

# **Bedeutung der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV in der postnatalen Gehirnentwicklung der Maus**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

**Dipl.-Biochem. Imke Oltmann-Norden**

geboren am 20. Dezember 1978 in Oldenburg

2008

Referentin: Prof. Dr. R. Gerardy-Schahn

Korreferent: Prof. Dr. W. Müller

Tag der Promotion: 28. März 2008

meinen lieben Eltern und  
meinem Ehemann

In den kleinsten Dingen zeigt  
die Natur die allergrößten Wunder.

Carl von Linné (1707-1778)

## Zusammenfassung

Polysialinsäure (PolySia), eine charakteristische posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM, stellt als Regulator NCAM-vermittelter Interaktionen einen für Hirnentwicklung, postnatales Wachstum und Überleben essentiellen Faktor dar. Die Polysialylierung des NCAM erfolgt durch die zwei Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV. Um die funktionelle Bedeutung beider Enzyme *in vivo* aufzudecken, wurden vierzehn Mauslinien analysiert, die sich in der Kombination funktioneller Polysialyltransferase- und NCAM-Allele unterscheiden. Durch Analyse der NCAM-Polysialylierung auf Kohlenhydrat-, Protein- und Transkriptebene konnte erstmals gezeigt werden, dass in perinatalem Gehirn das Verhältnis von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM maßgeblich durch die Expressionshöhe von ST8SiaII bestimmt wird. Während ein funktionelles Allel ST8SiaII ausreichend ist, um 90% des NCAM-Pools zu polysialylieren, lagen in ST8SiaII-Knockout-Tieren 45% des NCAM in der PolySia-freien Form vor. Die Menge an unphysiologisch auftretendem PolySia-freiem NCAM konnte direkt mit dem Ausmaß der in den verschiedenen Genotypen vorliegenden morphologischen Defekte korreliert werden. Um über die Perinatalphase hinaus die Rolle der Polysialyltransferasen in der postnatalen Hirnentwicklung zu verfolgen, wurde die NCAM-Polysialylierung in Wildtyp-, ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen Tag 1 und 21 postnatal sowie im adulten Stadium analysiert. Diese Untersuchung lieferte erstmalig einen genauen und umfassenden Überblick über die entwicklungsabhängigen Veränderungen des Polysialylierungsstatus des NCAM, des NCAM-Isoform-Musters und der Transkriptspiegel von ST8SiaII und ST8SiaIV. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die vorherrschende Rolle von ST8SiaII in der NCAM-Polysialylierung auf die ersten 15 Tage der postnatalen Gehirnentwicklung beschränkt ist.

Neben der Polysialylierung des NCAM übertragen die beiden Polysialyltransferasen in einer als Autopolysialylierung bezeichneten Reaktion PolySia-Ketten auch auf sich selbst. Um spätere Strukturanalysen der an diesem Prozess beteiligten N-Glykane der Enzyme zu erleichtern, wurden in einem weiteren Projekt minimal glykosylierte Formen von ST8SiaII und ST8SiaIV rekombinant in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert und aus dem Zellkulturüberstand affinitätschromatographisch aufgereinigt. Für beide minimal glykosylierten Polysialyltransferasen konnte in einem *in vitro*-Test NCAM-Polysialylierungsfähigkeit nachgewiesen werden.

## Summary

Polysialic acid (polySia), a characteristic posttranslational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM, is the key regulator of NCAM-mediated functions and essential for normal brain development, postnatal growth and survival. The synthesis of polySia depends on two polysialyltransferases, ST8SiaII and ST8SiaIV. Aiming at understanding the functional role of each enzyme *in vivo*, fourteen mouse lines that differ only in the number of functional polysialyltransferase and NCAM alleles were analyzed. The detailed analysis of the NCAM polysialylation on carbohydrate, protein, and transcript level revealed that in perinatal brain, the ratio between polysialylated to non-polysialylated NCAM is predominantly determined by the expression level of ST8SiaII. In ST8SiaII-null mice, 45% of the brain NCAM was non-polysialylated, whereas a single functional allele of ST8SiaII was sufficient to polysialylate 90% of the NCAM pool. Strikingly, a linear correlation was observed between the amount of prematurely expressed polySia-free NCAM and the extent of the morphological defects found in these genotypes. To investigate the role of ST8SiaII and ST8SiaIV during postnatal brain development, the NCAM polysialylation was monitored in wild-type, ST8SiaII-, and ST8SiaIV-deficient mice using whole-brain lysates obtained at different time-points from postnatal day 1 to 21 and from adult mice. This study provided a comprehensive quantitative analysis of the developmental changes in NCAM polysialylation status, NCAM isoform pattern, and polysialyltransferase transcript level and showed that the predominant role of ST8SiaII during postnatal brain development is restricted to the first 15 days.

Besides their capability to polysialylate NCAM, both polysialyltransferases are able to polysialylate themselves in a process termed autopolysialylation. To facilitate future structural analyses of the involved N-glycans, minimal glycosylated variants of ST8SiaII and ST8SiaIV were expressed in *Sf9* insect cells and purified from the cell culture supernatant by affinity chromatography. For the minimal glycosylated variants of both enzymes NCAM polysialylation activity was demonstrated using an *in vitro* assay.

**Schlagworte:** Polysialinsäure, Polysialyltransferasen, Neurales Zelladhäsionsmolekül

**Key words:** polysialic acid, polysialyltransferases, neural cell adhesion molecule

---

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	IV
Summary	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	X
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM	1
1.2. Posttranslationale Modifikation des NCAM durch Polysialinsäure	5
1.3. Die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV	8
1.4. PolySia-defiziente Mausmodelle	11
1.5. Zielsetzung	14
<b>2. Material</b>	<b>16</b>
2.1. Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere	16
2.1.1. Bakterienstämme	16
2.1.2. Zelllinien	16
2.1.3. Labortiere	16
2.2. Plasmide und Oligonukleotide	17
2.2.1. Plasmide	17
2.2.2. Oligonukleotide	18
2.3. Antikörper	19
2.4. Enzyme	20
2.5. Chemikalien	20
2.6. Nährmedien, Puffer und Zusätze	22
2.6.1. Nährmedien und Zusätze	22
2.6.2. Standardlösungen- und puffer	23
2.7. Geräte	23
2.8. Verbrauchsmaterialien	25
<b>3. Methoden</b>	<b>27</b>
3.1. Molekularbiologische Methoden	27
3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA	27
3.1.2. PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> )	28
3.1.3. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	29
3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese	30
3.1.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	30
3.1.6. Restriktionsspaltung von DNA	30

---

3.1.7.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau	31
3.1.8.	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	31
3.1.9.	Ligation	32
3.1.10.	Transformation	32
3.1.11.	Herstellung CaCl <sub>2</sub> -kompetenter <i>E. coli</i> XL1Blue bzw. JM109	32
3.1.12.	Herstellung von DMSO-Stocks von <i>E. coli</i>	33
3.1.13.	Sequenzierung	33
3.1.14.	RNA-Präparation	33
3.1.15.	cDNA-Synthese	34
3.1.16.	Quantitative Real-Time Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)	34
3.1.17.	Analytisches Acrylamidgel	38
3.1.18.	Schmelzkurvenanalyse	39
3.2.	Zellbiologische Methoden	39
3.2.1.	Kultivierung von <i>Spodoptera frugiperda</i> ( <i>Sf9</i> )-Insektenzellen	39
3.2.2.	Auftauen von <i>Sf9</i> -Insektenzellen	40
3.2.3.	Einfrieren von <i>Sf9</i> -Insektenzellen	40
3.2.4.	<i>BAC-TO-BAC</i> -Baculovirussystem von Gibco	40
3.2.5.	Transfektion von <i>Sf9</i> -Insektenzellen	43
3.2.6.	Virusamplifikation	43
3.2.7.	Test der Proteinexpressionsbedingungen	43
3.3.	Präparation von Mausgehirnen	44
3.4.	Proteinanalytische Methoden	44
3.4.1.	Aufarbeitung von Gehirngewebe für die Western-Blot-Analyse	44
3.4.2.	Proteinfällung mit Hilfe von 50% Trichloressigsäure	45
3.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.4.4.	Coomassie-Färbung	46
3.4.5.	Silberfärbung	47
3.4.6.	Western-Blot	47
3.4.7.	Immunfärbung von Western Blots,	48
3.4.8.	Quantifizierung von Proteinsignalen auf Western-Blots	50
3.4.9.	Ermittlung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay	50
3.4.10.	Aufreinigung rekombinanter Polysialyltransferasen aus Insektenzellkultur- überständen	50
3.4.11.	Nachweis von Polysialyltransferase-Aktivität	51

---

---

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>54</b>
4.1.	Bedeutung der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV für die NCAM-Polysialylierung im perinatalen Maushirn	54
4.1.1.	NCAM-Polysialylierung in P1-Hirnen Polysialyltransferase-defizienter Mäuse	54
4.1.1.1.	Analyse der NCAM-Expression in P1-Hirnen Polysialyltransferase-defizienter Mäuse	57
4.1.1.2.	Analyse des Verhältnisses von polysialyliertem NCAM zur Gesamt-PolySia-Menge	57
4.1.2.	Polysialyltransferase mRNA-Spiegel in perinatalem Maushirn	58
4.2.	Einfluss der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV auf die PolySia-Synthese während der postnatalen Entwicklung des Mäusegehirns	62
4.2.1.	Entwicklungsabhängige Veränderungen der NCAM-Polysialylierung während der postnatalen Entwicklung von Wildtyp-, ST8SiaII <sup>-/-</sup> , und ST8SiaIV <sup>-/-</sup> -Mäusen	62
4.2.2.	Quantifizierung der PolySia-Mengen während der postnatalen Entwicklung der Gehirne von Wildtyp, ST8SiaII <sup>-/-</sup> und ST8SiaIV <sup>-/-</sup> Mäusen	65
4.2.3.	Analyse der Expression der NCAM-Isoformen während der postnatalen Gehirnentwicklung in Wildtyp-, ST8SiaII <sup>-/-</sup> , und ST8SiaIV <sup>-/-</sup> -Mäusen	66
4.2.3.1.	NCAM-Expressionsmuster der Wildtyp-Maus	67
4.2.3.2.	NCAM-Expressionsmuster der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Maus	69
4.2.4.	Entwicklungsabhängige Veränderungen der NCAM-mRNA-Spiegel	70
4.2.5.	Expression der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV während der postnatalen Gehirnentwicklung	75
4.2.6.	Korrelation der Gesamt-mRNA-Spiegel beider Polysialyltransferasen mit der Menge an gebildeter PolySia	78
4.3.	Einfluss der NCAM-Gendosis auf die Menge an polysialyliertem NCAM	80
4.3.1.	Analyse der NCAM-Proteinmengen in Mäusen, die sich in der Allelkombination von NCAM unterscheiden	81
4.3.2.	Analyse der NCAM-Transkriptspiegel in heterozygoten NCAM-Knockout-Tieren	83
4.3.3.	Modifikationen der Menge an polysialyliertem NCAM durch variierende Allelkombinationen von ST8SiaII, ST8SiaIV und NCAM	86
4.3.4.	Korrelation der Menge von PolySia-freiem NCAM mit dem Phänotyp	88
4.3.5.	PolySia in NCAM-defizienten Mäusen	91
4.4.	Heterologe Expression und Aufreinigung der eukaryontischen Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV	92
4.4.1.	Herstellung von N-Glykosylierungsvarianten von ST8SiaII und ST8SiaIV mit C-terminalem Myc-His-Tag und deren Expression in Sf9-Insektenzellen	93
4.4.2.	Aufreinigung der N-Glykosylierungsmutanten der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV mit Hilfe einer 9E10-Säule	95

