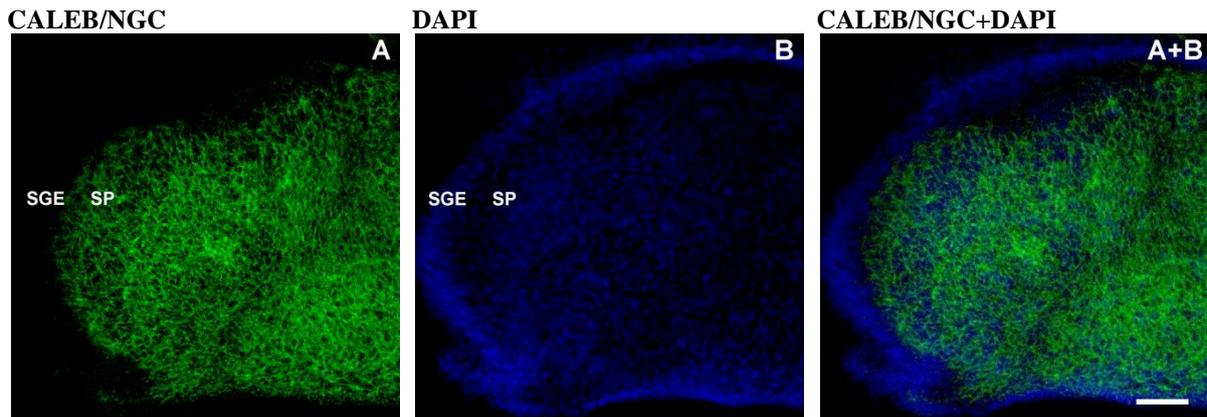


Abbildung 45: CALEB/NGC und DAPI im Cerebellum an E16. Coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die CALEB/NGC-Expression (A; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) ist in einem verzweigten Muster über das Kleinhirn verteilt. Die Kernfärbung mittels DAPI (B; 1:5000) macht deutlich, dass die äußere Körnerschicht (SGE, Stratum granulosum externum) frei von CALEB/NGC-Expression ist. SP, Stratum purkinjense. Balken: 100 µm.

NK: Goat anti rabbit-A1488

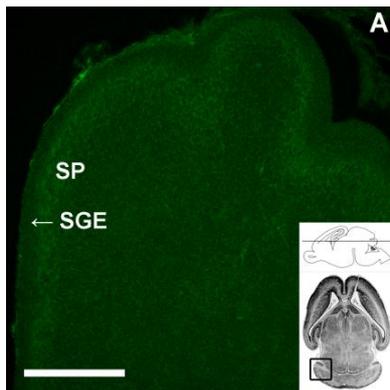
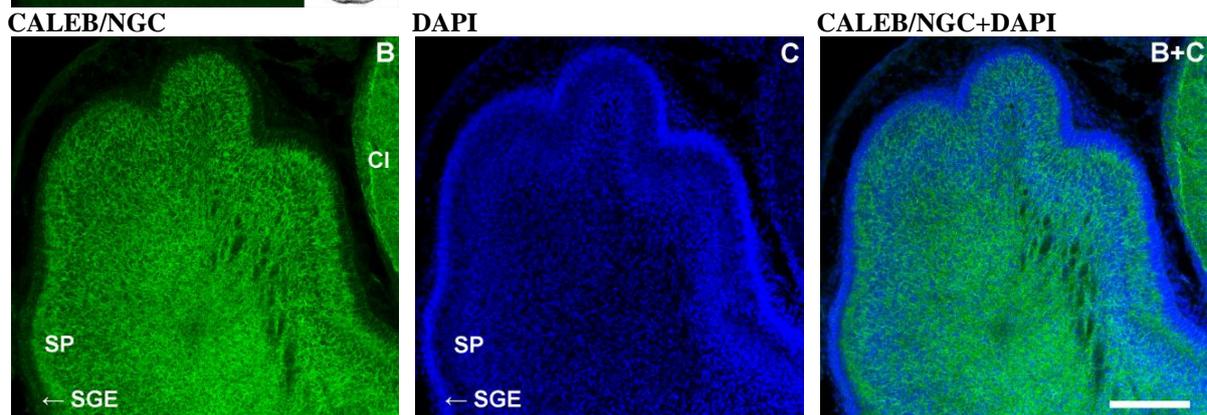


Abbildung 46: CALEB/NGC und DAPI im Cerebellum an P1. Perfundiert, horizontale Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. An P1 ist in der DAPI-Färbung (C; 1:5000) eine differenzierte Schichtung des Cerebellums zu erkennen. Im zellichten Stratum granulosum externum (SGE) wird nur wenig CALEB/NGC (B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) exprimiert. In Regionen mit einer geringeren Zelldichte ist die CALEB/NGC-Expression dagegen sehr hoch, beispielsweise um das Stratum purkinjense (SP). CI, Colliculus inferior; NK, Negativkontrolle (A; *Goat anti rabbit-A1488*; 1:1000). Balken: 200 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.



CALEB/NGC

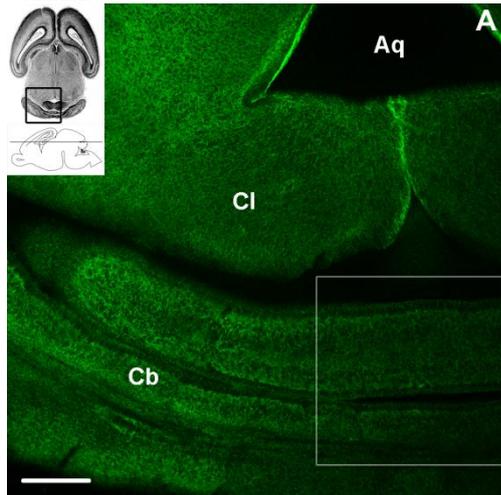
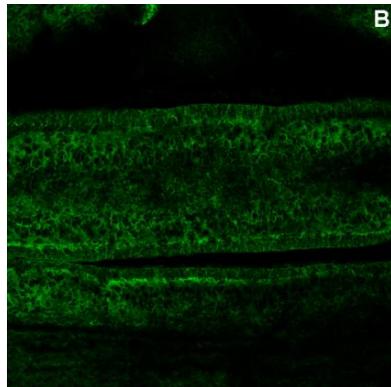
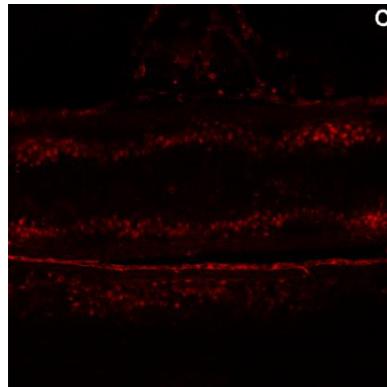


Abbildung 47: CALEB/NGC und Calbindin im Cerebellum an P1. Perfundiert, horizontale Schnittenebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die pericytoplasmatische Umgebung der Calbindin-positiven (C; *M-anti-Calbindin*; 1:5000) Purkinjezellen weist eine deutliche CALEB/NGC-Expression (B; *Rb-anti-MBP-mCALextra*; 2,5 µg/ml) auf. Aq, Aquaeductus mesencephali; Cb, Cerebellum; CI, Colliculus inferior; SGE, Stratum granulosum externum; SGI, Stratum granulosum internum; SP, Stratum purkinjense. Balken: 200 µm (A); 100 µm (B, C). Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

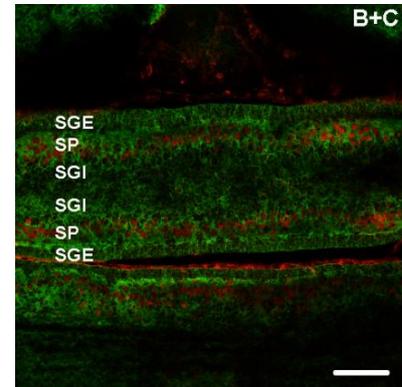
CALEB/NGC



Calbindin



CALEB/NGC+Calbindin



3.3 Immunhistochemie (*Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*)

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen zu verifizieren, die mit dem *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper gegen den extrazellulären Bereich des Proteins erzielt wurden, wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen den intrazellulären CALEB/NGC-Bereich (*Rb-anti-GST-hCALb-cyt*) durchgeführt. Dieser Antikörper war bereits anhand eines Fusionsproteins aus dem an GST gekoppelten, intrazellulären CALEB/NGC-Proteinbereich affinitätsgereinigt worden. Da somit auch Antikörper selektiert wird, der lediglich GST, jedoch kein CALEB/NGC erkennt, wurde zur Spezifitätserhöhung ergänzend eine weitere Affinitätsreinigung durchgeführt. Hierfür wurde das Fusionsprotein aus CALEB/NGC und GST rekombinant in *E. coli*-Kulturen exprimiert, gereinigt, ankonzentriert und anschließend das GST-Tag proteolytisch abgespalten. Der verbleibende CALEB/NGC-Proteinteil wurde nun mittels SDS-PAGE und Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Es folgte die Affinitätsreinigung durch Selektion des spezifisch an CALEB/NGC bindenden *Rb-anti-GST-hCALb-cyt*-Antikörpers. Anschließend wurden vergleichende immunhistochemische Färbungen von exemplarischen

Entwicklungsstadien mit dem *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper und dem *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*-Antikörper vor und nach der weiteren Affinitätsreinigung angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop miteinander verglichen.

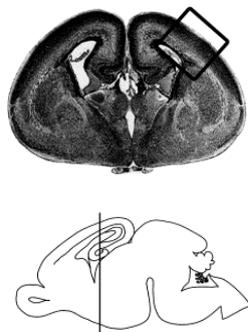
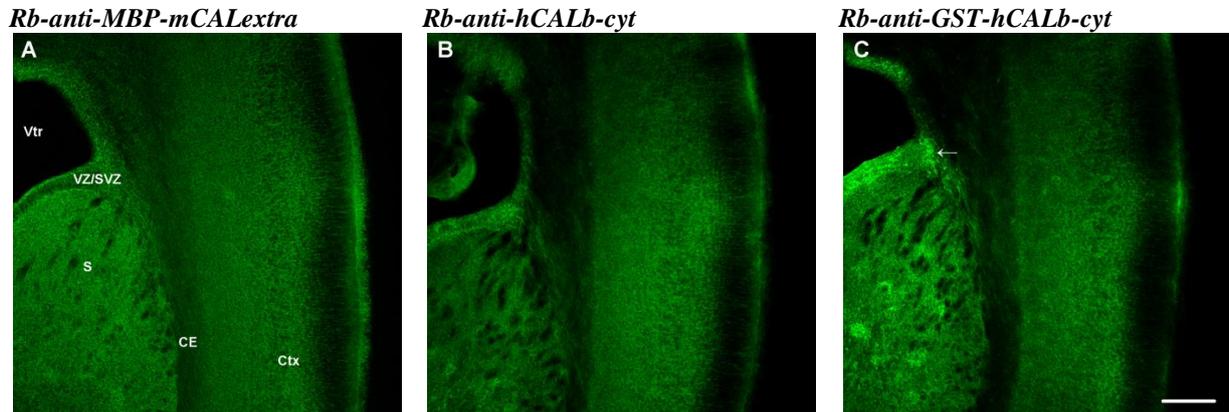


Abbildung 48: *Rb-anti-MBP-mCALextra* und *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt* im Neokortex an P1. Perfundiert, coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Diese immunhistochemische Färbung macht deutlich, dass sowohl der *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*- (C; 1 $\mu\text{g/ml}$) als auch der zweifach affinitätsgereinigte *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörper (B; 1 $\mu\text{g/ml}$) ein sich weitestgehend gleichendes Fluoreszenzmuster erzeugen wie der *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper (A; 2,5 $\mu\text{g/ml}$), der gegen den extrazellulären Bereich von CALEB/NGC gerichtet ist. Die Anfärbung von Blutgefäßen durch den *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*-Antikörper wurde hier durch vorheriges Perfundieren der Mäuse minimiert. Auffällig ist jedoch eine stärkere Anreicherung der *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*-Antikörper in der Ventrikularzone (VZ)/ Subventrikularzone (SVZ) (Pfeil in (C)). CE, Capsula externa; Ctx, telencephaler Kortex; S, Striatum; Vtr, Seitenventrikel. Balken: 200 μm . Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

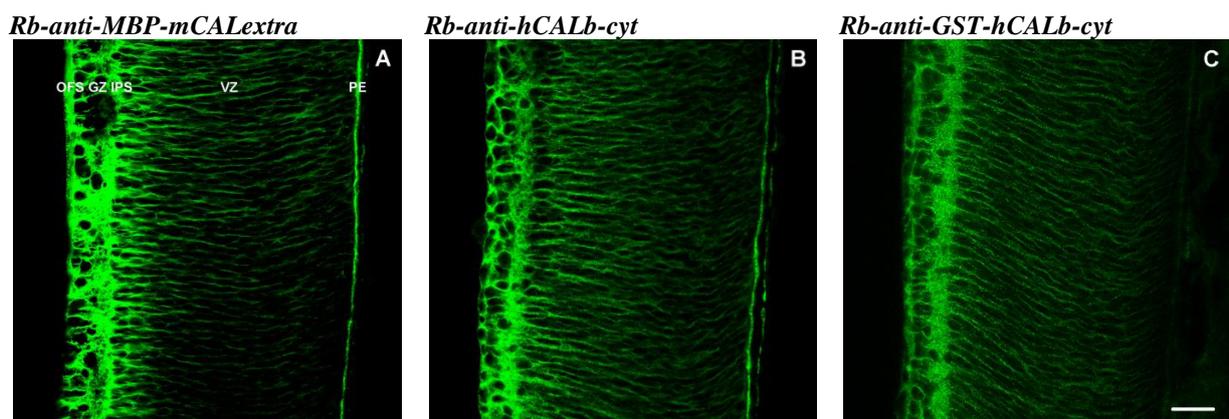


Abbildung 49: *Rb-anti-MBP-mCALextra* (A; 2,5 $\mu\text{g/ml}$), *Rb-anti-hCALb-cyt* (B; 1 $\mu\text{g/ml}$) und *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt* (C; 1 $\mu\text{g/ml}$) in der Retina an P1. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Alle drei Antikörper zeigen eine Anreicherung in der Optikusfaserschicht (OFS), der Ganglienzellschicht (GZ), und der inneren plexiformen Schicht (IPS), sowie in radial orientierten Neuriten in der Ventrikularzone (VZ). Allerdings ist die Fluoreszenz des *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörpers in der OFS, GZ und der IPS derart intensiv, dass es nicht möglich war, die radialen Fasern in der VZ angemessen photographisch darzustellen ohne eine Überstrahlung der übrigen immunpositiven Regionen zu erzeugen. PE, Pigmentepithel. Balken: 25 μm .

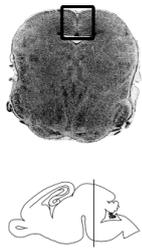
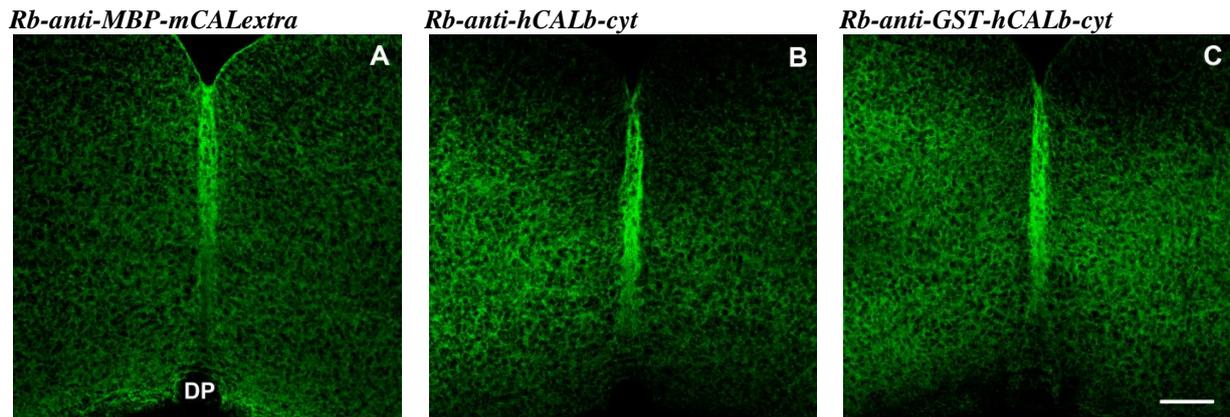


Abbildung 50: *Rb-anti-MBP-mCALextra* (A; 2,5 µg/ml), *Rb-anti-hCALb-cyt* (B; 1 µg/ml) und *Rb-anti-GST-hCALb-cyt* (C; 1 µg/ml) in der Mittellinie des Colliculus superior an P1. Perfundiert, coronare Schnittebene. Konfokale Mehrschichtaufnahmen. Die Mittellinie des Colliculus superior wird von allen drei anti-CALEB/NGC-Antikörpern gut erkannt. Lateral der Medianebene stellt sich ein retikulär anmutendes Fluoreszenzmuster dar. Die geringere Immunfluoreszenz am oberen und unteren Rand in (B) ist ein aufnahmebedingtes Artefakt. DP, Deckplatte. Balken: 100 µm. Übersicht modifiziert nach Schambra et al., 1992.

Die immunhistochemischen Färbungen mit dem *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*-Antikörper zeigten ein CALEB/NGC-Expressionsmuster, das in allen untersuchten Entwicklungsstufen und Gehirnregionen weitestgehend dem mittels des *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörpers ermittelten (s. Abschnitt 3.2) Expressionsmuster glich (Abbildung 48,49,50). Die Färbungen mit dem *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörper bekräftigen somit, dass der für die eigentliche Expressionsanalyse verwendete *Rb-anti-MBP-CALextra*-Antikörper das CALEB/NGC-Vorkommen gut wiedergibt.

Es fiel auf, dass der *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*-Antikörper an einige zusätzliche Strukturen band, die vom *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper nicht erkannt wurden. So imponierten vermehrt immunpositive Blutgefäße sowie eine Affinität des Antikörpers an Strukturen in der Ventrikularzone/Subventrikularzone um die Seitenventrikel an P1 (Abbildung 48). Überdies erschienen immunpositive Strukturen weniger klar und unschärfer abgegrenzt als bei Färbungen mit dem *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper. Diese Phänomene waren bei dem zweifach affinitätsgereinigten *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörper weniger ausgeprägt als bei seinem nur einfach gereinigten Pendant (*Rb-anti-GST-hCALb-cyt*).

In Anbetracht der Tatsache, dass der *Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*-Antikörper in Immunblots zusätzlich zu den CALEB/NGC-Banden noch weitere Proteine bzw. Proteinbestandteile erkannte (s. Abschnitt 3.1), unter anderem fand sich auch eine Bande auf Höhe von 39 kDa, der molekularen Masse von GST, ist es möglich, dass zumindest einige der zusätzlichen

immunpositiven Strukturen in den immunhistochemischen Färbungen nicht spezifisch sind. Da der gereinigte *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörper in der Immunhistochemie weniger Affinität zu diesen unspezifischen Strukturen besaß, konnte die Aufreinigung zu qualitativ besseren Färbungen beitragen.

4 Diskussion

4.1 Technische und methodische Probleme

Für die immunhistochemischen Färbungen zur Expressionsanalyse von CALEB/NGC wurde ein affinitätsgereinigter Antikörper verwendet, der gegen den extrazellulären Proteinbereich gerichtet ist. Immunblots mit Mausgehirn offenbarten, dass dieser Antikörper ausschließlich CALEB/NGC erkennt. In den immunhistochemischen Färbungen zeigte sich ein nur minimales Fluoreszenzsignal außerhalb des zentralen Nervensystems in bekanntermaßen CALEB/NGC-negativen Geweben (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Yasuda et al., 1998). Dies zeugt insgesamt von einer hohen Qualität des Antikörpers. Es fiel jedoch auf, dass im Nasenepithel und im Verlauf der Riechneurone zum Bulbus olfactorius eine bedeutende CALEB/NGC-Immunfluoreszenz sichtbar war. Es gibt bisher noch keine Veröffentlichungen zur Expression von CALEB/NGC im peripheren Nervensystem. Es gibt jedoch Hinweise, dass Chondroitinsulfat-Proteoglykane an der Lenkung der Fila olfactoria zum Gehirn beteiligt sind (Treloar et al., 1996). Es ist daher denkbar, dass die Immunfluoreszenz in dieser Region spezifisch ist.

Um gleichfalls eine unspezifische Bindung der verwendeten sekundären Antikörper auszuschließen, erfolgte bei jedem Färbedurchgang die alleinige Inkubation einiger Gehirnschnitte mit Fluorochrom-gekoppeltem sekundären Antikörper ohne vorherige Inkubation mit einem primären Antikörper. Hierbei zeigte sich, dass der für die CALEB/NGC-Immunfluoreszenz relevante *Goat-anti-rabbit-A1488*-Antikörper sehr spezifisch ist und ein nur sehr geringes Fluoreszenzsignal erzeugte, so dass photographische Aufnahmen dieser Negativkontrollen zu wahlweise einer stark überstrahlten Darstellung oder einem fast schwarzen Bild führten.

Auch der sekundäre *Goat-anti-guinea pig-Cy3*-Antikörper, der für die Doublecortin-Färbungen gebraucht wurde, war äußerst spezifisch. Der *Goat-anti-mouse-Cy3*-Antikörper hingegen zeigte auch nach Inkubation in Blockierungslösung eine geringe unspezifische Affinität zu Mausgewebe. Die spezifische Bindung des Antikörpers an die Maus-Immunglobuline, die gegen Nestin-, Calbindin- und Tau-exprimierende Strukturen gerichtet waren, war jedoch um ein vielfaches stärker und das Fluoreszenzsignal hob sich intensiv von dem Hintergrund ab, so dass es problemlos analysiert werden konnte.

Alle drei benutzten sekundären Antikörper zeigten Affinität zu Blutgefäßen, welche im Verlauf der Entwicklung zahlreicher und größer werden und zunehmend das Bild stören. Dies

ließ sich durch Perfusionsfixierung der Mäuse mit Paraformaldehyd minimieren, was in dieser Arbeit teilweise an P1-Mäusen angewandt wurde.

Das mithilfe des *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörpers ermittelte Expressionsmuster von CALEB/NGC wurde ferner durch vergleichende immunhistochemische Färbungen mit einem zweiten anti-CALEB/NGC-Antikörper überprüft. Hierbei ergab sich ein Fluoreszenzbild, welches dem des *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörpers entsprach, womit die CALEB/NGC-Expressionsanalyse verifiziert werden konnte. Der hierfür verwendete Antikörper ist gegen den intrazellulären Proteinbereich von CALEB/NGC gerichtet (*Rb-anti-(GST)-hCALb-cyt*) und wurde vor Gebrauch nochmals affinitätsgereinigt und im Immunblot auf seine Spezifität getestet. Bei gleicher Antikörperkonzentration zeigten sich jedoch auch bei dem nochmals affinitätsgereinigten Antikörper neben den CALEB/NGC-Banden bei 120 und 150 kDa weitere immunpositive Banden zwischen 25 und 100 kDa. Darunter befand sich auch eine Bande bei 39 kDa – der Molekularmasse von GST. Es ist also möglich, dass die Affinitätsreinigung nicht vollständig war und einige dieser Banden weiteren Proteinen entsprechen, die der Antikörper neben CALEB/NGC erkennt. Hinter diesen Banden könnten sich jedoch auch CALEB/NGC-Proteinanteile verbergen, die von dem *Rb-anti-MBP-mCALBextra*-Antikörper nicht erkannt werden. Bei Jüttner et al. (2005) zeigten sich im Immunblot (an Huhngewebe) mittels eines Antikörpers gegen den intrazellulären CALEB/NGC-Bereich neben den sonst CALEB/NGC-üblichen Banden ebenfalls weitere immunpositive Banden zwischen 38 und 62 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass sich unter diesen Banden CALEB/NGC-Sheddingprodukte nach der proteolytischen Abspaltung der Ektodomäne befinden (Jüttner et al., 2005). Es ist möglich, dass CALEB/NGC im embryonalen Mausgehirn auch in dieser Form vorliegt und somit vom *Rb-anti-hCALb-cyt*-, nicht jedoch vom *Rb-anti-MBP-mCALextra*-Antikörper erkannt wird.