---

---

4.4.3.	Überprüfung der Aktivität der fünf Polysialyltransferasevarianten mit Hilfe eines ELISA-basierten Aktivitätstests	98
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>100</b>
5.1.	Rolle der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV für die NCAM-Polysialylierung im perinatalen Maushirn	100
5.2.	Beitrag der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV zur NCAM-Polysialylierung während der postnatalen Hirnentwicklung der Maus	103
5.3.	Analyse der NCAM- und PolySia-Expression in homo- und heterozygoten NCAM-Knockout-Mäusen	107
5.4.	Expression und Aufreinigung minimal glykosylierter Polysialyltransferase-Varianten	109
5.5.	Ausblick	111
	Literatur	113
	Abkürzungsverzeichnis	123
	Lebenslauf	126
	Eigene Publikationen	127
	Danksagung	129
	Erklärung	130

---

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1.1:	Genomische Organisation des NCAM-Gens.	2
Abbildung 1.2:	Aufbau des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) und dessen Hauptisoformen, NCAM-180, NCAM-140 und NCAM-120.	3
Abbildung 1.3:	Wechselwirkungen des NCAM mit Zelloberflächenmolekülen.	4
Abbildung 1.4:	Struktur $\alpha$ 2,8-verknüpfter N-Acetylneuraminsäuren.	5
Abbildung 1.5:	Einfluss von PolySia auf Wechselwirkungen von NCAM und anderen Zelladhäsionsmolekülen.	6
Abbildung 1.6:	Mögliche Wechselwirkungen von PolySia.	7
Abbildung 1.7:	Vergleich der primären Struktur der $\alpha$ 2,8-Sialyltransferase-Familie aus dem Menschen.	9
Abbildung 1.8:	Schema der Polysialyltransferase IV.	9
Abbildung 1.9:	Überblick über die PolySia-defizienten Maus-Modelle.	12
Abbildung 3.1:	Das Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR.	35
Abbildung 3.2:	Standardreihe zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz eines Primerpaares.	37
Abbildung 3.3:	Generierung von rekombinanten Baculoviren und Genexpression mit dem <i>BAC-TO-BAC</i> -Expressionssystem.	41
Abbildung 4.1:	Überblick über die neun Genotypen, die sich in der Kombination der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Allele unterscheiden.	54
Abbildung 4.2:	Status der NCAM-Polysialylierung in Wildtyp- und Polysialyltransferase-defizienten Mäusen.	56
Abbildung 4.3:	Genomische Organisation von ST8SiaII und ST8SiaIV und Knockout-Strategie der ST8SiaII <sup>-/-</sup> - und ST8SiaIV <sup>-/-</sup> -Mäusen.	59
Abbildung 4.4:	Analyse der PCR-Produkte von ST8SiaII, ST8SiaIV und HPRT eines Real-Time PCR-Laufes.	61
Abbildung 4.5:	Relative Transkriptmengen von ST8SiaII und ST8SiaIV.	61
Abbildung 4.6:	Entwicklungsabhängige Veränderungen des Polysialylierungsstatus von NCAM.	63
Abbildung 4.7:	Vergleich von polysialyliertem NCAM in Gehirnen von drei Wochen alten und erwachsenen Tieren.	64
Abbildung 4.8:	Veränderungen der PolySia-Menge während der postnatalen Gehirnentwicklung.	66
Abbildung 4.9:	NCAM-Proteinspiegel während der postnatalen Entwicklung des Gehirns.	68
Abbildung 4.10:	Messung der Ct-Werte von HPRT und TBP in Gehirnen von P1-P21 alten Wildtyp-Mäusen mittels Real-Time-PCR.	70
Abbildung 4.11:	Analyse der PCR-Produkte von TBP und HPRT	71
Abbildung 4.12:	Die durch alternatives Spleißen produzierten NCAM-Isoformen.	72

---

Abbildung 4.13: Bestimmung der Ct-Werte von NCAM-120, Gesamt-NCAM und TBP innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen in Gehirnen von Wildtyp-Mäusen mittels Real-Time-PCR.	73
Abbildung 4.14: Analyse der PCR-Produkte von NCAM-120 und Gesamt-NCAM einer Real-Time-PCR.	73
Abbildung 4.15: Transkript-Spiegel von Gesamt-NCAM (A) und NCAM-120 (B) während der postnatalen Gehirnentwicklung.	74
Abbildung 4.16: mRNA-Spiegel von NCAM-120 im Gehirn von Wildtyp-, ST8SiaIV <sup>-/-</sup> - und ST8SiaII <sup>-/-</sup> -Mäusen während der ersten fünf postnatalen Tage.	75
Abbildung 4.17: Analyse der PCR-Produkte von ST8SiaII und ST8SiaIV einer Real-Time-PCR.	76
Abbildung 4.18: Ct-Werte von ST8SiaII, ST8SiaIV und TBP in Gehirnen von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters (P1, P9, P15 und P21).	76
Abbildung 4.19: Entwicklungsabhängige Veränderungen der Transkriptspiegel von ST8SiaII und ST8SiaIV.	78
Abbildung 4.20: Korrelation der Polysialyltransferase mRNA-Spiegel mit der Menge an PolySia.	79
Abbildung 4.21: Überblick über die neun zu untersuchenden Genotypen, die sich in der Kombination der Allele von ST8SiaII, ST8SiaIV und NCAM unterscheiden.	81
Abbildung 4.22: Vergleich der NCAM-Mengen von Mäusen, die sich in der Anzahl ihrer NCAM-Allele unterscheiden.	82
Abbildung 4.23: Analyse der NCAM spezifischen PCR-Produkte einer Real-Time PCR-Messung in Gehirnen von Wildtyp- und NCAM <sup>-/-</sup> -Mäusen.	83
Abbildung 4.24: Knockout-Strategie von NCAM <sup>-/-</sup> -Mäusen.	84
Abbildung 4.25: Messung der Ct-Werte von NCAM unter Benutzung neuer NCAM-spezifischer Primerpaare in Wildtyp- und NCAM <sup>-/-</sup> -Mäusen mittels Real-Time-PCR.	85
Abbildung 4.26: Relative Transkriptmengen von NCAM in NCAM-heterozygoten Mäusen.	86
Abbildung 4.27: Status der NCAM-Polysialylierung in Mäusen, die sich in der Allelkombination von ST8SiaII, ST8SiaIV und NCAM unterscheiden.	88
Abbildung 4.28: Korrelation der Defekte der Gehirnfasertrakte der inneren Kapsel (A) bzw. der mammillothalamischen Faser (B) mit der relativen Menge an nicht-polysialyliertem NCAM.	90
Abbildung 4.29: PolySia in NCAM-defizienten Mäusen.	91
Abbildung 4.30: Überblick über die fünf hergestellten Polysialyltransferase-Varianten.	94
Abbildung 4.31: Western-Blot-Analyse einer Testexpression des Konstruktes ST8SiaII(+3,5) in Sf9-Insektenzellen.	95
Abbildung 4.32: Elutionsprofil einer Affinitätschromatografie der rekombinant hergestellten ST8SiaII.	96

---

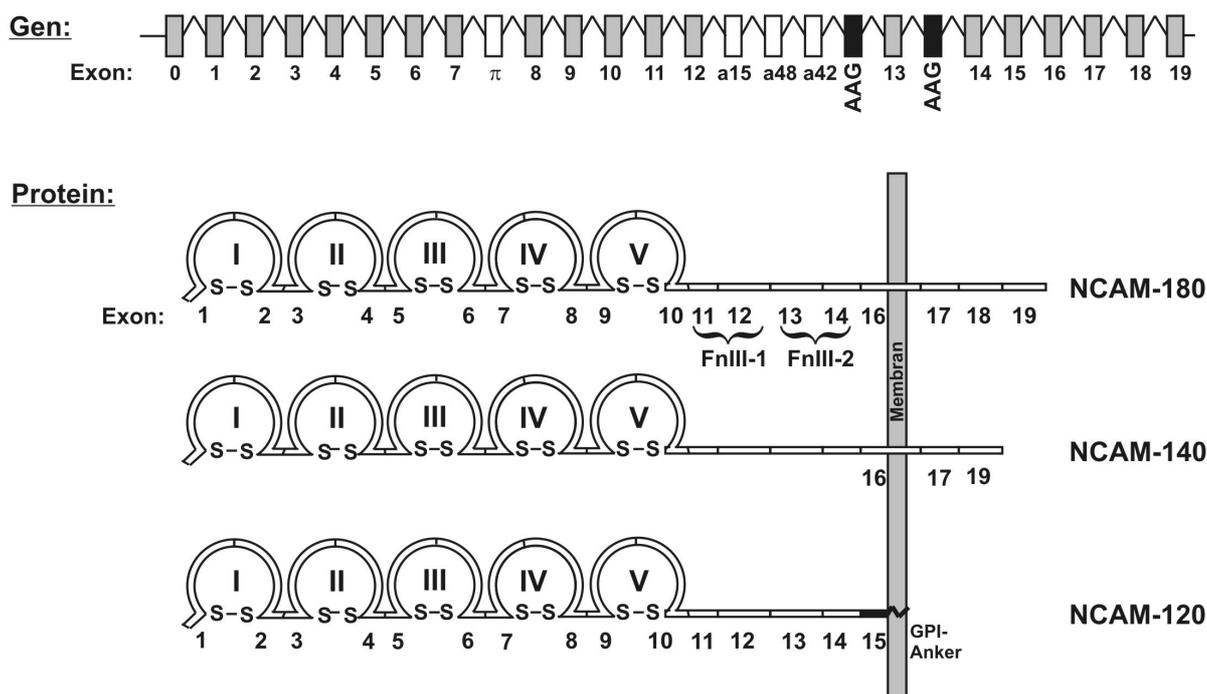
Abbildung 4.33:	SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) der über Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfraktionen der vollglykosylierten Variante von ST8SiaII.	97
Abbildung 4.34:	Silbergel der mit Hilfe von Affinitätschromatographie aufgereinigten Polysialyltransferase-Varianten.	98
Abbildung 4.35:	ELISA-basierter Aktivitätstest der fünf Polysialyltransferase-Varianten auf (A) NCAM-Polysialylierungsaktivität und auf (B) Auto-Polysialylierungsaktivität.	99
Abbildung 4.36:	ELISA-basierter Aktivitätstest der ST8SiaII-Varianten auf NCAM-Polysialylierungsaktivität.	99
Tabelle 4.1:	Relative Menge an unpolysialyliertem NCAM [%] und Grad der Defekte [%] unterschiedlicher Gehirnfasertrakte (innere Kapsel, mammillothalamischer Trakt, vordere Kommissur, corticospinaler Trakt) in neun Genotypen, die sich in der Kombination der Allele von ST8SiaII, ST8SiaIV und NCAM unterscheiden.	90
Tabelle 4.2:	Übersicht über die Ausbeuten der fünf aufgereinigten Polysialyltransferase-Varianten.	97

# 1. Einleitung

Die Entwicklung des Nervensystems und damit die Bildung eines komplexen Netzwerks von miteinander verschalteten Nervenzellen basiert auf der zeitlich und räumlich präzise koordinierten Wanderung von Nervenzellen und der Entstehung neuronaler Kontakte. Dabei hilft die Kommunikation infolge von Zell-Zell-Interaktionen den Zellen, die richtige Funktion bzw. Position einnehmen. Diese interzelluläre Kommunikation wird neben Rezeptoren und Kanälen vor allem mit Hilfe von Zelladhäsionsmolekülen erreicht, die Zellkontakte ausbilden und so Informationen ins Innere der Zelle weiterleiten, die wiederum eine Reaktion der Zielzelle hervorrufen. Zelladhäsionsmoleküle sind membranständige Glykoproteine, die neben der Interaktion von Zellen auch Verbindungen mit der sie umgebenden Extrazellulärmatrix eingehen. Aufgrund dieser Funktionen spielen sie eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, der Zellerkennung und der Zelldifferenzierung. Die Glykanstrukturen der Zelladhäsionsmoleküle bilden deren äußere Kommunikationsstruktur und sind somit entscheidend an diesen Vorgängen beteiligt. Ein herausragendes Beispiel ist die Polysialinsäure (PolySia), ein Kohlenhydratpolymer, das als posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM die biologischen Funktionen desselben maßgeblich beeinflusst.