Die übrigen immunpositiven Proteinbanden der Western Blot-Kontrollen des *Rb-anti-hCALb-cyt*-Antikörpers können somit weitere richtig erkannte Proteolyseprodukte von CALEB/NGC, aber auch Ausdruck von Protein- und Immunglobulinkontaminationen des Serums sein und/oder auf einer Affinität zu weiteren Proteinen beruhen, die ähnliche Epitope wie der intrazelluläre CALEB/NGC-Bereich und/oder GST aufweisen.

Ferner ist zu erwähnen, dass die primären Antikörper mehrfach verwendet wurden und dadurch mit der Anzahl an erfolgten Färbungen zwangsläufig ihre Konzentration abnahm. Eine Unterschreitung der effektiven Konzentration für eine immunhistochemische Färbung wird hierbei nicht notwendigerweise erreicht, in der Regel kommt es sogar bei

Wiederverwertung der Antikörper zu einer Erhöhung der Spezifität, da sich die unspezifische Strukturen erkennenden Antikörperbeimischungen in den ersten Färbungen am Gewebematerial abreagieren.

4.2 Vergleich mit bisherigen Expressionsstudien

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen verifizieren das Vorkommen von CALEB/NGC im Embryonalalter und erlauben eine erstmalige Identifikation des Expressionsmusters im gesamten Gehirn.

Es war bisher aus Immunblots bekannt, dass CALEB/NGC in der Huhnretina erstmals am 7. Embryonaltag und in Rattengehirnen erstmals am 14. Embryonaltag exprimiert wird, was bei der Maus etwa E14,5 in der Retina bzw. E12,5 im Gehirn entspricht (Schumacher et al., 1997; Ida et al., 2006). Pränatale immunhistochemische Färbungen erfolgten lediglich an der Huhnretina sowie in der Ventrikularzone des Telencephalons von E14-Ratten (Schumacher et al., 1997; Ida et al., 2006). In dieser Arbeit wird erstmals gezeigt, dass die Expression an E14 bei der Maus schon in spezifischen Gehirnregionen intensiv vorhanden ist. Quantitativ war die Expression pränatal nicht sehr hoch, jedoch durchaus relevant. Im Laufe der Entwicklung kam es zu einer flächenhaften Ausdehnung des Fluoreszenzsignals, so dass die Expression an P1 bereits sehr weitläufig und dicht über das Gehirn verteilt war. Diese quantitative Zunahme ist konform mit den Immunblots von Watanabe et al. (1995), die einen kontinuierlichen Expressionsanstieg ab E14,5 bei der Ratte postulierten.

Die hier erbrachten Ergebnisse der CALEB/NGC-Expression zeigen Übereinstimmungen mit den bisherigen immunhistochemischen Analysen in der pränatalen Retina und Ventrikularzone, sowie im postnatalen Gehirn und enthüllen, dass die Expression in diesen Regionen bereits pränatal vorhanden ist.

In der Retina wird gezeigt, dass in der Maus CALEB/NGC ab E14 in der Nervenfaserschicht bei einem ansonsten radialen Fluoreszenzmuster exprimiert wird. Ab E16 fand sich CALEB/NGC zusätzlich in der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht. Diese Funde entsprechen den von Schumacher et al. (1997) und Schumacher und Stübe (2003) angefertigten Expressionsstudien in der pränatalen Huhnretina sowie denen von Jüttner et al. (2005) in der postnatalen Mausretina. Zusätzlich kam ab E14 eine CALEB/NGC-Expression im Pigmentepithel zutage, die Inatani et al. (2000) auch bei postnatalen Ratten ab P7 beschrieben hatten. In den von ihnen durchgeführten immunelektronenmikroskopischen Studien konnte spezifiziert werden, dass die Immunfluoreszenz sich insbesondere an den basalen Oberflächen der retinalen Pigmentepithelzellen, aber auch an den Mikrovilli der

apikalen Zellmembranen konzentrierte. Überdies fand sich eine Expression an neuronalen Fortsätzen in der inneren plexiformen Schicht sowie an den axonalen Membranen der retinalen Ganglienzellen der Ratte. Das früheste beschriebene Entwicklungsstadium ist hier P7, so dass diesbezüglich weitere immunelektronenmikroskopische Untersuchungen an pränatalen Tieren interessant wären.

Im Kleinhirn präsentierte sich eine an E14 insgesamt geringe Immunfluoreszenz, die im weiteren Entwicklungsverlauf deutlich zunahm. Die äußere Körnerzellschicht wies eine erst fehlende, später schwache Expression auf. Mit zunehmendem Erscheinen der an diese Schicht unmittelbar angrenzenden Purkinjezellen wies die Region um diese Zellen eine starke CALEB/NGC-Expression auf. Entsprechend wurde in den Arbeiten von Schumacher et al. (1997), Aono et al. (2000) und Hassel et al. (2003) auch im postnatalen, noch unreifen Cerebellum von Huhn, Ratte und Maus eine starke Immunfärbung der Purkinjezellen und vor allem ihrer Dendriten beschrieben.

Jüttner et al. (2005) beschrieben im Colliculus superior der postnatalen Maus eine uniforme CALEB/NGC-Expression über alle Schichten hinweg. Ein entsprechendes Expressionsmuster fand sich in der vorliegenden Arbeit lediglich in den späten pränatalen Stadien. In den frühen untersuchten Stadien jedoch überwogen im Colliculus superior radial orientierte, ferner tangential angeordnete immunpositive Strukturen in der Marginalzone. Auch die äußerst intensive Mittellinienexpression wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben. Es bleibt unklar, an welchem Entwicklungszeitpunkt diese starke CALEB/NGC-Expression in der Mittellinie verschwindet, da Jüttner et al. (2005) keine detaillierte Expressionsstudie liefern und sich nicht zu den untersuchten Entwicklungsstadien äußern.

Im postnatalen und im adulten Rattenhippocampus wurde von Aono et al. (2004) und Brandt et al. (2007) eine CALEB/NGC-Expression im Stratum oriens, radiatum und lacunosum moleculare, nicht jedoch in der Pyramiden- und Körnerzellschicht dargestellt. Die immunhistochemischen Färbungen im pränatalen Maushippocampus zeigen, dass sich dieses Expressionsmuster in den faserreichen Schichten des Hippocampus bereits im späten Embryonalalter andeutet.

Aono et al. (2006) analysierten die CALEB/NGC-Expression im adulten Rattentelencephalon mittels *in-situ*-Hybridisierung und zeigten ein verstärktes Vorkommen von CALEB/NGC-mRNA im Nucleus caudatus, Putamen und in der Amygdala. Nucleus caudatus, Putamen und Nucleus accumbens bilden gemeinsam das Striatum, welches sich auch pränatal bereits stark immunpositiv darstellte.

Die immunhistochemischen Untersuchungen offenbaren, dass CALEB/NGC im embryonalen Alter in einigen Gehirnregionen bereits ein Expressionsmuster ähnlich dem im postnatalen Gehirn besitzt. Da jedoch pränatal andere Entwicklungsprozesse stattfinden, lassen sich nicht ohne weiteres Rückschlüsse von der postnatalen auf die pränatale Funktion von CALEB/NGC ziehen. Ferner wird deutlich, dass neben der Retina und der Ventrikularzone CALEB/NGC pränatal auch in anderen hochrelevanten Regionen exprimiert wird.

4.3 Neuritenwachstum

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen im pränatalen Mausgehirn zeigen Parallelen zum Expressionsmuster im postnatalen Mausgehirn dahingehend, dass CALEB/NGC auch in Embryonalstadien vorwiegend in neuritenreichen und kernarmen Regionen exprimiert wird.

So zeigten im telencephalen Kortex die Marginalzone und die Unterplatte an den Stellen, wo die kortikale Platte bereits entstanden war, eine intensive CALEB/NGC-Expression. In die Marginalzone senden die Neurone der kortikalen Platte direkt nach ihrer Wanderung primitive Dendriten aus (Tabata und Nakajima, 2001), während die Unterplatte von auswachsenden kortikothalamischen efferenten Axonen durchkreuzt wird und hier zudem die Afferenzen aus dem Thalamus verlaufen (Bicknese et al., 1994). Ab E16/17 begann sich auch in der kortikalen Platte selbst eine zunehmende CALEB/NGC-Expression zu entwickeln, was mit dem Differenzierungsgrad der kortikalen Neurone korreliert, die nach vollendeter Migration beginnen Dendriten und Axone auszubilden (Evans, 2012).

Auch im Hippocampus wird CALEB/NGC vorwiegend in den neuritenreichen Regionen exprimiert. Die efferenten Axone der Pyramidenzellen müssen auf ihrem Weg zum Alveus durch die deutlich CALEB/NGC-immunpositive Unterplatte – das zukünftige Stratum oriens – hindurchwachsen (Willis und Haines, 2012). Später findet in dieser Zone die Verzweigung der basalen Dendriten einiger Pyramidenzellen statt (Willis und Haines, 2012). In der ebenfalls immunpositiven inneren Marginalzone, dem späteren Stratum radiatum, erfolgt die interneuronale Verschaltung zwischen den Pyramiden- und Korbzellen (Trepel, 2004b). Der Alveus und die Fimbrien des Hippocampus führen die Efferenzen aus dem Hippocampus als Teil des Papez-Neuronenkreises (Willis und Haines, 2012). Diese waren ab E18 besonders am Rand betont immunpositiv, ansonsten von dünnen CALEB/NGC-positiven Fasern durchzogen.

Im Bulbus olfactorius ist die Expression von CALEB/NGC in den faserreichen Regionen um die Mitralzellen sehr stark. In der äußeren plexiformen Schicht wachsen Dendriten der Mitral-

und Büschelzellen, in der inneren plexiformen Schicht ihre Axonkollateralen. Ab P1 sind auch die Glomeruli, in welchen die Mitralzellen reichlich Synapsen mit den Axonen aus den Riechzellen der Nase ausbilden (Simpson und Sweazey, 2012), als stark immunpositive Strukturen erkennbar.

In der Retina waren neben einem radialen Fluoreszenzmuster besonders die faserführenden Schichten angrenzend an die Ganglienzellen immunpositiv. Zunächst zeigte nur die Nervenfaserschicht ein hohes CALEB/NGC-Vorkommen, sie führt die Axone der Ganglienzellen in Richtung Discus opticus (Lynch und Corbett, 2012). Die Bildung der inneren plexiformen Schicht korrelierte mit einer dort zunehmenden intensiven CALEB/NGC-Expression. Die innere plexiforme Schicht besteht aus den Dendritenbäumen der Ganglienzellen, die dort postnatal Verschaltungen mit den Amakrin- und den Bipolarzellen bilden (Olney, 1968). *In-situ*-Hybridisierungs-Experimente in der Rattenretina haben gezeigt, dass die Expression postnatal in den Ganglienzellen stattfindet (Schumacher et al., 2001). In Zellkulturen von retinalen Ganglienzellen fand sich überdies eine starke CALEB/NGC-Expression insbesondere an den kurzen auswachsenden Neuriten (Inatani et al., 2000). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CALEB/NGC-Expression in der pränatalen Retina zumindest auch in Ganglienzellen stattfinden könnte. Hierfür spricht auch, dass die Neuriten der Ganglienzell-Vorläufer die gesamte Retinadicke überspannen (Hinds und Hinds, 1974). Dementsprechend ist es denkbar, dass das radiale CALEB/NGC-Expressionsmuster in der pränatalen Mausretina den radial orientierten Neuriten der Ganglienzellvorläufer entspricht und die starke Expression in der inneren plexiformen Schicht und in der Nervenfaserschicht den anschließend auswachsenden Axonen und Dendriten der Ganglienzellen. Die Koexpression mit Nestin und Doublecortin deutet sowohl in der Retina als auch im Gehirn ebenfalls darauf hin, dass CALEB/NGC in jungen Neuronen und im Gehirn möglicherweise auch in den Radialglia exprimiert wird.