## 1.1. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

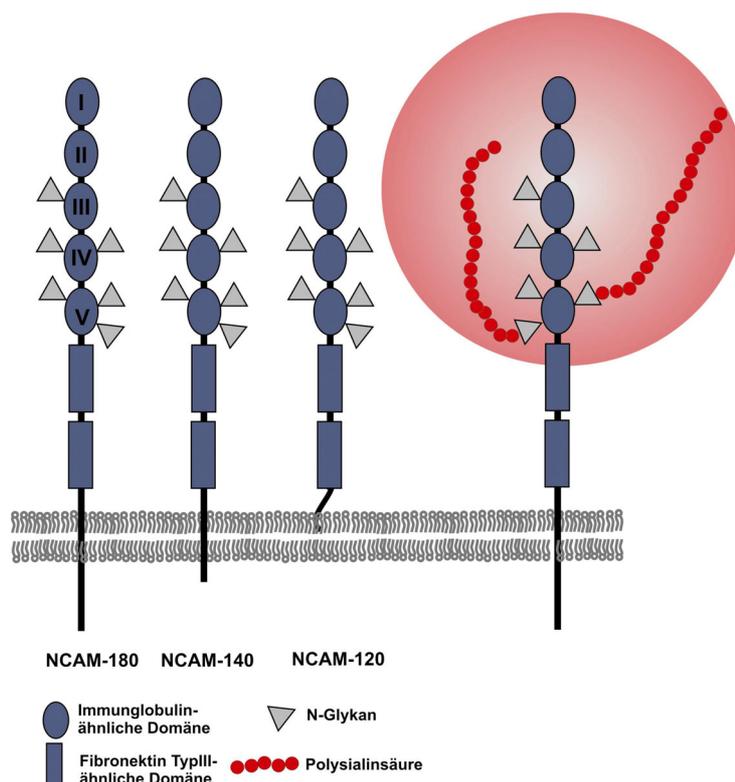
Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist ein Zelloberflächenglykoprotein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Es wird von einem einzelnen Gen kodiert, das beim Menschen auf Chromosom 11 und bei der Maus auf Chromosom 9 lokalisiert ist (D'Eustachio *et al.*, 1985; Nguyen *et al.*, 1986). Ausgehend von diesem Gen werden durch alternatives Spleißen unterschiedliche Isoformen generiert. Da das NCAM-Gen aus zwanzig Haupt- und sechs kleinen alternativen Exons aufgebaut ist, können theoretisch 192 unterschiedliche Isoformen gebildet werden (Cunningham *et al.*, 1987; Barthels *et al.*, 1992) (s. Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Genomische Organisation des NCAM-Gens.**

Die drei Hauptisoformen, NCAM-180, NCAM-140 und NCAM-120, unterscheiden sich in der Exonzusammensetzung. I – V = Immunglobulin-ähnliche Domänen, FNIII-1 und FNIII-2 = Fibronectin III-ähnliche Domänen, graue Boxen = konstitutive Exons, weiße Boxen = alternative Exons, a15, a48, a42: alternative Exons, die 15, 48 bzw. 42 Nucleotide enthalten;  $\pi$  = variables alternativ gespleißtes Exon; schwarze Boxen = Insertion des Basentriplets AAG.

Die Hauptisoformen werden entsprechend ihrer apparenten Molmassen von 120, 140 und 180 kDa als NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 bezeichnet (s. Abbildung 1.1 und Abbildung 1.2). Während die Isoformen NCAM-180 und NCAM-140 Transmembranproteine sind, die sich nur in der Länge ihrer intrazellulären Domäne unterscheiden, ist die Isoform NCAM-120 über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran verankert (He *et al.*, 1987). Der extrazelluläre Bereich aller drei Hauptisoformen besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig) und zwei Fibronectin Typ III-ähnlichen Domänen und weist sechs N-Glykosylierungsstellen auf (s. Abbildung 1.2).

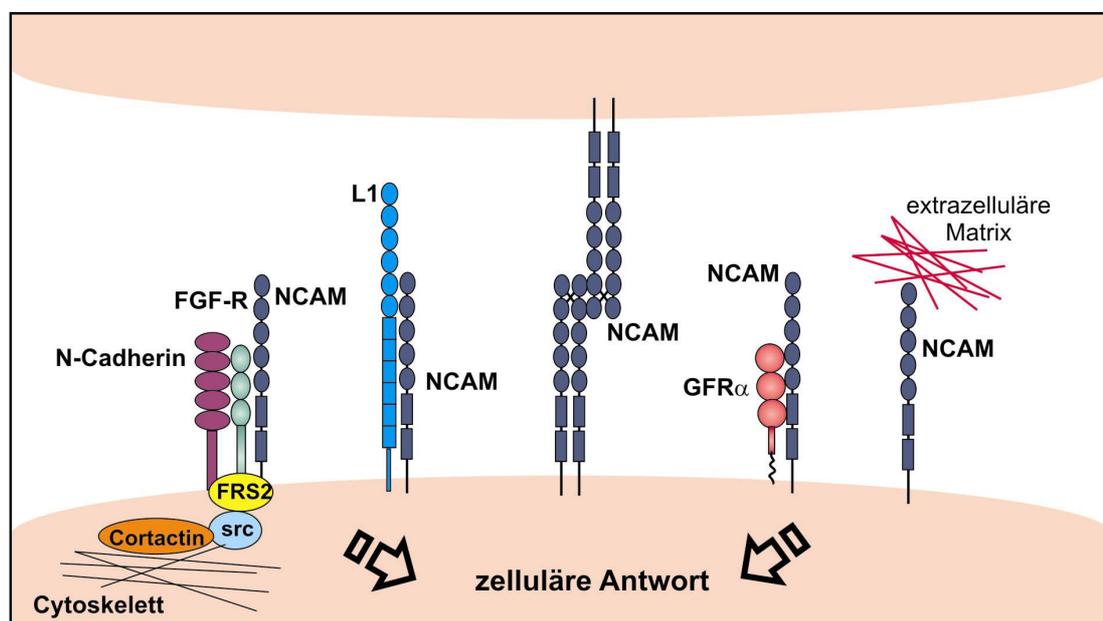


**Abbildung 1.2: Aufbau des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) und dessen Hauptisoformen, NCAM-180, NCAM-140 und NCAM-120.**

Die extrazelluläre Domäne des NCAM besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen (I – V) und zwei Fibronectin Typ III-ähnlichen Domänen. Die Polysialylierung erfolgt an komplexen N-Glykanen an der fünften und sechsten N-Glykosylierungsstelle, die in der fünften Ig-Domäne lokalisiert sind. Während NCAM-180 und NCAM-140 Transmembranproteine sind, ist NCAM-120 über einem GPI-Anker mit der Plasmamembran verbunden.

Zunächst wurde NCAM als ein  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiges, homophiles Zelladhäsionsmolekül beschrieben. (zur Übersicht s. Hinsby *et al.*, 2004). Die homophilen NCAM-NCAM-Interaktionen können sowohl in *cis*, d.h. zwischen Molekülen derselben Zelle, als auch in *trans*, d.h. zwischen Molekülen benachbarter Zellen, auftreten. Um die homophile Wechselwirkung von NCAM zu erklären, wurden unterschiedliche Modelle aufgestellt. Ein Modell, das anhand der Ergebnisse von Messungen der Oberflächenanziehungskräfte („direct force measurements“) entwickelt wurde, beschreibt für *trans*-Interaktionen zwei mögliche Komplexe, an deren Ausbildung entweder alle fünf oder nur die beiden distalen Ig-Domänen (Ig1 und Ig2) beteiligt sind (Johnson *et al.*, 2004). Ein zweites Modell basiert auf röntgenkristallographischen Daten, die zeigen, dass NCAM homophile *cis*-Interaktionen durch Überkreuz-Wechselwirkung der distalen Ig-Domänen 1 und 2 ausbildet (Kasper *et al.*, 2000). Die so geformten NCAM-Dimere können dann in *trans*-Interaktion mit entsprechenden NCAM-Dimeren einer zweiten Zelle treten (s. Abbildung 1.3), wobei möglicherweise Reißverschluss-ähnliche Strukturen ausgebildet werden (Soroka *et al.*, 2003; Hinsby *et al.*, 2004).

Neben homophilen Wechselwirkungen wurden verschiedene heterophile NCAM-Interaktionen beobachtet (s. Übersicht, s. Abbildung 1.3). Beispielsweise interagiert NCAM mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR), wodurch eine intrazelluläre Signalgebung initiiert wird, die zum Auswachsen von Neuriten führt (Saffell *et al.*, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NCAM das Neuriten-Wachstum und die Matrix-Adhäsion von  $\beta$ -Zellen des Pankreas-Tumors durch die Assemblierung eines Signalkomplexes reguliert, der aus dem FGFR-4, N-Cadherin, Phospholipase C $\gamma$  und den Adapter-Proteinen FRS2, pp60, Cortactin und GAP-43 besteht (Cavallaro *et al.*, 2001). Ein weiterer heterophiler Interaktionspartner von NCAM ist das Zelladhäsionsmolekül L1, dessen Wechselwirkungen mit NCAM die Rezeptoreigenschaften von L1 verbessern, wodurch *trans*-Interaktionen mit anderen L1-Molekülen erleichtert werden (Kadmon *et al.*, 1990; Horstkorte *et al.*, 1993). Zudem konnte gezeigt werden, dass NCAM Wechselwirkungen mit dem GDNF-Rezeptor- $\alpha$  („glial-derived neurotrophic factor family receptor  $\alpha$ “, GFR $\alpha$ ) eingeht. Diese Interaktion initiiert eine intrazelluläre Signalkaskade, die zu Neuritenwachstum und Zellwanderung führt (Paratcha *et al.*, 2003). Überdies sind Wechselwirkungen von NCAM mit verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix bekannt (Walmod *et al.*, 2004).