Entsprechend den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen im embryonalen Mausgehirn hatten vorangegangene Studien ergeben, dass das Vorkommen von CALEB/NGC auch im postnatalen Gehirn in besonderem Maße an neuritenreiche Regionen gebunden ist (Watanabe et al., 1995; Schumacher et al., 1997; Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000; Schumacher und Stübe, 2003; Hassel et al., 2003; Brandt et al., 2007). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass CALEB/NGC *in vitro* direkt das Neuritenwachstum begünstigt (Schumacher et al., 1997; Nakanishi et al., 2006). Ebenso wird *in vitro* und *in vivo* postnatal die Dendritenverzweigung gefördert (Brandt et al., 2007, 2008). Auch für die Bindungspartner

Tenascin-C, -R und Midkine wird eine Beteiligung an Neuritenwachstumsprozessen postuliert (Muramatsu et al., 1993; Zacharias et al., 1999).

Insgesamt deutet das CALEB/NGC-Expressionsmuster in neuritenreichen Regionen sowie eine Koexpression mit dem Axonmarker Tau-1 auf eine Beteiligung an Neuriten-assoziierten Prozessen auch im embryonalen Mausgehirn hin, beispielsweise an Neuritenwachstum oder Dendritenverzweigung wie sie für fortgeschrittenere Entwicklungsstadien beschrieben worden sind.

4.4 Axonlenkung

Neben der Beobachtung, dass CALEB/NGC im embryonalen Gehirn vornehmlich in neuritenreichen Regionen exprimiert wird, fiel eine starke, selektive Expression um einige Fasertrakte wie den Alveus und den Fornix sowie in der Mittellinie des Chiasma opticum, der Commissura posterior, der Colliculi superiores et inferiores, des Pons und der Medulla oblongata auf. Die CALEB/NGC-Expression in diesen Regionen fällt zusammen mit dem Zeitpunkt der Ausbildung und damit auch Kreuzungsvorgängen von Axontrakten (Godement et al., 1987; Robinson und Dreher, 1990; Kandler und Friauf, 1993; Terashima, 1995). Darüber hinaus geben die Kofärbungen mit Nestin sowie bisherige Untersuchungen an CSPG weitere Hinweise auf eine potentielle Beteiligung von CALEB/NGC an der Axonlenkung.

Ab E14 wird CALEB/NGC medial im Chiasma opticum exprimiert. Dieser Zeitpunkt deckt sich mit dem Einwachsen der retinalen Axone ins Chiasma ab E13,5, welche dann teilweise die Mittellinie kreuzen (Godement et al., 1987). Ab E14,5 erreichen die ersten retinalen Axone den Colliculus superior (Robinson und Dreher, 1990). Dort ist die CALEB/NGC-Expression ab E14 in der Mittellinie zwischen rechtem und linkem Colliculus superior entsprechend hoch.

Im Pons und in der Medulla oblongata war ebenfalls ab den frühestuntersuchten Stadien eine kräftige CALEB/NGC-Expression in der Mittellinie zu beobachten. Im Verlauf der Entwicklung nahm die Expression in den dorsalen Anteilen der Mittellinienregion ab und stellte sich an P1 nur noch im ventralen Bereich dar. Im Hirnstamm beginnen sich schon früh Axontrakte auszubilden, welche den Weg für die späteren komplexen neuronalen Verbindungen bahnen. Zu diesem sogenannten „frühen Axongerüst“ caudal des Prosencephalon zählen die Commissura posterior, der Fasciculus mammillotegmentalis, der Fasciculus longitudinalis medialis, der Fasciculus dorsalis des Nucleus mesencephalicus nervi trigemini und der Fasciculus longitudinalis lateralis (Ahsan et al., 2007). Ihre Bildung beginnt schon sehr früh und ist bei der Maus an E12 bereits fortgeschritten (Mastick und Easter,

1996). Die Menge an Axontrakten, die größtenteils die Mittellinie kreuzen, ist im Hirnstamm sehr groß (Sandoval-Minero und Varela-Echavarría, 2008). Unter anderem gehören hierzu die Axone des Nucleus cochlearis, welche an der ventralen Oberfläche des pontinen Tegmentums als Corpus trapezoideum an E13,5 zum ersten Mal die Mittellinie überqueren, ein weiteres Mal als Axonkollateralen an E16,5 weiter dorsal (Kandler und Friauf, 1993). Noch später in der Entwicklung erfolgt das Einwachsen des Tractus pyramidalis. Dieser erreicht an E16,5 das pontine Tegmentum und überquert erst perinatal in der Decussatio pyramidorum die Mittellinie (Terashima, 1995). Aufgrund der bereits frühen Expression von CALEB/NGC in der Mittellinie des Hirnstamms und besonders deutlich in der Commissura posterior ist eine Beteiligung des Proteins an der Bildung der frühen Axontrakte denkbar. Die im weiteren Verlauf ventral persistierende Expression könnte für spätere Axontrakte wie die Axone des Nucleus cochlearis in den kontralateralen Colliculus inferior oder den Tractus pyramidalis von Wichtigkeit sein.

Den Mittellinienregionen wird eine Assoziation mit besonderen Gliazellen zugeschrieben – den Mittellinienglia (Van Hartesveldt et al., 1986). Dies sind spezialisierte Radialglia, die ebenfalls Nestin exprimieren, sich jedoch im Zeitpunkt ihrer Differenzierung, in ihrer Morphologie und ihrer molekularen Komposition von den Radialglia unterscheiden (Wu et al., 1998). Ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Selektion von die Mittellinie kreuzenden Axonen zugeschrieben, beispielsweise von retinalen Axonen im Chiasma und im Colliculus superior sowie von Pyramidentrakt-Axonon (Joosten und Gribnau, 1989; Guillery et al., 1995; Wu et al., 1995). So ergaben Ablationsversuche der Mittellinienglia eine abnorme Kreuzung der Mittellinie durch Axone, so dass eine hemmende Wirkung auf ipsilateral zu verbleibende Axone vermutet wird (Wu et al., 1998). Diesen Effekt üben die Mittellinienglia über eine Sekretion von Slit aus, welches als Ligand in Verbindung mit den Robo-Rezeptoren (Roundabout in Drosophila) abstoßend auf ipsilateral zu verbleibende Axone wirkt und somit auch verhindert, dass gekreuzte Axone wieder über die Mittellinie zurück projizieren (Rothberg et al., 1990; Dickson und Gilestro, 2006). Bei der Maus bestehen die Mittellinienglia im Colliculus superior ab E12/13, im Pons ab mindestens E13,5 (Van Hartesveldt et al., 1986; Dunlop et al., 1997). Die immunhistochemischen Färbungen mit CALEB/NGC und Nestin zeigten insbesondere an den jüngeren untersuchten Entwicklungsabschnitten im Colliculus superior, im Pons und in der Medulla oblongata eine intensive Koexpression in der Mittellinienregion. Später, als die CALEB/NGC-Expression im Pons nur noch ventral lokalisiert war, bestand weiterhin eine intensive Nestin-Fluoreszenz über die gesamte Mittellinie hinweg. Dieses Expressionsverhalten schließt dennoch nicht aus,

das CALEB/NGC von Mittellinienglia exprimiert wird. Es scheint sogar möglich, dass CALEB/NGC nur an spezifischen Stellen von den Mittellinienglia exprimiert wird und dort modulierend wirkt.

Einen weiteren Hinweis auf die potentielle Bedeutung von CALEB/NGC auf Axonlenkung und Kreuzungsvorgänge gibt die starke Ähnlichkeit des pränatalen Expressionsmusters mit dem der Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPG), zu deren Familie auch CALEB/NGC gehört. Die CSPG-Proteinklasse findet sich in Regionen, die als Barriere für einwachsende Axone im embryonalen Gehirn gelten (Hoffman-Kim et al., 1998; Chung et al., 2000a, b; Wilson und Snow, 2000; Shay et al., 2008). Für diese immunhistochemischen Studien wurde der Antikörper CS-56 benutzt, welcher 4- und 6-glykosylierte Chondroitinsulfate erkennt (Avnur und Geiger, 1984). Das Protein CALEB/NGC besitzt ebenfalls Sulfatierungen sowohl an den Stellen 4 als auch 6 der Zuckerbausteine (Shuo et al., 2004). Aufgrund der hohen Korrelation des Immunfluoreszenzmusters von CALEB/NGC und dem CS-56-Antikörper ist davon auszugehen, dass unter anderem auch CALEB/NGC in den bisherigen immunhistochemischen Studien zu CSPG erfasst worden ist.

So zeigen die CSPG peripher in der Nervenfaserschicht der Retina eine starke Expression, die mit dem Auswachsen der retinalen Axone zusammenfällt (Chung et al., 2000a). Im Chiasma opticum werden sie ab dem Eintreffen der retinalen Axone medial stark exprimiert (Chung et al., 2000b). Ab E14,5 erreichen die ersten retinalen Axone den dorsalen Nucleus geniculatus lateralis sowie den Colliculus superior, in dessen Mittellinie für die CSPG eine erhöhte Expression nachgewiesen und mit der Funktion einer Axonbarriere in Verbindung gebracht wurde (Robinson und Dreher, 1990; Hoffman-Kim et al., 1998). Das Expressionsmuster der CSPG im Chiasma opticum, Colliculus superior und im Thalamus zeigt enge Parallelen zur CALEB/NGC-Expression.

Des Weiteren wiesen Shay et al. (2008) eine starke CSPG-Expression im Bulbus olfactorius und um die einwachsenden Axone der sensorischen olfaktorischen Neurone nach. Im Bulbus olfactorius war die CSPG-Immunfluoreszenz ab E17 bei der Maus in der äußeren plexiformen Schicht und in der Glomerularschicht lokalisiert. Aus dem Expressionsmuster wurde den CSPG eine Rolle als repulsives Signalmolekül für wachsende Axone zugeschrieben. Das Vorkommen von CALEB/NGC in der äußeren plexiformen Schicht sowie in der Glomerularschicht deckt sich mit dem Expressionsverhalten der CSPG.

Eine weitere Überschneidung der CALEB/NGC-Expression mit dem Vorkommen von CSPG zeigt sich im Telencephalon in der kortikalen Unterplatte. Es wird postuliert, dass die CSPG

dort ein Substrat für die wachsenden thalamokortikalen Afferenzen in der Unterplatte bilden und sie somit von den kortikalen Efferenzen trennen, die in der Intermediärzone wachsen (Bicknese et al., 1994).

Als weiterer Hinweis bezüglich der potentiellen Bedeutung von CALEB/NGC als axonlenkendes Molekül kann seine Expression am Außenrand des Alveus, der hippocampalen Fimbrien und des Fornix gewertet werden. Im Hippocampus wurde ebenfalls eine CSPG-Immunreaktivität im Alveus, ab E13 am Außenrand der Fimbrien und an der caudalen Grenze des ventralen Fornix festgestellt (Braga-de-Souza und Lent, 2004). Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Expressionsverhalten der CSPG und dem Einwachsen der hippocampalen Axone postuliert, insbesondere der Axone der hippocampalen Kommissur. Im pränatalen Ratten-Hippocampus wurde eine CSPG-Anreicherung in der Marginalzone und der Unterplatte nachgewiesen, was ebenfalls der CALEB/NGC-Expression im Hippocampus entspricht (Wilson und Snow, 2000). Weiterführende *in vitro* Studien ergaben zudem Hinweise darauf, dass CSPG repulsiv auf wachsende Axone wirken, die für den Alveus/Fimbrien bestimmt sind (Wilson und Snow, 2000).

Hinsichtlich der Glykosylierung der CSPG zeigten sich interessanterweise Unterschiede im Colliculus superior dahingehend, dass die Proteoglykane in der Mittellinie besonders stark glykosyliert sind im Vergleich zu den Proteoglykanen, die im restlichen Colliculus superior exprimiert werden (Hoffman-Kim et al., 1998; Wu et al., 1998). Zudem resultierte die Behandlung von Rattenretinas mit Chondroitinase ABC, welche eine enzymatische Spaltung von Chondroitin- und Dermatansulfat bewirkt, in ektopen vorzeitig differenzierten Ganglienzellen mit desorganisierter Axonprojektion (Brittis et al., 1992). Im Chiasma führte die Chondroitinase-Behandlung zur vermehrten Kreuzung von Axonen bei verminderter Anzahl an ungekreuzten Axonen (Chung et al., 2000b). Dies kann als Hinweis gedeutet werden, dass die Glykosaminoglykane an einer Barrierefunktion beteiligt sind. Es ist bekannt, dass CALEB/NGC sowohl mit als auch ohne Glykosaminoglykanseitenketten vorkommt und dass während der Gehirnentwicklung die Proteoglykan-Form überwiegt (Aono et al., 2000; Inatani et al., 2000). Darüber hinaus exprimieren unterschiedliche Zellen CALEB/NGC bevorzugt mit oder ohne Chondroitinsulfat und auch die Sulfatierung der Glykosaminoglykanseitenketten ändert sich in Abhängigkeit vom Lebensalter (Aono et al., 2004; Shuo et al., 2004). Es wäre interessant, an dieser Stelle weiterführend zu untersuchen, ob in der Embryonalphase CALEB/NGC in den Mittellinienregionen als Proteoglykan vorkommt und in Regionen außerhalb der Mittellinie ohne Glykosaminoglykanseitenketten.

Dies würde bekräftigen, dass CALEB/NGC im Embryonalalter parallel unterschiedliche Funktionen einnehmen kann, beispielsweise als in Kreuzungsvorgängen, sowie im Neuritenwachstum involviertes Molekül.

Zusammenfassend ist die Expression von CALEB/NGC also besonders stark in neuritenreichen Gehirnregionen und Regionen, die mit Kreuzungsvorgängen von Axonbahnen assoziiert sind. Zudem besteht eine frappierende Ähnlichkeit der Expressionsmuster von CALEB/NGC und der Chondroitinsulfat-Proteoglykane, deren Vorkommen mittels des CS-56-Antikörpers untersucht wurde, und für die eine Rolle bei Neuritenwachstum und -lenkung postuliert wurde (Bicknese et al., 1994; Hoffman-Kim et al., 1998; Chung et al., 2000b; Braga-de-Souza und Lent, 2004; Shay et al., 2008). Hinsichtlich des Vorkommens von CALEB/NGC in Mittellinienregionen ist in diesen Bereichen auch eine Koexpression mit Nestin bedeutsam, welches dort von den Mittellinien-Gliazellen exprimiert wird, die auch das für Axonlenkungsvorgänge wichtige, repulsive Signalmolekül Slit sezernieren (Rothberg et al., 1990; Dickson und Gilestro, 2006). Da auch in weiteren Gehirnregionen mit starkem Slit-Vorkommen – unter anderem in den Ganglienhügeln und im Septum – die CALEB/NGC-Expression überaus bedeutsam ist, bleibt im Weiteren zu untersuchen, ob CALEB/NGC beispielsweise regulierend in dieses System eingreift (López-Mascaraque und de Castro, 2002; Andrews et al., 2007).

4.5 Zellmigration

Schon in den frühen untersuchten Entwicklungsstadien fiel im Gehirn eine CALEB/NGC-Expression in Nestin-positiven Zellen auf, deren radial ausgerichtete Zellfortsätze von der Ventrikeloberfläche bis zur Pia mater ziehen – den Radialglia, die eine wichtige Rolle in der neuronalen Migration einnehmen (Zecevic, 2004). CALEB/NGC fand sich hierneben auch in jungen migrierenden Neuronen, die Doublecortin exprimieren (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999). Diese enge Verknüpfung der CALEB/NGC-Expression mit migrationsassoziierten Strukturen deutet auf einen Zusammenhang hin, zumal auch die Neuritogenese eng mit der Zellmigration verknüpft und Migration eines der entscheidenden Ereignisse der embryonalen Gehirnentwicklung ist (Gleeson et al., 1998; Francis et al., 1999; Nadarajah und Parnavelas, 2002).

Das Intermediärfilament Nestin wird im Gehirn von Stammzellen, neuronalen Vorläuferzellen und den Radialglia exprimiert, die mit ihren Fortsätzen die Gehirnoberfläche vom Ventrikel bis zur Pia mater überspannen (Hockfield und McKay, 1985; Zecevic, 2004). Diese Gliazellen gelten als wichtige Leitstruktur für die Migration neuronaler Vorläuferzellen, welche sich in

enger Bindung an die Fortsätze der Radialglia von der Ventrikularzone zur kortikalen Platte fortbewegen (s. Abschnitt 1.1.2) (Zecevic, 2004). Die immunhistochemischen Färbungen mit CALEB/NGC und Nestin zeigten eine Koexpression beider Moleküle im Gehirn sowie in der Retina. Insbesondere in der Ventrikularzone des Prosencephalon wurde dies sehr deutlich, da sie dort nicht durch weitere CALEB/NGC-positive Strukturen, wie das Striatum, die Unterplatte und die Marginalzone, überdeckt war. Jedoch auch in der kortikalen Platte und der Marginalzone konnte eine Koexpression in radialen Zellfortsätzen ausgemacht werden.

In der Ventrikularzone/Subventrikularzone der Ganglienhügel war das Fluoreszenzsignal in den radialen Neuriten am intensivsten. Da Nestin neben den Radialglia auch von Proneuronen exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, dass CALEB/NGC gleichermaßen von diesen Zellen exprimiert wird. In dieser Region kommen insbesondere die Proneurone in Frage, die für das Striatum bestimmt sind. Der Großteil der striatalen Projektionsneurone entsteht in der periventrikulären Keimzone des lateralen Ganglienhügels und wandert von dort aus in das Striatum ein (Hamasaki et al., 2003). Für unterschiedliche CSPG wurde eine rege pränatale Expression im Striatum beobachtet und somit ein Zusammenhang mit der striatalen Entwicklung postuliert (Charvet et al., 1998). So könnte auch CALEB/NGC in den striatalen Proneuronen in der VZ sowie während und nach vollendeter Migration im Striatum exprimiert werden.

Ein ähnliches Expressionsmuster wie in der VZ/SVZ des Striatums bestand auch in den späten pränatalen Entwicklungsstadien zwischen dem Nucleus septalis lateralis und der Wand des lateralen Ventrikels, welches neben den Radialglia auch den Fortsätzen der erst spät entstehenden und migrierenden Neurone der lateralen septalen Kerne entsprechen könnte (Horváth et al., 1988).

Nestin wird neben den neuronalen Vorläuferzellen und den Radialglia zudem von den Müllerglia in der Retina exprimiert (Frederiksen und McKay, 1988; Walcott und Provis, 2003). Die Müllerglia besitzen wie die Radialglia im Gehirn eine radiale Morphologie und überspannen mit ihren Fortsätzen die gesamte Retina. Sie entstehen zwischen E18 (entsprechend E16,5 bei der Maus) und P12 bei der Ratte (Rapaport et al., 2004). Da bei der Maus bereits an E14, also bereits vor der Bildung der Müllerglia, Nestin/CALEB/NGC-koexprimierende radiale Neuriten in der Retina sichtbar waren, ist davon auszugehen, dass diese immunpositiven Strukturen nicht den Müllerglia entsprechen. Die Vorläufer der Ganglienzellen besitzen ebenfalls eine radiale Struktur mit langen Fortsätzen, die sich über die gesamte Dicke der Retina erstrecken (Hinds und Hinds, 1974). Der derzeitige

Kenntnisstand erlaubt daher am ehesten die Annahme, dass die CALEB/NGC-Expression in der Retina den neuronalen Vorläuferzellen zugeordnet werden kann.

Es ist also davon auszugehen, dass CALEB/NGC sowohl in neuronalen Vorläuferzellen als auch in den Radialglia exprimiert wird. Aufgrund dieser CALEB/NGC-Expression in den Proneuronen sowie in den für die radiale Migration von Neuronen elementaren Gliazellen ist anzunehmen, dass das Protein wichtig ist für die Funktion oder den Erhalt dieser Zellen.

Weitere Hinweise auf eine Expression von CALEB/NGC in jungen Neuronen liefern die Kofärbungen gegen das Protein Doublecortin, welches während der embryonalen Entwicklung speziell in migrierenden Neuronen exprimiert wird (Gleeson et al., 1999; Francis et al., 1999). Eine Koexpression zeigte sich in der Retina vornehmlich in der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht und im Gehirn insbesondere in der Unterplatte und der Marginalzone sowie in einigen tangential ausgerichteten Fasern in der Intermediärzone. Diese immunpositiven Neuriten besaßen die typische, tangential ausgerichtete Morphologie von Interneuronen und deuten somit auch auf eine Expression von CALEB/NGC in Interneuronen hin. Für Doublecortin ist die Expression in Interneuronen bereits von Friocourt et al. (2007) beschrieben worden. Die Interneurone haben ihren Ursprung in den Ganglienhügeln und gelangen mittels tangentialer Migration in den telencephalen Kortex (Métin et al., 2006). Auf ihrem Weg wandern sie vor allem in der Intermediärzone, aber auch in der Marginalzone und der Unterplatte (E13-15) und später in der inneren IZ am Rande zur SVZ zusätzlich zur MZ und UP (Andrews et al., 2007). Aufgrund der immunpositiven Interneurone in der IZ und einer ebenfalls bedeutenden Doublecortin/CALEB/NGC-Koexpression in der Marginalzone und Unterplatte, ist es denkbar, dass auch dort die Expression neben derjenigen in den exzitatorischen Kortexneuronen teilweise auch in Interneuronen stattfindet. Dass CALEB/NGC in der IZ und der SVZ nur spärlich vorhanden ist, schließt die Möglichkeit einer Expression in Interneuronen nicht aus, da diese eine sehr heterogene Population mit besonderen morphologischen und elektrophysiologischen Charakteristika sind, die bereits in den Vorläuferzellen kodiert werden (Butt et al., 2005). Es wäre also denkbar, dass CALEB/NGC von spezifischen Interneuron-Subpopulationen exprimiert wird, die für ihre Migration zum Bestimmungsort bevorzugt die MZ und UP durchwandern.

Im Hinblick auf die bisherigen Erkenntnisse zu den Funktionen von CALEB/NGC bezüglich des Neuritenwachstums sowie der Dendritenverzweigung erscheint es durchaus möglich, dass CALEB/NGC sowohl in den Fortsätzen der Radialglia als auch in migrierenden Neuronen

vorkommt und zugleich Einfluss auf die Neuritogenese hat. Die Zellmigration und die Neuritogenese sind eng miteinander verknüpft. So ist das Auswachsen von Neuriten ein wesentlicher Bestandteil des Migrationsvorgangs. Es wird zwischen zwei Arten der Migration unterschieden: der somalen Translokation und der gliagelenkten Migration. Bei der somalen Translokation, die die vorherrschende Migrationsart vor der Entstehung der kortikalen Platte ist, migriert die Zelle, die mittels eines langen Fortsatzes an der Pia mater befestigt ist, indem sie ihr Zellsoma kontinuierlich in diese Richtung bewegt. Bei der gliagelenkten Migration besitzen die Zellen kürzere Fortsätze und bewegen ihr Soma saltatorisch in Richtung Pia mater. Sobald der leitende Fortsatz Kontakt zur Marginalzone aufgenommen hat, erfolgt die restliche Migration ebenfalls im Sinne der somalen Translokation (Nadarajah und Parnavelas, 2002). Mutationen in Genen, welche für das Neuritenwachstum wichtig sind, können demzufolge zu Migrationsdefekten führen. Beispielsweise ist Doublecortin mit der Stabilisierung der Mikrotubuli assoziiert, welche als Teil des Zytoskeletts lange dichte Bündel in Axonen und Dendriten formen und ihnen somit strukturellen Halt gewähren (Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999; Dent et al., 2003). Eine Mutation im Doublecortin-Gen verursacht eine fehlerhafte Schichtenbildung des Kortex mit Entwicklung des Krankheitsbildes des doppelten Kortex und der Lissencephalie (Des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998).

Somit wäre auch für CALEB/NGC eine Rolle sowohl beim Neuritenwachstum als auch bei der Zellmigration denkbar. Um diese Annahmen zu bestätigen, sind jedoch weiterführende Experimente erforderlich (s. Abschnitt 4.7).

4.6 Mögliche Interaktionspartner in den Embryonalstadien

Für CALEB/NGC sind mehrere Bindungspartner ermittelt worden. Es bleibt jedoch zu eruieren, mit welchen dieser Bindungspartner CALEB/NGC pränatal interagieren könnte. Von einigen dieser Moleküle ist bekannt, dass sie auch pränatal im Gehirn exprimiert werden, womit eine Interaktion auch in embryonalen Entwicklungsstadien prinzipiell möglich wäre.