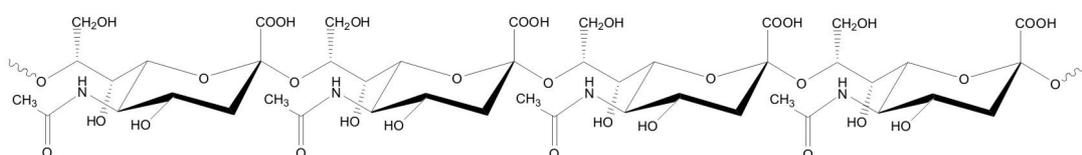


**Abbildung 1.3: Wechselwirkungen des NCAM mit Zelloberflächenmolekülen.**

Neben homophilen Wechselwirkungen geht NCAM mit einer Reihe unterschiedlicher Zelloberflächenmoleküle Interaktionen ein, wie zum Beispiel mit dem FGF-Rezeptor (FGF-R), dem Zelladhäsionsmolekül L1, dem GDNF-Rezeptor- $\alpha$  (GFR $\alpha$ ) und Bestandteilen der extrazellulären Matrix.

## 1.2. Posttranslationale Modifikation des NCAM durch Polysialinsäure

Eine charakteristische posttranslationale Modifikation des NCAM ist Polysialinsäure (Finne, 1982). Diese Kohlenhydratstruktur besteht aus  $\alpha$ 2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäuren (Neu5Ac) mit über 50 Resten (Abbildung 1.4) (Inoue *et al.*, 2000; Galuska *et al.*, 2006). Sie wird als terminale Modifikation komplexer N-Glykane gefunden, die in der fünften und sechsten N-Glykosylierungsstelle innerhalb der fünften Ig-Domäne lokalisiert sind (Liedtke *et al.*, 2001; von der Ohe *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 1995).

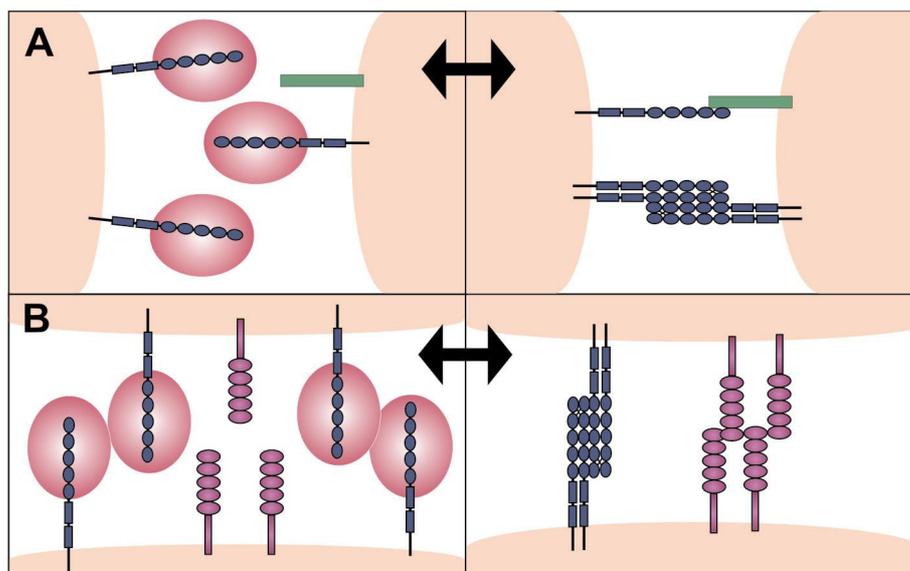


**Abbildung 1.4:** Struktur  $\alpha$ 2,8-verknüpfter N-Acetylneuraminsäuren.

PolySia wird während der Organogenese in Derivaten aller drei Keimblätter gefunden (Lackie *et al.*, 1994). Somit ist die Expression von PolySia nicht auf Zellen ectodermalen Ursprungs beschränkt, und polysialyliertes NCAM wurde während der Embryonalentwicklung in unterschiedlichen Geweben wie Herz, Skelettmuskel und Niere nachgewiesen (Finne *et al.*, 1987; Roth *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1992; Dubois *et al.*, 1994). Darüber hinaus wird polysialyliertes NCAM auf verschiedenen neuro-ectodermalen Tumoren, wie dem Neuroblastom (Moolenaar *et al.*, 1990), dem kleinzelligen Lungencarcinom (Kibbelaar *et al.*, 1989; Nilsson, 1992; Miyahara *et al.*, 2001) und dem Wilms Tumor (Roth *et al.*, 1988; Glüer *et al.*, 1998), reexprimiert.

PolySia besitzt eine hohe negative Ladung und somit eine ausgeprägte Hydrathülle, da unter physiologischen Bedingungen die Carboxylgruppe an der C1-Position der Neuraminsäure deprotoniert vorliegt. Hoher Polymerisierungsgrad und große Hydrathülle machen PolySia zu einer voluminösen und raumfüllenden Struktur, die über den Proteinkern des NCAM hinaus reicht (Abbildung 1.2). Durch sterische Hinderung und elektrostatische Abstoßung zwischen PolySia-Molekülen zweier Zellen wird eine Annäherung der Zellmembranen erschwert. Die Messung von molekularen Abstoßungskräften zeigte, dass die an NCAM gebundene PolySia den hydrodynamischen Radius von NCAM verdoppelt und die Reichweite und die Stärke der Abstoßungskräfte zwischen den Membranen vergrößert. Die Vergrößerung des Intermembranraums wiederum führt zu einer Reduzierung der spezifischen Kontakte

zwischen Zelloberflächenstrukturen, wodurch nicht nur die homo- und heterophilen NCAM-Interaktionen abgeschwächt werden (s. Abbildung 1.5A), sondern auch *trans*-Wechselwirkungen zwischen anderen Zelladhäsionsmolekülen, wie L1 oder Cadherinen, reduziert oder sogar unterbrochen werden (Abbildung 1.5B) (Yang *et al.*, 1994; Fujimoto *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005).



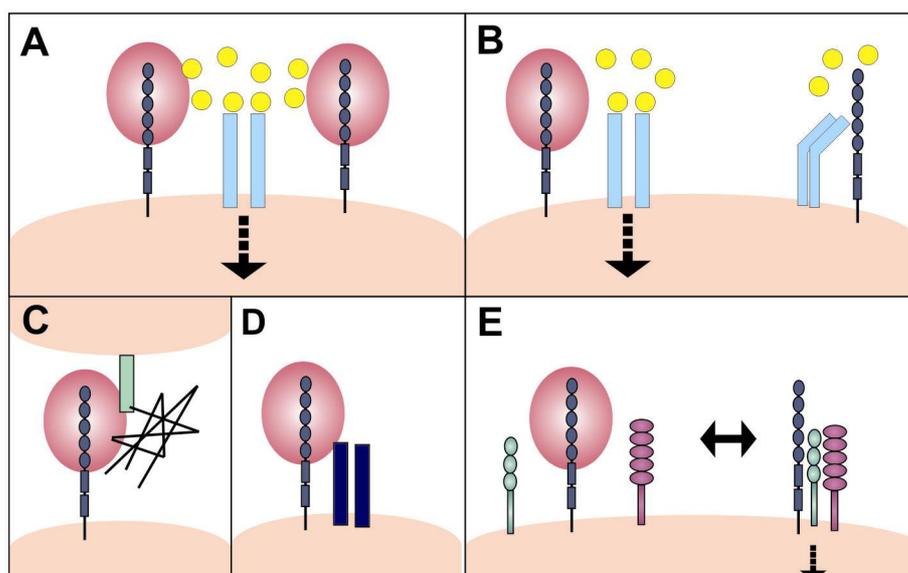
**Abbildung 1.5: Einfluss von PolySia auf Wechselwirkungen von NCAM und anderen Zelladhäsionsmolekülen.**

(A) PolySia gebunden an NCAM verhindert homo- und heterophile Interaktionen von NCAM zwischen benachbarten Zellen. (B) Polysialyliertes NCAM vergrößert die Abstoßungskräfte zwischen den Membranen zweier Zellen und verhindert auf diese Weise die Wechselwirkungen von NCAM und anderen Zelloberflächenmolekülen (Abbildung modifiziert nach Hildebrandt *et al.*, 2007).

Neben ihrer Funktion als Negativregulator der Zelladhäsion ist PolySia auch instruierend an verschiedenen zellulären Vorgängen beteiligt. So führt die Wechselwirkung von polysialyliertem NCAM mit dem Wachstumsfaktor BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) dazu, dass kortikale Neuronen gegenüber BDNF sensitiver werden, und der Verlust von PolySia geht mit einer Reduzierung BDNF-abhängiger Differenzierung und Lebenserhaltung einher (Muller *et al.*, 2000; Vutskits *et al.*, 2001). Es existieren zwei Modelle, die diese Wirkung der PolySia erklären. Im ersten Modell besitzt PolySia die Funktion, die BDNF-Konzentration am Ort des Rezeptors zu erhöhen (s. Abbildung 1.6A), und im zweiten Modell hebt PolySia die inhibitorische Wechselwirkung von NCAM mit dem BDNF-Rezeptor auf (s. Abbildung 1.6B).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass PolySia an Heparansulfat-Proteoglykane der Zelloberfläche oder der extrazellulären Matrix bindet (s. Abbildung 1.6C) und dass diese

Komplexe an der Bildung und Umformung von Synapsen des Hippocampus beteiligt sind (Storms und Rutishauser, 1998; Dityatev *et al.*, 2004). Darüber hinaus scheint PolySia mit Neurotransmitter-Rezeptoren zu interagieren. So konnte eine Studie belegen, dass die Aktivität des AMPA-Subtyps (*alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid*) des Glutamaterezeptors durch die Gegenwart von PolySia beeinflusst wird (Vaithianathan *et al.*, 2004) (Abbildung 1.6D).



**Abbildung 1.6: Mögliche Wechselwirkungen von PolySia.**

(A) und (B) Zwei Modelle, wie PolySia die Wechselwirkung von BDNF mit dem BDNF-Rezeptor erhöht. (A) PolySia vereinfacht die Wechselwirkung von BDNF mit dem BDNF-Rezeptor, indem es die Konzentration des BDNF am Ort des Rezeptors erhöht. (B) PolySia verhindert inhibitorische Wechselwirkungen von NCAM mit dem BDNF-Rezeptor. (C) PolySia bindet an die extrazelluläre Matrix. (D) PolySia beeinflusst die Aktivität des AMPA-Subtyps des Glutamaterezeptors. (E) Die Bildung von NCAM-abhängigen Signalkomplexen (Signalkomplex aus FGFR-4, N-Cadherin und NCAM s. Abbildung 1.3.) kann durch die Bindung von PolySia an NCAM gestört werden (Abbildung modifiziert nach Hildebrandt *et al.* 2007).

NCAM und PolySia sind essentielle Faktoren für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems (Cremer *et al.*, 1994; Weinhold *et al.* 2005). Polysialyliertes NCAM ist vor allem im embryonalen Gehirn weit verbreitet und erreicht in der Perinatalphase, einem Zeitfenster maximaler Neurogenese, axonalen Wachstums und synaptischer Aktivität, ein Maximum. Im adulten Gehirn dagegen liegen die meisten NCAM-Moleküle nicht polysialyliert vor (Rothbard *et al.*, 1982), und polysialyliertes NCAM ist auf Gehirnbereiche beschränkt, die auch im adulten Stadium Neurogenese und synaptische Plastizität aufweisen. Bei diesen Regionen handelt es sich vor allem um die subventrikuläre Zone (SVZ), den rostralen Migrationsweg (RMS) von der SVZ zum Riechkolben (olfaktorischer Bulbus), den Hippocampus und das hypothalamische-neurohypophysische System (Theodosis *et al.*, 1991; Seki und Arai, 1993). Durch enzymatische Entfernung von PolySia infolge der Behandlung

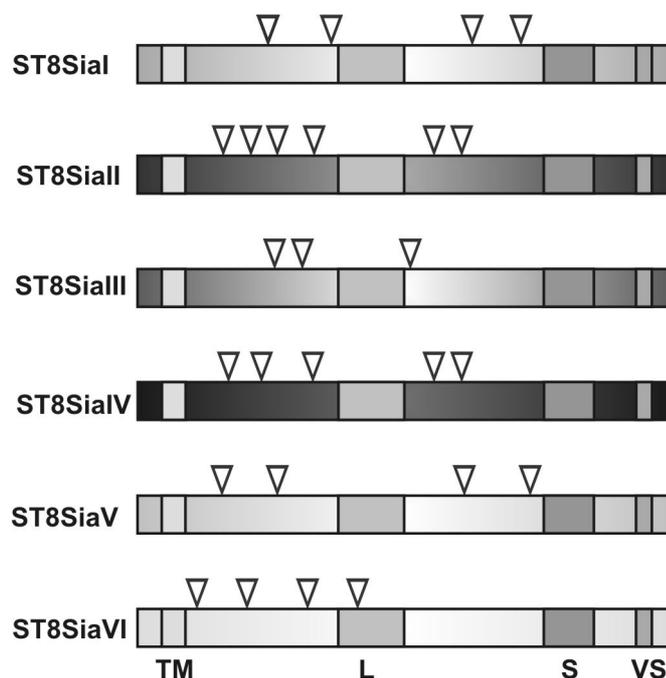
mit Endoneuraminidase (EndoN), einem Enzym aus Bakteriophagen, das spezifisch PolySia spaltet (Stummeyer *et al.*, 2005), konnten unterschiedliche Studien den Einfluss von PolySia in dynamischen Prozessen wie der Wanderung von neuronalen Vorläuferzellen, der Herausbildung von Axonen, der Synaptogenese, der physiologischen und morphologischen synaptischen Plastizität und der Kontrolle des Circadianen Rhythmus zeigen (Becker *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1997; Theodosis *et al.*, 1999; Dityatev *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000; Durbec und Cremer, 2001; Dityatev *et al.*, 2004). Zudem belegen verschiedene Studien die Bedeutung der PolySia für Lern- und Gedächtnisleistungen (Becker *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996; Eckhardt *et al.*, 2000).

### **1.3. Die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV**

Für die Biosynthese von PolySia sind zwei Enzyme verantwortlich, die Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV, welche eine hohe Homologie zueinander aufweisen und deren Aminosäuresequenz zu 59% identisch ist. Die Polysialyltransferasen gehören der Sialyltransferase-Familie der Vertebraten an, welche die  $\alpha$ 2,3-,  $\alpha$ 2,6-, und  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen umfasst. In der Gruppe der  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferasen, die Sialinsäurereste in  $\alpha$ 2,8-Verknüpfung auf eine Sialinsäure übertragen, existieren neben ST8SiaII und ST8SiaIV noch vier weitere Sialyltransferasen (s. Abbildung 1.7). Während ST8SiaI und ST8SiaV an der Gangliosidsynthese beteiligt sind (Kono *et al.*, 1996), überträgt ST8SiaIII Sialinsäure auf terminale  $\alpha$ 2,3-gebundene Sialinsäurereste sowohl von Glykolipiden als auch von Glykoproteinen. Darüber hinaus ist dieses Enzym in der Lage, Oligosialinsäure zu synthetisieren (Angata *et al.*, 2000). Als eine weitere  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferase wurde ST8SiaVI identifiziert, deren Funktion es ist, Disialinsäurestrukturen an O-Glykane zu synthetisieren (Angata und Fukuda, 2003).

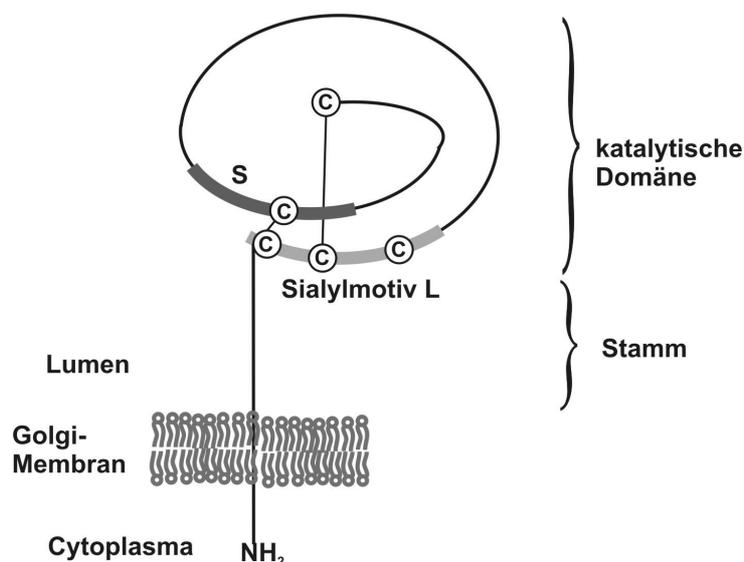
Bei allen eukaryontischen Sialyltransferasen handelt es sich um Golgi-assoziierte Typ II-Transmembranproteine, die sich aus einer kurzen cytoplasmatischen und einer großen in das Golgi-Lumen reichenden Domäne zusammensetzen. Die in das Lumen des Golgi reichende Domäne wiederum besteht aus einer Stammregion und der katalytischen Domäne, die drei konservierte Bereiche umfasst, die als Sialylmotiv L („*long*“), S („*short*“) und VS („*very short*“) bezeichnet werden (s. Abbildung 1.8). Das Sialylmotiv L ist an der Bindung des Donorsubstrates CMP-Neu5Ac beteiligt, während das Sialylmotiv S an der Bindung sowohl des Donor- als auch des Akzeptorsubstrates teilnimmt (Datta und Paulson, 1995; Datta *et al.*, 1998). Für das aus nur zwei Aminosäuren bestehende VS-Sialylmotiv („*very short*“) konnte

ebenfalls eine essentielle Funktion für die enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. (Kitazume-Kawaguchi *et al.*, 2001) (s. Abbildung 1.7).



**Abbildung 1.7:** Vergleich der primären Struktur der  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferase-Familie aus dem Menschen.

Die Transmembrandomäne (TM) und die Sialylmotive L („long“), S („short“) und VS („very short“) sind durch hell- bzw. dunkelgraue Boxen dargestellt. N-Glykosylierungsstellen sind durch Dreiecke wiedergegeben.



**Abbildung 1.8:** Schema der Polysialyltransferase IV.

Bei beiden Polysialyltransferasen, ST8SialII und ST8SialIV, handelt es sich um Typ II-Transmembranproteine. Hier ist als Beispiel die Struktur von ST8SialIV dargestellt. ST8SialIV besitzt zwei Disulfidbrücken, die durch dünne Verbindungslinien zwischen den Cysteinresten (©) angedeutet sind. Die Sialylmotive S und L sind durch graue Boxen dargestellt (Abbildung modifiziert nach Angata und Fukuda, 2003).

Die beiden Polysialyltransferasen, ST8SiaII und ST8SiaIV, sind unabhängig voneinander in der Lage PolySia an NCAM zu synthetisieren (Mühlenhoff *et al.*, 1996b; Angata *et al.*, 1998), wobei die Übertragung der PolySia auf N-Glykane beschränkt ist, die an der fünften und sechsten N-Glykosylierungsstelle in der 5. Ig-Domäne lokalisiert sind (Nelson *et al.*, 1995; Liedtke *et al.*, 2001; von der Ohe *et al.*, 2002). Die strukturelle Voraussetzung der Polysialylierung von NCAM durch eine der beiden Polysialyltransferasen ist eine terminale Sialinsäure, die über eine  $\alpha$ 2,3- oder  $\alpha$ 2,6-glykosidische Bindung an eine  $\beta$ 1,4-verknüpfte Galaktose gebunden ist (Mühlenhoff *et al.*, 1996b). Wie Studien in unterschiedlichen Spezies belegen, sind die Strukturen dieser PolySia-tragenden N-Glykane von einer bemerkenswerten Komplexität. NCAM aus Mäusehirn weist hauptsächlich tri- und tetraantennäre N-Glykane als PolySia-Träger auf (Liedtke *et al.*, 2001), während das NCAM aus Kälberhirn wesentliche Mengen an diantennären Glykanen zeigt (von der Ohe *et al.*, 2002). Zudem befindet sich an dem innersten N-Acetylglucosamin-Rest der zentralen Pentasaccharidstruktur ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ) der meisten polysialylierten N-Glykane eine  $\alpha$ 1,6-glykosidisch verknüpfte Fukose (Kojima *et al.*, 1996; Kudo *et al.*, 1996; Liedtke *et al.*, 2001; Geyer *et al.*, 2001; von der Ohe *et al.*, 2002) und die Reste der Corestrukturen können sulfatiert, mehrfach fukosyliert (Kojima *et al.*, 1996; Kudo *et al.*, 1996; Liedtke *et al.*, 2001; von der Ohe *et al.*, 2002) oder sogar mit HNK-1 Epitopen ( $\text{HSO}_3\text{-GlcA1-3Gal}$ ) (Geyer *et al.*, 2001) modifiziert sein.

Um die Funktionen der beiden Polysialyltransferasen zu analysieren, wurden *in vitro*-Studien mit löslichen Formen von ST8SiaII und ST8SiaIV durchgeführt. Unter diesen *in vitro*-Bedingungen konnten unabhängige Studien zeigen, dass ST8SiaII eine geringere Effizienz aufweist und ST8SiaIV mit etwa 60 Sialinsäureresten längere PolySia-Ketten synthetisiert als ST8SiaII, für die *in vitro* die Bildung von PolySia mit etwa 40 Resten nachgewiesen wurde (Kojima *et al.*, 1996; Kitazume-Kawaguchi *et al.*, 2001; Angata *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ST8SiaIV im Gegensatz zu ST8SiaII die sechste N-Glykosylierungsstelle des NCAM gegenüber der fünften bevorzugt (Angata *et al.*, 1998) und dass beide Enzyme zusammen synergistisch wirken, da die PolySia-Menge, die von beiden Enzymen gemeinsam gebildet wird, die Summe der Produktmenge der beiden Einzelreaktionen übersteigt (Angata *et al.*, 1998; Angata *et al.*, 2002).

Neben der katalytischen Fähigkeit der Polysialylierung von NCAM besitzen ST8SiaII und ST8SiaIV auch die Fähigkeit der Autopolysialylierung. In diesem autokatalytischen Prozess übertragen die Polysialyltransferasen PolySia auf eines oder mehrere der fünf (in ST8SiaIV) bzw. sechs (in ST8SiaII) im Enzym vorliegenden N-Glykane (Mühlenhoff *et al.*, 1996a; Angata *et al.*, 1998; Close und Colley, 1998; Windfuhr *et al.*, 2000; Mühlenhoff *et al.*, 2001).

Die Autopolysialylierung ist ein Bestandteil der katalytischen Funktion der Polysialyltransferasen und stellt einen Indikator für die Aktivität dar, da die Inhibierung der Autopolysialylierung zu einer vollständigen Inaktivierung der Enzyme führt (Mühlenhoff *et al.*, 1996a; Windfuhr *et al.*, 2000; Mühlenhoff *et al.*, 2001).