Mithilfe von CALEB/NGC-überexprimierenden Neuroblastom-Zellkulturen, die mit Midkine beschichtet waren, fanden Ichikara-Tanaka et al. (2006) eine Beteiligung von CALEB/NGC am Neuritenwachstum als Interaktionspartner von Midkine. Eine rege Midkine-Expression wurde bereits an E7-E9 im Gehirn der Maus ermittelt, ab E11 wurde die Expression allmählich eingeschränkt, bis an E15 nur noch in der Niere eine Expression in signifikanten Mengen gefunden werden konnte (Kadomatsu et al., 1990). In E11-Gehirnen befand sich Midkine-mRNA vermehrt im Ektoderm um die retinale Linse, um die Gehirnv ventrikel herum und im Hypophysenvorderlappen (Kadomatsu et al., 1990). An E13 war das Molekül im

Cerebrum wie auch im Cerebellum vorhanden mit einer Lokalisation vor allem an Zelloberflächen, aber auch in der Retina (Muramatsu et al., 1993). Es wurde postuliert, dass Midkine eine Rolle einnimmt bei Neuritenwachstum und -lenkung und der Migration von neuronalen Zellen im embryonalen Gehirn (Muramatsu et al., 1993; Kaneda et al., 1996; Maeda et al., 1999). Aufgrund der sich überlappenden Expressionsphasen ist also denkbar, dass CALEB/NGC mit Midkine als Interaktionspartner bis in die mittlere Gestationsphase an Neuritenwachstumsprozessen, Neuritenlenkung oder an Migrationsprozessen beteiligt ist.

Auch von den Interaktionspartnern Tenascin (Tn)-C und -R ist bekannt, dass sie pränatal im Gehirn exprimiert werden. Tn-C ist bereits während der Gastrulation und Somitenformation vorhanden (Crossin et al., 1986). Es wird im Gehirn von Gliazellen gebildet und ist vor allem sehr prominent an den Fortsätzen der Radialglia und der Bergmannglia im Cerebellum sowie vermutlich in Astrozytenvorläufern im Cerebrum (Crossin et al., 1986; Kawano et al., 1995; Yuasa, 2001). Tn-R wird hauptsächlich von Oligodendrozyten und erst spät in der Entwicklung zum Zeitpunkt der Myelinisierung exprimiert (Fuss et al., 1993).

Der Vergleich mit den Expressionsstudien zu Tenascin-C zeigt eine gemeinsame regionale Expression mit CALEB/NGC u.a. in der Marginalzone und Unterplatte des Kortex, in der äußeren plexiformen Schicht und Glomerularschicht des Bulbus olfactorius, in der Retina in einem radialen Muster, in der optischen Nervenfaserschicht und der inneren plexiformen Schicht sowie in Radialglia-Fortsätzen des Gehirns (Crossin et al., 1986; Schumacher et al., 1997; Sheppard et al., 1991; Shay et al., 2008). Bezüglich des Moleküls Tenascin-R ergeben sich Ähnlichkeiten des Expressionsmusters mit CALEB/NGC insbesondere im hippocampalen Fornix und in den Fimbrien (Fuss et al., 1993).

Schumacher et al. (1997) führten immunhistochemische Kofärbungen von CALEB/NGC und Tenascin-R in der pränatalen Retina und im Cerebellum beim Huhn durch. Dort fand sich eine Koexpression im Stratum plexiforme internum, den Müllerzell-Fortsätzen und den cerebellären Purkinjezellen mit ihren Dendriten.

Die überlappenden Expressionszeitpunkte im Gehirn sowie die regionale Koexpression deuten auf die Möglichkeit hin, dass CALEB/NGC und die Tenascine im embryonalen Mausgehirn miteinander interagieren. Tenascin-C und -R sind sehr vielseitige Moleküle; ihnen wurde eine modulierende Funktion bei Neuritenwachstumsprozessen zugeschrieben, zudem an neuronaler Vorläuferzellmigration und -proliferation (Faissner, 1997). In den einwachsenden Fila olfactoria und im Rückenmark in der Zone des Eintritts der Hinterwurzel wurde für die Tenascine auch eine Rolle als Axonbarriere postuliert (Pindzola et al., 1993;

Shay et al., 2008). In Hinblick auf diese Funktionen ist eine Interaktion von CALEB/NGC mit den Tenascinen durchaus denkbar.

Bezüglich der Expression des mutmaßlichen CALEB/NGC-Bindungspartners ErbB3 im Embryonalalter herrscht Uneinigkeit. So wiesen Abe et al. (2009) eine ErbB3-Expression mittels Immunhistochemie und *in-situ*-Hybridisierung im Mesencephalon der Maus erst ab P3 nach und auch im Mauserebellum war ErbB3 nicht vor P3 vorhanden (Ozaki et al., 1998). Kornblum et al. (2000) wiederum ermittelten ebenfalls mittels *in-situ*-Hybridisierung bereits ab E13 bei der Ratte eine Expression im Keimepithel des ventralen Diencephalons und des rostralen Mittelhirns. Aufgrund dieser Unstimmigkeit ist nicht geklärt, ob ErbB3 einen potentiellen Liganden für CALEB/NGC in der pränatalen Entwicklung darstellen könnte.

Die Interaktion von CALEB/NGC mit B56 β , einer Untergruppe der regulatorischen Untereinheit B der Protein Phosphatase 2A hat nachweislich Auswirkungen auf die Dendritenkomplexität (Brandt et al., 2008; Shi, 2009). Im Northern-Blot zeigte sich eine pränatale Expression von B56 β im Mausgehirn mit dem höchsten Expressionslevel an E11 und E15 (Martens et al., 2004). *In-situ*-Hybridisierung zur genaueren Expressionsanalyse erfolgte nur in adulten Mausgehirnen. Es ist somit bisher nicht bekannt, in welchen Regionen B56 β im pränatalen Gehirn exprimiert wird und welche Rolle es einnimmt. Daher kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt werden, wie wahrscheinlich eine pränatale Interaktion von CALEB/NGC mit der Protein Phosphatase 2A ist.

Aufgrund des mittels Immunblots an Gehirnextrakten auch pränatal nachgewiesenen Vorkommens des Golgi-assoziierten Proteins PIST ist eine Interaktion mit CALEB/NGC prinzipiell denkbar (Hassel et al., 2003; Ito et al., 2006). Damit könnte PIST auch pränatal am intrazellulären Transport von CALEB/NGC beteiligt sein.

Aufgrund des gemeinsamen pränatalen Vorkommens einiger bekannter Bindungspartner ist eine Interaktion mit CALEB/NGC in diesen Entwicklungsstadien prinzipiell möglich. Genauere Expressionsstudien bestehen jedoch lediglich hinsichtlich der Tenascin-C-Expression. Bezüglich der Moleküle Midkine, ErbB3, B56 β und PIST fehlen hinreichende Expressionsanalysen im pränatalen Gehirn, um Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion treffen zu können.

4.7 Ausblick

Diese immunhistochemische Studie stellt die Expression des Proteins CALEB/NGC in verschiedenen Entwicklungsstadien und Gehirnregionen bei der Maus dar. Durch die Analyse

von Gehirnschnitten in drei unterschiedlichen Schnittebenen mit einem sehr spezifischen Antikörper war eine Beschreibung des spatiotemporalen Expressionsmusters möglich. Aufgrund des Expressionsverhaltens von CALEB/NGC auch hinsichtlich der Kofärbungen konnten Rückschlüsse auf eine potentielle Funktion des Proteins im embryonalen Gehirn gezogen werden, eine immunhistochemische Studie kann jedoch nicht die endgültige Aufklärung über die Funktion eines Moleküls erbringen. Sie vermag lediglich Hinweise zu liefern und dient der Erschaffung einer Basis für weiterführende Experimente.

Aufgrund der Vielfältigkeit der bekannten Interaktionspartner von CALEB/NGC, seiner Multidomänen-Struktur, dem zeitlich regulierten Vorkommen mit oder ohne Glykosaminoglykan-Seitenkette, sowie auch dem Regulationsmechanismus der Abspaltung der Ektodomäne sind parallel unterschiedliche Funktionen für CALEB/NGC während der Gehirnentwicklung denkbar.

Für die weitere Aufklärung der Funktion von CALEB/NGC in Embryonalstadien sollte seine Assoziation mit Neuriten näher untersucht werden, auch hinsichtlich einer möglichen Auswirkung auf die Zellmigration. Sinnvoll ist die Züchtung einer „knock-out“-Maus, bei der die Auswirkung der Ausschaltung des Proteins studiert werden kann. Jüttner et al. (2005) stellten bereits eine CALEB/NGC-defiziente Maus her, in der jedoch keine morphologischen Unterschiede hinsichtlich der Gehirnstruktur gefunden wurden. Es konnte lediglich beobachtet werden, dass sich die Muttertiere weniger um ihren Nachwuchs kümmerten. Es wäre dennoch vonnöten, an einer „knock-out“-Maus nicht nur nach einem groben Phänotyp zu suchen, sondern zum Beispiel auch den Verlauf von Nervenbahnen und das Dendritenwachstum sowie einzelne Zelltypen mittels Kofärbungen zu studieren. Leider wird bei „knock-out“-Mäusen recht häufig die Ausprägung eines Phänotyps durch Hochregulation anderer Gene kompensiert (Hertzog und Kola, 2009). Eine bessere Möglichkeit wäre daher die Herstellung und Analyse konditionierter „knock-out“-Mäuse. Bei diesem Modell kann ein Gen in bestimmten Regionen zu spezifischen Zeiten ausgeschaltet werden und damit die Gefahr eines vermindert ausgeprägten Phänotyps durch Kompensationsmechanismen anderer Proteine reduziert werden (Hertzog und Kola, 2009).

Eine weitere, sehr elegante Methode zur *in vivo*-Untersuchung beispielsweise von Migrationsprozessen ist die *in utero*-Elektroporation, bei der unterschiedliche Vektoren in die Gehirne eingebracht werden, während sich die Embryonen noch im Uterus des Muttertiers befinden (Wang und Mei, 2013). Die Embryonen werden weiter ausgetragen und nach einer beliebigen Anzahl von Tagen getötet. Der Vorteil ist auch hier ein plötzlicheres Eingreifen in

die Entwicklungsprozesse und dadurch die Minimierung von Kompensationsmöglichkeiten. Man kann zudem unterschiedliche Vektoren anwenden, die das Protein entweder ausschalten, nur leicht herunterregulieren oder hochregulieren.

Ferner sollte die Bedeutung der CALEB/NGC-Expression in den Mittellinienglia und am Rande von Axontrakten beleuchtet werden in Hinblick auf eine Beteiligung an Axonlenkungsvorgängen. Auch hierfür wären die „knock-out“-Maus und die *in utero*-Elektroporation mögliche Ansätze, eventuell in Kombination mit einer Markierung von spezifischen Axontrakten durch Einbringen von DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) in ihre Ursprungsneurone.

5 Literaturverzeichnis

Abe Y, Namba H, Zheng Y, Nawa H. In situ hybridization reveals developmental regulation of ErbB1-4 mRNA expression in mouse midbrain: implication of ErbB receptors for dopaminergic neurons. *Neuroscience*. 2009 Jun 16;161(1):95-110.

Ahsan M, Riley KL, Schubert FR. Molecular mechanisms in the formation of the medial longitudinal fascicle. *J Anat*. 2007 Aug;211(2):177-87.

Alessi, DR, Andjelkovic, M, Caudwell, B et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6541-51.

Allen Developing Mouse Brain Atlas [Internet]. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science, 2009. (Accessed March 31, 2012, at <http://developingmouse.brain-map.org>)

Anderson SA, Eisenstat DD, Shi L, Rubenstein JL. Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on *Dlx* genes. *Science*. 1997 Oct 17;278(5337):474-6.

Andrews WD, Barber M, Parnavelas JG. Slit-Robo interactions during cortical development. *J Anat*. 2007 Aug;211(2):188-98.

Ang ES Jr, Haydar TF, Gluncic V, Rakic P. Four-dimensional migratory coordinates of GABAergic interneurons in the developing mouse cortex. *J Neurosci*. 2003 Jul 2;23(13):5805-15.

Aono S, Keino H, Ono T et al. Genomic organization and expression pattern of mouse Neuroglycan C in the cerebellar development. *J Biol Chem* 2000;275:337-42.