Die autokatalytische Aktivität der ST8SiaIV ist im Gegensatz zur NCAM-Polysialylierung, bei der terminal  $\alpha 2,3$ - oder  $\alpha 2,6$ -sialylierte Glykane als Akzeptorstruktur dienen, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Sialinsäure an den N-Glykanstrukturen des Enzyms. Allerdings führt das Fehlen einer terminalen Galaktose zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität (Mühlenhoff *et al.*, 1996b).

Mittels gerichteter Deletion der in beiden Polysialyltransferasen vorliegenden N-Glykosylierungsstellen wurden die für die enzymatische Aktivität essentiellen N-Glykosylierungsstellen ermittelt. Für ST8SiaII sind dies die N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn-89 und Asn-219 und für ST8SiaIV die N-Glykosylierungsstelle an Position Asn-74. Für minimal glykosylierte Formen, die nur noch N-Glykane an diesen Positionen tragen, konnte *in vitro* und *in vivo* NCAM- und Autopolysialylierung nachgewiesen werden (Mühlenhoff *et al.*, 2001).

Mittels Northern-Blot-Analyse und *in situ*-Hybridisierung haben verschiedene Studien gezeigt, dass ST8SiaII und ST8SiaIV in der Entwicklung des Gehirns sowohl räumlich als auch zeitlich unterschiedlich exprimiert werden, wobei sie dennoch ein überlappendes Expressionsmuster aufweisen (Kurosawa *et al.*, 1997; Phillips *et al.*, 1997; Hildebrandt *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998). Während ST8SiaII vor allem in der perinatalen Phase stark exprimiert wird, dominiert ST8SiaIV im adulten Gehirn (Hildebrandt *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998). In der perinatalen Entwicklung sind beide Enzyme in nahezu allen Gehirnregionen präsent, wohingegen im adulten Gehirn die Expression auf bestimmte Regionen, wie Hippocampus, Hypothalamus, und olfaktorischer Bulbus, begrenzt ist.

#### **1.4. PolySia-defiziente Mausmodelle**

Um die Bedeutung der Polysialylierung des NCAM *in vivo* zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mausmodelle etabliert. Bereits 1994 wurde von Cremer *et al.* die NCAM<sup>-/-</sup>-Maus vorgestellt, in der das Trägermolekül der PolySia NCAM fehlt (Cremer *et al.*, 1994). Es folgten weitere Mausmodelle, in denen, um die Funktion der einzelnen Polysialyltransferasen zu untersuchen, jeweils eines der beiden Enzyme ausgeschaltet wurde (Eckhardt *et al.*, 2000; Angata *et al.*, 2004). Schließlich gelang die Generierung einer Maus, der beide

Polysialyltransferasen fehlen (ST8SialII<sup>-/-</sup>ST8SialIV<sup>-/-</sup>-Maus), sowie einer Tripel-Knockout-Maus, der neben ST8SialII und ST8SialIV auch der PolySia-Akzeptor NCAM fehlt (Weinhold *et al.*, 2005). Abbildung 1.9 gibt einen Überblick über alle PolySia-defizienten Mausmodelle.

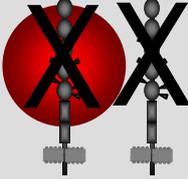
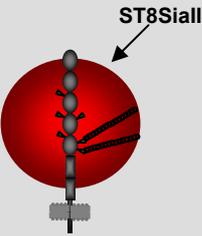
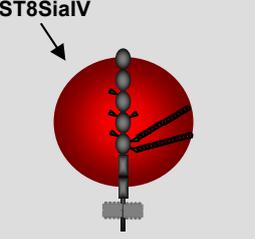
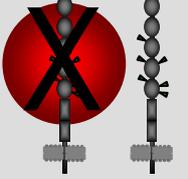
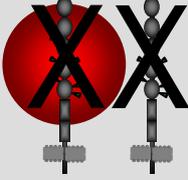
	<p style="text-align: center;"><b>NCAM-Knockout</b></p> <hr/> <p style="text-align: center;"><del>NCAM</del> ST8SialII ST8SialIV</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>• kein NCAM</li> <li>• fast keine PolySia</li> <li>• veränderte Faszikulierung der Moosfasern im Hippocampus</li> <li>• beeinträchtigt Lernverhalten</li> <li>• verkleinerter olfaktorischer Bulbus</li> </ul> <p style="text-align: right;"><i>Cremer et al. (1994)</i></p>
	<p style="text-align: center;"><b>ST8SialIV-Knockout</b></p> <hr/> <p style="text-align: center;">NCAM ST8SialII <del>ST8SialIV</del></p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PolySia positiv</li> <li>• veränderte hippocampale synaptische Plastizität in adulten Mäusen</li> </ul> <p style="text-align: right;"><i>Eckhardt et al. (2000)</i></p>
	<p style="text-align: center;"><b>ST8SialII-Knockout</b></p> <hr/> <p style="text-align: center;">NCAM <del>ST8SialII</del> ST8SialIV</p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>• PolySia positiv</li> <li>• defaszikulierte Moosfasern und ektopische Synaptogenese im Hippocampus</li> <li>• verändertes Angstverhalten</li> </ul> <p style="text-align: right;"><i>Angata et al. (2004)</i></p>
	<p style="text-align: center;"><b>Doppel-Knockout</b></p> <hr/> <p style="text-align: center;">NCAM <del>ST8SialII</del> <del>ST8SialIV</del></p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>• keine PolySia</li> <li>• normale NCAM-Expression</li> <li>• frühzeitiger Tod</li> <li>• reduziertes postnatales Wachstum</li> <li>• Hydrozephalus</li> <li>• Defekte bestimmter Gehirnfasertrakte</li> <li>• verkleinerter olfaktorischer Bulbus</li> </ul> <p style="text-align: right;"><i>Weinhold et al. (2005)</i></p>
	<p style="text-align: center;"><b>Tripel-Knockout</b></p> <hr/> <p style="text-align: center;"><del>NCAM</del> <del>ST8SialII</del> <del>ST8SialIV</del></p> <hr/> <ul style="list-style-type: none"> <li>• keine PolySia</li> <li>• kein NCAM</li> <li>• lebensfähig</li> <li>• verkleinerter olfaktorischer Bulbus</li> </ul> <p style="text-align: right;"><i>Weinhold et al. (2005)</i></p>

Abbildung 1.9: Überblick über die PolySia-defizienten Maus-Modelle.

Da NCAM das Hauptträgermolekül für PolySia ist, führt das Ausschalten des NCAM-Gens zu einem fast vollständigen Verlust von PolySia (Cremer *et al.* 1994). Trotz der zentralen Funktion von NCAM und PolySia, die beide in der Nervenentwicklung und in der Plastizität des reifen Nervensystems spielen, weisen NCAM-Knockout-Mäuse einen milden Phänotyp auf (Cremer *et al.*, 1994). NCAM<sup>-/-</sup>-Mäuse sind lebensfähig und fertil. Als Defekte zeigen sie jedoch eine auffallende Verkleinerung des olfaktorischen Bulbus, die durch eine gestörte Wanderung der olfaktorischen neuronalen Vorläuferzellen entlang des RMS von der SVZ zum Riechkolben hervorgerufen wird (Cremer *et al.*, 1994). Ein weiterer morphologischer Defekt dieser Mäuse findet sich im Moosfasertrakt des Hippocampus. Hier ist die Faszikulierung der Axone gestört, die von den Körnerzellen des Gyrus Dentatus stammen und deren Aufgabe es ist, die Pyramidenzellen der CA3-Region des Hippocampus zu innervieren (Cremer *et al.*, 1998). Die Langzeitpotenzierung (Long Term Potentiation, LTP), d.h. die lang andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung, bildet die Grundlage eines der wichtigsten Modelle für Lernen und Gedächtnis. In NCAM-defizienten Mäusen wurde eine Inhibierung des LTP in der CA1-Region des Hippocampus festgestellt, die zu einer Beeinträchtigung insbesondere des räumlichen Lernens führt (Cremer *et al.*, 1994).

Um Unterschiede in der biologischen Funktion der beiden Polysialyltransferasen sowie deren individuellen Beitrag zur NCAM-Polysialylierung herauszuarbeiten, wurden Einzel-Knockout-Mäuse generiert, denen entweder ST8SiaII (Angata *et al.*, 2004) oder ST8SiaIV (Eckhardt *et al.*, 2000) fehlt. Beide Mauslinien sind lebensfähig und fertil, besitzen nur einen milden Phänotyp und weisen, im Gegensatz zur NCAM<sup>-/-</sup>-Maus, nur einen partiellen Verlust von Polysialinsäure auf. Allerdings unterscheiden sich die Phänotypen beider Knockout-Mäuse deutlich voneinander. In ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde nur im adulten Stadium ein Verlust von PolySia beobachtet und entsprechend weisen diese Tiere keine morphologischen Defekte auf (Eckhardt *et al.*, 2000). Die Reduktion der PolySia-Expression in der CA1-Region des Hippocampus führt jedoch zu einer veränderten Plastizität der Synapsen in dieser Region (Eckhardt *et al.*, 2000). Der Phänotyp der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus zeichnet sich dagegen durch defaszikulierte Moosfasern und ektopische Synaptogenese im Hippocampus aus. Dieses sind Veränderungen, die mit einem reduzierten Angstverhalten verbunden sind (Angata *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu ST8SiaIV-defizienten Tieren konnte kein Verlust von PolySia im Gehirn von erwachsenen ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu Einzel-Knockout-Mäusen führt das gleichzeitige Ausschalten beider Polysialyltransferase-Gene zum vollständigen Verlust von PolySia (Weinhold *et al.*, 2005). ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäuse sind durch postnatale Wachstums-

retardierung, Defekten in verschiedenen Gehirnfasertrakten, Hydrocephalus und hohe postnatale Letalität gekennzeichnet (80% der Tiere eines Wurfes sterben innerhalb der ersten vier Wochen nach der Geburt). Wie in der NCAM<sup>-/-</sup>-Maus liegen in dieser Doppel-Knockout-Maus Defekte der Moosfasern im Hippocampus und Defekte in der tangentialen Migration neuronaler Vorläuferzellen aus der SVZ in den olfaktorischen Bulbus vor. Da die ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus über eine normale NCAM-Expression verfügt, ist die Ursache dieser Defekte auf die Abwesenheit von PolySia zurückzuführen (Weinhold *et al.*, 2005). Obwohl PolySia im gesamten sich entwickelnden Gehirn zu finden ist (Seki und Arai, 1993), liegen in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Maus nur Schädigungen an bestimmten Fasertrakten vor. Hervorzuheben ist die gänzliche Abwesenheit der vorderen Kommissur, die die beiden Temporallappen der beiden Hirnhemisphären miteinander verbindet. Die innere Kapsel, die den Hauptdurchgang von Fasern zur Großhirnrinde bildet, ist ebenfalls in ihrer Größe drastisch reduziert. Der mammillothalamische Trakt, dessen Fasern die mammillaren Körperchen mit Kernen des Thalamus verbindet und Teil des limbischen Systems sind, ist ebenfalls unterentwickelt. Darüber hinaus wurde eine unvollständige Entwicklung des corticospinalen Fasertraktes beobachtet.