Aono S, Tokita Y, Shuo T et al. Glycosylation site for chondroitin sulfate on the neural part-time proteoglycan, neuroglycan C. *J Biol Chem*. 2004 Nov 5;279(45):46536-41.

Aono S, Tokita Y, Yasuda Y et al. Expression and identification of a new splice variant of neuroglycan C, a transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in the human brain. *J Neurosci Res*. 2006 Jan;83(1):110-8.

Asan E und Kugler P. Zwischenhirn. In: Drenckhahn D, Benninghoff, eds. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie*, Band 2. Sixteenth Edition, München: Elsevier GmbH, 2004:420-424.

Avnur Z and Geiger B. Immunocytochemical localization of native chondroitin-sulfate in tissues and cultured cells using specific monoclonal antibody. *Cell*. 1984 Oct;38(3):811-22.

Bhattacharjee J. Sequential differentiation of retinal cells in the mouse studied by diaphorase staining. *J Anat*. 1977 Apr;123(Pt 2):273-82.

Bicknese AR, Sheppard AM, O'Leary DDM, Pearlman AL. Thalamocortical axons extend along a chondroitin sulphate proteoglycan-enriched pathway coincident with the neocortical subplate and distinct from the efferent path. *J Neurosci*. 1994;14(6):3500-3510.

- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 1985 Oct;101(4):1371-8.
- Birbaumer N und Schmidt RF. Funktionen des Nervensystems und Verhalten. In: Birbaumer N und Schmidt RF eds. *Biologische Psychologie.* 6th ed., Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2006: 539-541.
- Braga-de-Souza S and Lent R. Temporal and spatial regulation of chondroitin sulfate, radial glial cells, growing commissural axons, and other hippocampal efferents in developing hamsters. *J Comp Neurol.* 2004 Jan 6;468(2):217-32.
- Brandt N, Franke K, Rasin MR et al. The neural EGF family member CALEB/NGC mediates dendritic tree and spine complexity. *EMBO J.* 2007 May 2;26(9):2371-86.
- Brandt N, Franke K, Johannes S et al. B56beta, a regulatory subunit of protein phosphatase 2A, interacts with CALEB/NGC and inhibits CALEB/NGC-mediated dendritic branching. *FASEB J.* 2008 Jul;22(7):2521-33.
- Brittis PA, Canning DR, Silver J. Chondroitin sulfate as a regulator of neuronal patterning in the retina. *Science.* 1992 Feb 7;255(5045):733-6.
- Bronner-Fraser M and Hatten MB. Neurogenesis and Migration. In: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, eds. *Fundamental Neuroscience.* Second Edition, San Diego, CA: Academic Press, 2003:403-407.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S et al. The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron.* 2005 Nov 23;48(4):591-604.
- Caviness VS Jr. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based upon [³H]thymidine autoradiography. *Brain Res.* 1982 Jul;256(3):293-302.
- Charvet I, Hemming FJ, Feuerstein C, Saxod R. Mosaic distribution of chondroitin and keratan sulphate in the developing rat striatum: possible involvement of proteoglycans in the organization of the nigrostriatal system. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998 Aug 8;109(2):229-44.
- Chung KY, Shum DK, Chan SO. Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in the chiasm of mouse embryos. *J Comp Neurol.* 2000 Feb 7;417(2):153-63.
- Chung KY, Taylor JS, Shum DK, Chan SO. Axon routing at the optic chiasm after enzymatic removal of chondroitin sulfate in mouse embryos. *Development.* 2000 Jun;127(12):2673-83.
- Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol.* 1977 Oct 25;116(2):207-25.
- Crossin KL, Hoffman S, Grumet M, Thierry JP, Edelman GM. Site-restricted expression of cytotactin during development of the chicken embryo. *J Cell Biol.* 1986 May;102(5):1917-30.
- Crow YJ, Jackson AP, Roberts E et al. Aicardi-Goutières syndrome displays genetic heterogeneity with one locus (AGS1) on chromosome 3p21. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul;67(1):213-21.

D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 1995 Apr 20;374(6524):719-23.

Denaxa M, Chan CH, Schachner M, Parnavelas JG, Karageos D. The adhesion molecule TAG-1 mediates the migration of cortical interneurons from the ganglionic eminence along the corticofugal fiber system. *Development*. 2001 Nov;128(22):4635-44.

Dent EW, Tang F, Kalil K. Axon guidance by growth cones and branches: common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist*. 2003 Oct;9(5):343-53.

Des Portes V, Francis F, Pinard JM et al. Doublecortin is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet*. 1998 Jul;7(7):1063-70.

Dickson BJ and Gilestro GF. Regulation of commissural axon pathfinding by slit and its Robo receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:651-75.

Drenckhahn D und Rager G. Visuelles System. In: Drenckhahn D, Benninghoff A, eds. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie, Band 2*. Sixteenth Edition, München: Elsevier GmbH, 2004:651.

Evans OB. Chapter 5: Development of the Nervous System. In: Haines DE, eds. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications, Fourth Edition*, Philadelphia: Saunders, 2012:63-80.

Dunlop SA, Tee LB, Lund RD, Beazley LD. Development of primary visual projections occurs entirely postnatally in the fat-tailed dunnart, a marsupial mouse, *Sminthopsis crassicaudata*. *J Comp Neurol*. 1997 Jul 21;384(1):26-40.

Faissner A. The tenascin gene family in axon growth and guidance. *Cell Tissue Res*. 1997 Nov;290(2):331-41.

Francis F, Koulakoff A, Boucher D et al. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron*. 1999 Jun;23(2):247-56.

Frederiksen K and McKay RD. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*. 1988 Apr;8(4):1144-51.

Friedlander MJ and Torres-Reveron J. The changing roles of neurons in the cortical subplate. *Front Neuroanat*. 2009;3:15.

Friocourt G, Liu JS, Antypa M, Rakic S, Walsh CA, Parnavelas JG. Both doublecortin and doublecortin-like kinase play a role in cortical interneuron migration. *J Neurosci*. 2007 Apr 4;27(14):3875-83.

Fuss B, Wintergerst ES, Bartsch U, Schachner M. Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *J Cell Biol*. 1993 Mar;120(5):1237-49.

- Garcion E, Faissner A, French-Constant C. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 2001;128:2485-96.
- Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol*. 2008 Feb;38(2):165-9.
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW et al. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 1998 Jan 9;92(1):63-72.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. 1999 Jun;23(2):257-71.
- Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development*. 1987 Dec;101(4):697-713.
- Godement P, Salaün J, Mason CA. Retinal Axon Pathfinding in the Optic Chiasm: Divergence of Crossed and Uncrossed Fibers. *Neuron*. 1990 Aug;5(2):173-86.
- Guillery RW, Mason CA, Taylor JS. Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J Neurosci*. 1995 Jul;15(7 Pt 1):4727-37.
- Hamasaki T, Goto S, Nishikawa S, Ushio Y. Neuronal cell migration for the developmental formation of the mammalian striatum. *Brain Res Brain Res Rev*. 2003 Jan;41(1):1-12.
- Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. 1992 Feb 1;6(3):861-70.
- Hassel B, Schreff M, Stübe EM, Blaich U, Schumacher S. CALEB/NGC interacts with the Golgi-associated protein PIST. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):40136-43.
- Hertzog PJ, Kola I. Overview: Gene Knockouts. In: Tymms MJ and Kola I, eds. *Gene knockout protocols*, First Edition, Totowa, N.J.: Humana Press, 2001: 1-10.
- Hevner RF, Neogi T, Englund C, Daza RA, Fink A. Cajal-Retzius cells in the mouse: transcription factors, neurotransmitters, and birthdays suggest a pallial origin. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003 Mar 14;141(1-2):39-53.
- Hikosaka O, Sesack SR, Lecourtier L, Shepard PD. Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. *J Neurosci*. 2008 Nov 12;28(46):11825-9.
- Hinds JW and Hinds PL. Early ganglion cell differentiation in the mouse retina: an electron microscopic analysis utilizing serial sections. *Dev Biol*. 1974 Apr;37(2):381-416.
- Hockfield S and McKay RD. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*. 1985 Dec;5(12):3310-28.

Hoffman-Kim D, Lander AD, Jhaveri S. Patterns of chondroitin sulphate immunoreactivity in the developing Tectum reflect regional differences in glycosaminoglycan biosynthesis. *J Neurosci*. 1998 Aug 1;18(15):5881-90.

Horváth S, Szabó K, Gulyás M, Palkovits M. Ontogenetic development of septal nuclei in the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 1988;177(3):267-75.

Ichihara-Tanaka K, Oohira A, Rumsby M, Muramatsu T. Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *J Biol Chem*. 2006 Oct 13;281(41):30857-64.

Ida M, Shuo T, Hirano K et al. Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem cells. *JBC* 2006;281:5982–5991.

Inatani M, Tanihara H, Oohira A et al. Neuroglycan C, a neural tissue-specific transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan, in retinal neural network formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4338–46.

Inta D, Alfonso J, von Engelhardt J et al. Neurogenesis and widespread forebrain migration of distinct GABAergic neurons from the postnatal subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20994-9.

Ishikawa K, Nitta A, Mizoguchi H et al. Effects of single and repeated administration of methamphetamine or morphine on neuroglycan C gene expression in the rat brain. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006 Aug;9(4):407-15.

Ito H, Iwamoto I, Mizutani K et al. Possible interaction of a Rho effector, Rhotekin, with a PDZ-protein, PIST, at synapses of hippocampal neurons. *Neurosci Res*. 2006 Oct;56(2):165-71.

Jhaveri S. Midline glia of the Tectum: a barrier for developing retinal axons. *Perspect Dev Neurobiol*. 1993;1(4):237-43.

Joosten EA and Gribnau AA. Astrocytes and guidance of outgrowing corticospinal tract axons in the rat. An immunocytochemical study using anti-vimentin and anti-glial fibrillary acidic protein. *Neuroscience*. 1989;31(2):439-52.

Jüttner R, Moré MI, Das D et al. Impaired synapse function during postnatal development in the absence of CALEB, an EGF-like protein processed by neuronal activity. *Neuron*. 2005 Apr 21;46(2):233-45.

Kadomatsu K, Huang RP, Suganuma T, Murata F, Muramatsu T. A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis. *J Cell Biol*. 1990 Mar;110(3):607-16.

Kandler K and Friauf E. Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 1993 Feb 8;328(2):161-84.

Kaneda N, Talukder AH, Nishiyama H, Koizumi S, Muramatsu T. Midkine, a heparin-binding growth/differentiation factor, exhibits nerve cell adhesion and guidance activity for neurite outgrowth in vitro. *JBC* 1996;119:1150-1156.

- Kawano H, Ohyama K, Kawamura K, Nagatsu I. Migration of dopaminergic neurons in the embryonic mesencephalon of mice. *Brain Res Dev Brain Res*. 1995 May 26;86(1-2):101-13.
- Kinugasa Y, Ishiguro H, Tokita Y, Oohira A, Ohmoto H, Higashiyama S. Neuroglycan C, a novel member of the neuregulin family. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep 3;321(4):1045-9.
- Kornblum HI, Gianni DS, Easterday MC, Seroogy KB. Expression of the EGF receptor family members ErbB2, ErbB3, and ErbB4 in germinal zones of the developing brain and in neurosphere cultures containing CNS stem cells. *Dev Neurosci*. 2000;22(1-2):16-24.
- Kugler P. Kleinhirn. In: Drenckhahn D, Benninghoff, eds. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie, Band 2*. Sixteenth Edition, München: Elsevier GmbH, 2004a:384-389.
- Kugler P. Rückenmark. In: Drenckhahn D, Benninghoff, eds. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie, Band 2*. Sixteenth Edition, München: Elsevier GmbH, 2004b:284-289.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. Bd. 227, S. 680-685.
- Lavdas AA, Grigoriou M, Pachnis V, Parnavelas JG. The medial ganglionic eminence gives rise to a population of early neurons in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 1999 Sep 15;19(18):7881-8.
- Lee EJ, Kim IB, Lee E, Kwon SO, Oh SJ, Chun MH. Differential expression and cellular localization of doublecortin in the developing rat retina. *Eur J Neurosci*. 2003 Apr;17(8):1542-8.
- López-Mascaraque L and de Castro F. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death Differ*. 2002 Dec;9(12):1279-86.
- Lynch JC, Corbett JJ. Chapter 20: The Visual System. In: Haines DE, eds. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications, Fourth Edition*, Philadelphia: Saunders, 2012: 267-286.
- Maeda N, Ichihara-Tanaka K, Kimura T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Noda M. A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta. *JBC* 1999;274:12474-12479.
- Marín O and Rubenstein JLR. Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci*. 2003;26:441-83.
- Martens E, Stevens I, Janssens V et al. Genomic organisation, chromosomal localisation tissue distribution and developmental regulation of the PR61/B' regulatory subunits of protein phosphatase 2A in mice. *J Mol Biol*. 2004 Feb 27;336(4):971-86.
- Mastick GS and Easter SS Jr. Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev Biol*. 1996 Jan 10;173(1):79-94.

McCright B and Virshup DM. Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26123-8.

Métin C, Baudoin JP, Rakić S, Parnavelas JG. Cell and molecular mechanisms involved in the migration of cortical interneurons. *Eur J Neurosci.* 2006 Feb;23(4):894-900.

Mokry J, Čížková D, Filip S et al. *Stem Cells and Development.* December 2004, 13(6): 658-664.

Muramatsu H, Shirahama H, Yonezawa S, Maruta H, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible growth/differentiation factor: immunochemical evidence for the function and distribution. *Dev Biol.* 1993 Oct;159(2):392-402.

Nadarajah B and Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Jun;3(6):423-32.

Nakanishi K, Aono S, Hirano K et al. Identification of neurite outgrowth-promoting domains of Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, and involvement of PI3K and PKC signaling pathways in the neuritogenesis. *JBC* 2006;281:24970-8.

Nery S, Fishell G, Corbin JG. The caudal ganglionic eminence is a source of distinct cortical and subcortical cell populations. *Nat Neurosci.* 2002 Dec;5(12):1279-87.

Neuhuber W. Hirnstamm. In: Drenckhahn D, Benninghoff, eds. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie, Band 2.* Sixteenth Edition, München: Elsevier GmbH, 2004:326-330.

Olney JW. An electron microscopic study of synapse formation, receptor outer segment development, and other aspects of developing mouse retina. *Invest Ophthalmol.* 1968 Jun;7(3):250-68.

Oohira A, Matsui F, Tokita Y, Yamauchi S, Aono S. Molecular interactions of neural chondroitin sulfate proteoglycans in the brain development. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Feb 1;374(1):24-34.

Owada K, Sanjyo N, Kobayashi T et al. Midkine inhibits apoptosis via extracellular signal regulated kinase (ERK) activation in PC12 cells. *J Med Dent Sci.* 1999 Mar;46(1):45-51.

Ozaki M, Kishigami S, Yano R. Expression of receptors for neuregulins, ErbB2, ErbB3 and ErbB4, in developing mouse cerebellum. *Neurosci Res.* 1998 Apr;30(4):351-4.

Papasozomenos SC, Binder LI. Phosphorylation determines two distinct species of Tau in the central nervous system. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1987;8(3):210-26.

Pindzola RR, Doller C, Silver J. Putative inhibitory extracellular matrix molecules at the dorsal root entry zone of the spinal cord during development and after root and sciatic nerve lesions. *Dev Biol.* 1993 Mar;156(1):34-48.

Rapaport DH, Wong LL, Wood ED, Yasumura D, LaVail MM. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol.* 2004 Jun 21;474(2):304-24.

Robinson SR and Dreher B. The visual pathways of eutherian mammals and marsupials develop according to a common timetable. *Brain Behav Evol.* 1990;36(4):177-95.

Röhrenbeck J, Wässle H, Boycott BB. Horizontal Cells in the Monkey Retina: Immunocytochemical staining with antibodies against calcium binding proteins. *Eur J Neurosci.* 1989 Sep;1(5):407-420.

Rosen GD, Williams AG, Capra JA et al. [Internet]. The Mouse Brain Library, 2000. Int Mouse Genome Conference 14: 166. (Accessed April 4, 2012, at <http://www.epmba.org/gd16coronal/index.php>).

Ross ME and Walsh CA. Human brain malformations and their lessons for neuronal migration. *Annu. Rev. Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1041-70.

Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S. Slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev.* 1990 Dec;4(12A):2169-87.

Sandoval-Minero T and Varela-Echavarría A. Cross-midline interactions between mouse commissural hindbrain axons contribute to their efficient decussation. *Dev Neurobiol.* 2008 Feb 15;68(3):349-64.

Schambra UB, Lauder JM, Silver J, eds. Atlas of the prenatal mouse brain. First Edition, New York, USA: Academic Press, 1992:89-327.

Schumacher S, Volkmer H, Buck F et al. Chicken acidic leucine-rich EGF-like domain containing brain protein (CALEB), a neural member of the EGF-family of differentiation factors, is implicated in neurite formation, *J Cell Biol* 1997;136:895–906.

Schumacher S, Jung M, Norenberg U et al. CALEB binds via its acidic stretch to the fibrinogen-like domain of tenascin-C or tenascin-R and its expression is dynamically regulated after optic nerve lesion. *JBC* 2001;276:7337–7345.

Schumacher S and Stübe EM. Regulated binding of the fibrinogen-like domains of tenascin-R and tenascin-C to the neural EGF family member CALEB. *Journal of Neurochemistry* 2003;87:1213–1223.

Shay EL, Greer CA, Treloar HB. Dynamic expression patterns of ECM molecules in the developing mouse olfactory pathway. *Dev Dyn.* 2008 Jul;237(7):1837-50.

Sheppard AM, Hamilton SK, Pearlman AL. Changes in the distribution of extracellular matrix components accompany early morphogenetic events of mammalian cortical development. *J Neurosci.* 1991 Dec;11(12):3928-42.

Shi Y. Assembly and structure of protein phosphatase 2A. *Sci China C Life Sci.* 2009 Feb;52(2):135-46.

Shuo T, Aono S, Matsui F et al. Developmental changes in the biochemical and immunological characters of the carbohydrate moiety of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan. *Glycoconj J.* 2004;20(4):267-78.

Shuo T, Aono S, Nakanishi K et al. Ectodomain shedding of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, by TIMP-2- and TIMP-3-sensitive proteolysis. *J Neurochem.* 2007 Sep;102(5):1561-8.

Simpson KL, Sweazey RD. Chapter 23: Olfaction and Taste. In: Haines DE, eds. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications, Fourth Edition*, Philadelphia: Saunders, 2012:313-323.

Smart IH and Smart M. Growth patterns in the lateral wall of the mouse telencephalon: I. Autoradiographic studies of the histogenesis of the isocortex and adjacent areas. *J Anat.* 1982 Mar;134(Pt 2):273-98.

So HC, Fong PY, Chen RY et al. Identification of neuroglycan C and interacting partners as potential susceptibility genes for schizophrenia in a Southern Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2010 Jan 5;153B(1):103-13.

Swanson LW. The Architecture of Nervous Systems. In: Squire LR, Bloom FE, McConnel SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, eds. *Fundamental Neuroscience. Second Edition*, San Diego, CA: Academic Press, 2003:25-29.

Tabata H and Nakajima K. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience.* 2001;103(4):865-72.

Takano T and Becker LE. Developmental change of the nestin-immunoreactive midline raphe glial structure in human brainstem and spinal cord. *Dev Neurosci.* 1997;19(2):202-9.

Taupin P. Development of the hippocampus. In: Taupin P, eds. *The hippocampus – Neurotransmission and plasticity in the nervous system.* 1st edition, New York: Nova Publishers, 2007: 93-97.

Terashima T. Anatomy, development and lesion-induced plasticity of rodent corticospinal tract. *Neurosci Res.* 1995 May;22(2):139-61.

Treloar HB, Nurcombe V, Key B. Expression of extracellular matrix molecules in the embryonic rat olfactory pathway. *J Neurobiol.* 1996 Sep;31(1):41-55.

Trepel M. Embryogenese des Nervensystems. In: Trepel M, eds. *Neuroanatomie – Struktur und Funktion.* Dritte Auflage, München: Urban und Fischer, 2004a: 14.

Trepel M. Paleokortex und Riechhirn. In: Trepel M, eds. *Neuroanatomie – Struktur und Funktion.* Dritte Auflage, München: Urban und Fischer, 2004b: 201-209.

Vahedi K, Massin P, Guichard JP et al. Hereditary infantile hemiparesis, retinal arteriolar tortuosity, and leukoencephalopathy. *Neurology.* 2003 Jan 14;60(1):57-63.

Van Hartesveldt C, Moore B, Hartman BK. Transient midline raphe glial structure in the developing rat. *J Comp Neurol.* 1986 Nov 8;253(2):174-84.

- Walcott JC and Provis JM. Müller cells express the neuronal progenitor cell marker nestin in both differentiated and undifferentiated human foetal retina. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2003 Jun;31(3):246-9.
- Wang C, Mei L. Chapter 15: In Utero Electroporation in Mice. In: Zhou R, Mei L, eds. *Neural development: methods and protocols*. First Edition, New York: Humana Press, 2013: 151-163.
- Watanabe E, Maeda N, Matsui F, Kushimai Y, Noda M, Oohira A. Neuroglycan C, a novel membrane-spanning chondroitin sulfate proteoglycan that is restricted to the brain. *JBC* 1995;270: 26876–82.
- Willis MA, Haines DE. Chapter 31: The Limbic System. In: Haines DE, eds. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*, Fourth Edition, Philadelphia: Saunders, 2012:431-441.
- Wilson MT and Snow DM. Chondroitin sulfate proteoglycan expression pattern in hippocampal development: potential regulation of axon tract formation. *J Comp Neurol.* 2000 Aug 28;424(3):532-46.
- Wu DY, Jhaveri S, Schneider GE. Glial environment in the developing superior colliculus of hamsters in relation to the timing of retinal axon ingrowth. *J Comp Neurol.* 1995 Jul 24;358(2):206-18.
- Wu DY, Schneider GE, Silver J, Poston M, Jhaveri S. A role for tectal midline glia in the unilateral containment of retinocollicular axons. *J Neurosci.* 1998 Oct 15;18(20):8344-55.
- Yasuda Y, Tokita Y, Aono S et al. Cloning and chromosomal mapping of the human gene of neuroglycan C (NGC), a neural transmembrane chondroitin sulfate proteoglycan with an EGF module. *Neurosci Res.* 1998 Dec;32(4):313-22.
- Yew DT, Luo CB, Heizmann CW, Chan WY. Differential expression of calretinin, calbindin D28K and parvalbumin in the developing human cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* 1997 Oct 20;103(1):37-45.
- Yuasa S. Development of astrocytes in the mouse embryonic cerebrum tracked by tenascin-C gene expression. *Arch Histol Cytol.* 2001 Feb;64(1):119-26.
- Zacharias U, Norenberg U, Rathjen FG. Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member F11 are differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-R and tenascin-C. *J Biol. Chem.* 1999;274:24357-65.
- Zacharias U, Leuschner R, Norenberg U, Rathjen FG. Tenascin-R induces actin-rich microprocesses and branches along neurite shafts. *Mol Cell Neurosci* 2002;21:626–33.
- Zecevic N. Specific characteristic of radial glia in the human fetal telencephalon. *Glia.* 2004 Oct;48(1):27-35.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Magda Marszalek, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Expression von CALEB/NGC im embryonalen Mausgehirn“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Berlin, den 03.10.2014

Magda Marszalek

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich möchte ganz besonders meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. Stefan Schumacher für die engagierte Betreuung und für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Darüberhinaus danke ich Prof. Dr. Victor Tarabykin und Prof. Dr. Jörg W. Oestmann für die große Hilfsbereitschaft.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich an Prof. Dr. Franzisko Hartmut Dießenbacher für seine wertvolle, freundschaftliche Unterstützung richten.

Desweiteren danke ich meiner Familie, vor allem meinen mich liebevoll unterstützenden Eltern Mariola und Marius Marszalek sowie Johannes Ziegler für die jahrelange wundervolle gemeinsame Zeit.

Großer Dank gebührt auch meiner guten Freundin Isabel Dittmann für ihre moralische Unterstützung und ihre Hilfe.