Bemerkenswerterweise kann die Ausbildung des letalen Phänotyps durch ein zusätzliches Ausschalten des NCAM-Gens (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>NCAM<sup>-/-</sup>-Maus) verhindert werden. Dabei werden alle Defekte, die spezifisch für ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäuse sind, in den Tripel-Knockout-Tieren aufgehoben. Dies zeigt, dass der Verlust von PolySia zu einem Funktionsgewinn des NCAM führt, der für den Organismus letal ist. Diese anhand der unterschiedlichen Mausmodelle gewonnenen Daten zeigen eindrücklich, dass PolySia eine Schlüsselrolle bei der Regulation NCAM-vermittelter Interaktionen zukommt.

## **1.5. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es, individuelle sowie gemeinsame Funktionen der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV aufzudecken. Hierbei stand die Bedeutung der beiden Enzyme für die NCAM-Polysialylierung *in vivo* im Vordergrund, die durch vergleichende biochemische Analyse von Wildtyp-, ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Mäusen herausgearbeitet werden sollte. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Veränderungen der Gendosis von ST8SiaII und ST8SiaIV auf das Polysialylierungsmuster haben, wurden insgesamt neun Mauslinien, die sich nur in der Anzahl funktioneller Polysialyltransferase-Allele unterscheiden, in die Studie einbezogen. Unter Verwendung von neonatalem

Hirnmateriale sollte eine umfassende Analyse der NCAM-Polysialylierung auf Polysaccharid-, Protein- und Transkriptebeue erfolgen. Dieser Ansatz sollte Einblick in die Funktion der beiden Polysialyltransferasen in der Perinatalphase, dem Zeitfenster maximaler PolySia-Expression, geben.

Daneben sollte die funktionelle Rolle von ST8SiaII und ST8SiaIV während der ersten drei Wochen der postnatalen Hirnentwicklung untersucht werden, da bekannt war, dass der PolySia-Spiegel dramatischen postnatalen Veränderungen unterliegt. Hier galt es zunächst ein detailliertes Bild über die entwicklungsabhängigen Veränderungen des NCAM-Polysialylierungsstatus, des NCAM-Isoform-Musters sowie der NCAM- und Polysialyltransferase-Spiegel im Wildtyp-Hirn zu erarbeiten, da zu Beginn der Arbeit keine genauen Daten zur zeitlichen Abfolge vorlagen. Darauf aufbauend, sollte anschließend eine Analyse der postnatalen Veränderungen während der postnatalen Hirnentwicklung von ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout Mäusen erfolgen.

Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Fähigkeit von ST8SiaII und ST8SiaIV zur Autopolysialylierung aufzudecken, sollten beide Polysialyltransferasen rekombinant in Insektenzellen exprimiert und in einem *in vitro*-Aktivitätstest untersucht werden. Um eine spätere Strukturanalyse der für die Autopolysialylierung erforderlichen N-Glykane zu erleichtern, sollten für beide Enzyme minimal glykosylierte, jedoch autopolysialylierungskompetente Formen von ST8SiaII und ST8SiaIV hergestellt, aufgereinigt und hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1. Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere

#### 2.1.1. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> JM109 (Stratagene)	e14 <sup>(McrA<sup>-</sup>)</sup> recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) supE44 relA1 Δ(lac-proAB)[F' traD36 proAB lacI <sup>q</sup> Z ΔM15]
<i>E. coli</i> XL1Blue (Stratagene)	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> Z ΔM15 Tn 10 (Tetr)]
DH <sub>10</sub> Bac <sup>TM</sup> (Invitrogen)	F <sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu) 7697 galU galK λ rpsL nupG /pMON14272 / pMON7124

#### 2.1.2. Zelllinien

Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Zelllinie
-----	--

#### 2.1.3. Labortiere

ST8SiaII<sup>-</sup> (Angata *et al.*, 2004) und ST8SiaIV<sup>-</sup> (Eckhardt *et al.*, 2000) Knockout-Mäuse wurden für sechs Generationen mit C57Bl/6J- Mäusen (Charles River) rückgekreuzt. ST8SiaII<sup>-</sup> und ST8SiaIV<sup>-</sup>-Einzel-Knockout-Linien wurden miteinander gekreuzt, um doppelt heterozygote ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>-Tiere zu erhalten. Um alle möglichen allelischen Kombinationen herzustellen, wurden ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>-Mäuse mit ST8SiaII<sup>+/+</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup> oder ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>-Mäusen gekreuzt und die so erzeugten ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup> verpaart. Wildtyp-Mäuse wurden durch die Kreuzung zwischen ST8SiaII<sup>+/+</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Tieren oder zwischen ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>-Tieren erhalten. Tripel-Knockout-Mäuse, denen NCAM- und Polysialyltransferase-Gene fehlen, wurden mittels Verkreuzung von ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup> und NCAM<sup>-/-</sup> (Cremer *et al.*, 1994) Mäusen und darauf folgende Rückkreuzungen erhalten (Weinhold *et al.*, 2005). Durch Kreuzung von Wildtyp-Mäusen mit NCAM-Knockout-Mäusen konnten NCAM-heterozygote Mäuse erzeugt werden. NCAM-heterozygote Mäuse, die nur noch ein Allel einer Polysialyltransferase besitzen, wurden durch Kreuzung von Tripel-Knockout-Mäusen mit ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>NCAM<sup>+/+</sup>-Mäusen bzw. mit ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>NCAM<sup>+/+</sup>-Mäusen erhalten. Die Verpaarung der Polysialyltransferase-Doppel-Knockout-Maus (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>NCAM<sup>+/+</sup>) und der Tripel-Knockout-Maus (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>NCAM<sup>-/-</sup>) konnten Mäuse erzeugt werden, die nur ein Allel NCAM besitzen

(ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>NCAM<sup>+/-</sup>).

Die Herstellung dieser unterschiedlichen Genotypen und die Genotypisierung der Mäuse wurden von Dr. Weinhold aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerardy-Schahn in der Abteilung Zelluläre Chemie durchgeführt.

## 2.2. Plasmide und Oligonukleotide

### 2.2.1. Plasmide

pFastBac	Transfervektor für Baculovirale Expression über Bacmid (Gibco)
pFastBac-HBM-ST8SiaIV (ab AS 26)-MycHis	pFastBac-Vektor mit ST8SiaIV aus Hamster (ab AS 26) mit N-terminalem HBM-Signal und C-terminalem Myc-Epitop und sechs Histidinen.
pST8SiaII (ab AS 32)-MycHis	pSecTag-Vektor mit ST8SiaII aus Maus (ab AS 32), mit C-terminalem Myc-Epitop und sechs Histidinen.
pFastBac-HBM-His-rTev-ST8SiaIV(+1,2) (ab AS 26)	pFastBac-Vektor mit ST8SiaIV aus Hamster (ab AS 26), in der nur die erste und die zweite Glykosylierungsstelle intakt ist, mit sechs N-terminalen Histidinen und einer rTev-Protease-Site und N-terminalem HBM-Signal.
pFastBac-HBM-His-rTev-ST8SiaIV(+2) (ab AS 26)	pFastBac-Vektor mit ST8SiaIV aus Hamster (ab AS 26), in der nur die zweite N-Glykosylierungsstelle intakt ist, mit N-terminalem HBM-Signal, sechs Histidinen und einer rTev-Protease-Site.
pST8SiaII (ab AS 32)(+3,5)-MycHis	pSecTagB-Vektor mit ST8SiaII aus Maus (ab AS 32) ohne die N-Glykosylierungsstellen 1, 2, 4 und 6 und mit C-terminalem Myc-Epitop und sechs Histidinen.
pBluescript SK (-)	Klonierungsvektor (Stratagene)

### In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pFastBac-HBM-ST8SiaIV (+2) (ab AS 26)-Myc His	<p>pFastBac-Vektor mit ST8SiaIV aus Hamster (ab AS 26), in der nur die zweite N-Glykosylierungsstelle intakt ist, mit HBM (<i>honey bee melittin</i>) Sekretionssignal und C-terminalen Myc-Epitop und sechs Histidinen.</p> <p>Dieses Plasmid wurde hergestellt, indem mittels PCR die ST8SiaIV (+2)-Sequenz mit den Primern ION16 und ION14 aus dem Plasmid pFastBac-HBM-His-rTev-ST8SiaIV(+2) (ab AS 26) amplifiziert und über XhoI und EcoRI in das Plasmid pFB-HBM-ST8SiaIV-Myc-His kloniert wurde.</p>
pFastBac-HBM-ST8SiaIV (+1,2) (ab AS 26)-Myc His	<p>pFastBac-Vektor mit ST8SiaIV aus Hamster (ab AS 26), in der nur die erste und die zweite N-Glykosylierungsstelle intakt ist, mit HBM- (<i>honey bee melittin</i>) Sekretionssignal und C-terminalen Myc-Epitop und sechs Histidinen.</p> <p>Dieses Plasmid wurde über drei Umklonierungsschritte generiert. Es wurde die</p>

	ST8SiaIV-Sequenz aus pFastBac-HBM-ST8SiaIV (ab AS 26)-MycHis mit SacI und EcoRI geschnitten und in den pBluescript-Vektor kloniert. Über BsmBI und EcoRI wurde ein ST8SiaIV-Fragment aus pFastBac-HBM-His-rTev-ST8SiaIV (+1,2) (ab AS 26) in die ST8SiaIV-Sequenz im pBluescript-Vektor kloniert. Aus diesem wurde mit EcoRI und SacI diese Sequenz zurück in pFastBac-HBM-ST8SiaIV (ab AS 26)-MycHis kloniert.
pFastBac-HBM-ST8SiaII (ab AS 32)-MycHis	pFastBac-Vektor mit ST8SiaII aus Maus (ab AS 32) mit N-terminalem HBM-Sekretionssignal und C-terminalem Myc-Epitop und sechs Histidinen.  ST8SiaII (ab AS 32) wurde über eine PCR mit den Primern ION15 und KS1R aus Plasmid pST8SiaII (ab AS 32)-MycHis amplifiziert und mit SacI und HindIII in pFastBac-HBM-ST8SiaIV-MycHis kloniert.
pFast-Bac-HBM-ST8SiaII (+3,5) (ab AS 32)-MycHis	pFastBac-Vektor mit ST8SiaII aus Maus (ab AS 32), in der nur die dritte und die fünfte N-Glykosylierungsstelle intakt ist, mit HBM- ( <i>honey bee melittin</i> ) Sekretionssignal und C-terminalem Myc-Epitop und sechs Histidinen.  Dieses Plasmid wurde hergestellt, indem über eine PCR die Sequenz von ST8SiaII (+3,5) mit den Primern ION15 und KS1R aus dem Plasmid pST8SiaII (+3,5) (ab AS 32)-MycHis amplifiziert und über SacI und HindIII in pFastBac-HBM-ST8SiaIV-MycHis kloniert wurde.

### 2.2.2. Oligonukleotide

Die Primer wurden von *MWG Biotech* bezogen und mit sterilem ddH<sub>2</sub>O auf eine Endkonzentration von 100 µM gebracht.

#### Primer für Klonierungen

ION13	5'-CCG AGC TCG GCC AGA ACT GAG GA-3'
ION14	5'-CTG AAT TCT AAT GGC ATT CTG TG-3'
ION15	5'-CCG AGC TCG ATC GGG AAT TCT GGA GG-3'
ION16	5'-AGC TCG AGA GCC AGA ACT GAG GAG-3'
KS1R	5'-CTA AGC TTT CAA TGA TGA TGA TGA TGA-3'

#### Sequenzierprimer

KS007F	5'-TAT TCC GGA TTA TTC ATA CC-3'
KS007R	5'-CAA CAA TTG CAT TCA TTT TAT-3'
CB014	5'-TTT AAA GTT CTT GGA TGC-3'

## Primer für Real-Time PCR

ST8SialII forward	5'-GGC TGT GGC CAG GAG ATT G-3'
ST8SialII reverse	5'-GGC ATA CTC CTG AAC TGG AGC C-3'
ST8SialIV forward	5'-GCA CCA AGA GAC GCA ACT CAT C-3'
ST8SialIV reverse	5'-CAG AGC TGT TGA CAA GTG ATC TGC-3'
HPRT forward	5'-TTC CTC ATG GAC TGA TTA TGG ACA-3'
HPRT reverse	5'-AGA GGG CCA CAA TGT GAT GG-3'
NCAM Nr.1 forward	5'-GGA TGC CTC CAT CCA CCT C-3'
NCAM Nr.1 reverse	5'-GGC CGT CTG ATT CTC TAC ATA GG-3'
NCAM Nr.2 forward	5'-GCCTCCAACCATCATCTGGA-3'
NCAM Nr.2 reverse	5'-GTAGTTGTTGGACAGGACTATGAACC-3'
NCAM Nr.3 forward	5'-ACA CAA AGG CCG AGA TGT CAT T-3'
NCAM Nr.3 reverse	5'-CTG ATC TGC AGG TAG TTG TTG GAC-3'
NCAM-120 forward	5'-ACT TTG TGT TCA GGA CCT CAG CC-3'
NCAM-120 reverse	5'-GAG GTG GAG CTT CCG CCC-3'
TBP forward	5'-CAC TTC GTG CAA GAA ATG CTG-3'
TBP reverse	5'-AAT CAA CGC AGT TGT CCG TG-3'

## 2.3. Antikörper

### Primärantikörper

Maus IgG	IgG-Antikörper aus der Maus (Pierce)
Maus $\alpha$ -Penta-His (200 $\mu$ g/ml)	monoklonaler Antikörper (Maus IgG) gegen das Pentahistidin-Epitop gerichtet (Qiagen)
$\alpha$ -PolySia (735)	monoklonaler Antikörper (Maus IgG2a), erkennt $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäureresten (Frosch <i>et al.</i> , 1985)
Maus $\alpha$ -NCAM (KD11)	monoklonaler Antikörper (Maus IgG1), erkennt eine Peptidsequenz am C-terminalen Ende der Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 (Gerardy-Schahn and Eckhardt, 1994)
$\alpha$ -NCAM(H28)	monoklonaler Antikörper (Ratte IgG2a), erkennt eine Peptidsequenz an der zweiten Fibronectin III-ähnlichen Domäne aller drei NCAM-Isoformen (Hirn <i>et al.</i> , 1983)
Maus $\alpha$ -Myc (9E10)	monoklonaler Antikörper (Maus IgG1) gegen das Myc-

---

	Epitop gerichtet (EQKLISEEDLDL)
Fabfragmente des mAk 735 biotinyliert (0,9 mg/ml)	Davids Biotechnology

### Sekundärantikörper

$\alpha$ -Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Dianova
Ziege- $\alpha$ -Maus IgG-POX-Konjugat	Southern Biotechnology Associates
Ziege- $\alpha$ -Ratte IgG-POX-Konjugat	Dianova
$\alpha$ -Ratte-IRDye800	Li-COR
$\alpha$ -Maus-IRDye800	Li-COR
Streptavidin-POX (500 U/ml)	Roche

## 2.4. Enzyme

alkalische Phosphatase (CIP) (1 U/ $\mu$ l)	New England Biolabs
EndoNF	Die Endoneuraminidase NF (EndoNF) stammt aus einem <i>E. coli</i> K1-Phagen. Sie bindet an $\alpha$ 2,8-verknüpfte Sialinsäuren ab einem Polymerisationsgrad von acht Resten und spaltet ein Oktamer, so dass drei Reste am nicht-reduzierenden Ende und fünf am reduzierenden Ende der Spaltstelle liegen (Stummeyer <i>et al.</i> , 2005).
Pfu DNA Polymerase (2,5 U/ $\mu$ l)	Stratagene
Platinum Taq DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Ribonuclease Inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	Fermentas
RQ1 RNase freie Desoxyribonuklease I (1 U/ $\mu$ l)	Promega
SuperScript II RNase H Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	Invitrogen
T4-DNA-Ligase (400 U/ $\mu$ l)	BioLabs
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs

## 2.5. Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin	Serva
Acrylamid 40% 4 K-Mix (37,5:1)	Applichem
Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth
Agarose, ultra Pure	Serva

---

Ammoniaklösung 28-30%	Merck
Aprotinin	Bayer
APS	BioRad
Avidin	Sigma
BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat)	Applichem
Benzamidin	Sigma
Bestatin	Sigma
Bisacrylamid	Gibco
Borat, Natriumsalz	Merck
Bromphenolblau	Applichem
BSA	Applichem
Calpain I	Sigma
Calpain II	Sigma
Chloroform	JTBaker
Citronensäure Monohydrat	Merck
Coomassie Blue R	Roth
Cytidin 5'-monophosphat Sialinsäure	Sigma
Diethyl-pyrocbonat (DEPC) 97%	Fluka
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
DMF	Fluka
DMSO	Merck
dNTPs (je 100 mM ATP, CTP, GTP, TTP)	Pharmacia
EDTA, Dinatriumsalz	Merck
Essigsäure (100%)	Merck
Ethanol (absolut)	Baker
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth
Formaldehyd	Sigma
Glycerin (wasserfrei)	Merck
Glycin	Serva
HEPES 1 M	Serva
IgG-Sepharose	Pharmacia
Imidazol	Fluka
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranose) (1M)	AppliChem
Isopropanol	Merck
Kaliumphosphat	Merck
Leupeptin	Serva
Liopfectamin Transfektionsreagenz	Invitrogen
LPA (Linear Polyacrylamide) Gene Elute LPA	Sigma
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Manganchlorid	Merck
MES	Calbiochem
Methanol	Baker
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Riedel de Haen
Natriumhypochloritlösung	Roth
NBT (Nitrotetrazoliumblauschwarz)	Applichem

---

---

Odyssey-Blocking-Reagenz	Li-Cor
OptiMEM	Gibco
Ortho-Perjodsäure	Riedel-de Haen
Paraformaldehyd	Baker
Pd(N)6 Random Hexamer	GE Healthcare
Pepstatin	Roche
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Roche
Ponceau S, Natriumsalz	Sigma
ROX-Referenz-Farbstoff	Invitrogen
Saccharose	Merck
Salzsäure, konz.	Riedel de Haen
Schwefelsäure, konz.	Baker
SDS	Merck
Silbernitrat	Applichem
SYBR Green I nucleic acid gel stain	Invitrogen
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Merck
Tris	Merck
Triton X-100	Serva
Trizol Reagenz	Invitrogen
Trypanblau	Merck
Tween 20	Fluka
X-Gal	Roth

## 2.6. Nährmedien, Puffer und Zusätze

### 2.6.1. Nährmedien und Zusätze

#### Bakterienkultur

LB (Luria Bertani)-Medium	1% Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl, pH 7,5
Ampicilin	Serva
Bacto-Agar	Becton Dickinson
Bactotrypton	Becton Dickinson
BluoGal	Gibco BRL
Carbenicillin	Fluka
Gentamycin	Sigma
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranose)	Applichem
Kanamycin	Sigma
LB-Agar-Platten	LB-Medium mit 1,5% Bacto-Agar

---

S.O.C Medium	2,0% Bacto Trypton
	0,5% Hefe Extrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	20 mM Glucose
Tetracyclin	Gibco BRL

### **Insektenzellkultur**

Insect XPress	Bio Whittaker
Tryptan blue solution (0,4%)	Sigma cell culture
Cellfectamin (2 mg/ml)	Gibco BRL
Streptomycin [10 mg/ml]	Gibco BRL
Penicillin [1000 U/ml]	Sigma

### **2.6.2. Standardlösungen- und puffer**

2x-Laemmli-Puffer	200 mM Tris-HCl pH 6,8
	20% (v/v) Glycerin
	3% (w/v) SDS
	5% (v/v) β-ME
	0,1% (w/v) Bromphenolblau
TE	10 mM Tris-HCl pH 8,0
	0,1 mM EDTA
PBS	150 mM NaCl
	10 mM Natriumphosphat

### **2.7. Geräte**

Autoklav	Varioklav
Blotkammer Fast-Blot B44	Biometra
Brutschränke:	
Bakterien	Heraeus
Insektenzellen	Sanyo
Eismaschine MF22	Scotsman
Elektrophoresekammern für Agarosegele:	
HE 99X für Gelvolumen 200 ml	Pharmacia

---

40-0911 für Gelvolumen 50 ml	Peqlab
Elektrophoresekammern für SDS-PAGE	Amersham
ELISA-Reader	Asys Hitech
FPLC: Äkta design	Amersham Pharmacia Biotech
Pumpe P920	Amersham Pharmacia Biotech
Monitor UPC 90	Amersham Pharmacia Biotech
Fraktionsammler	Amersham Pharmacia Biotech
Filmentwicklung:	
Hyper Processor	Amersham
Geldokumentation:	
AlphaImager	Biozym
Glasgeräte	Schott
Heizblock	Eppendorf
Image Station 440CF, Kodak Digital Science	Kodak
Kühlschrank	Liebherr
Kühlzentrifugen:	
Beckmann Coulter Avanti J 301	Beckmann
Rotoren: JA 25.50 und JLA 10.500	
Centrifuge 5804	Eppendorf
Multifuge 3 S-R	Heraeus
Mikropipetten	Eppendorf
Multipette plus	Eppendorf
Odyssey Infrared Imaging System	Li-Cor
Peristaltic Pump P-1	Amersham Pharmacia Biotech
PH-Meter: 766 Calimatic	Knick
Photometer Ultrospec 2100 pro	Pharmacia
Reinstwasseranlage	Barnstead
Real-Time PCR-System Fast 7500	Applied Biosystems
Real-Time PCR-System 7700	Applied Biosystems
Rocking Platform	Biometra
Schüttelinkubator	Edmund Bühler
Sonifier 450	Branson
Spannungsquellen:	
Power Pack P25	Biometra
2197 Power Supply	LKB Bromma
Speedvac RVC 2-18	Christ
Software	
Windows XP home edition	Microsoft
MS Word	Microsoft
MS Excel	Microsoft
Photoshop CS	Adobe
ChemDraw Ultra 5.0	Cambridge Soft
EditSeq	DNA Star
Map Draw	DNA Star
Kodak 1D 3.5 Network Software	Kodak
7500 Fast System	Applied Biosystems
Primer Express	Applied Biosystems
Sterilwerkbank Hera Safe	Heraus
Thermoblock TB 1	Biometra
Thermocycler:	

---

---

T1	Biometra
T Gradient	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifugen:	
Biofuge fresco	Heraeus
Eppendorf Centrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge Sepatech	Heraeus
Ultra-Mikro-Quarzküvette 105.202-QS	Hellma
Ultra-Turrax	Ika-Werk
UV-Tisch UVT-20 LE	Herolab
Vakuumpumpe	Ilmvac
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage CP 224S ( $\mu\text{g}$ ) und CP 3202 (g)	Sartorius
Zentrifugenbecher (50 ml; 250 ml; 500 ml)	Nalgene
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Beckman

## 2.8. Verbrauchsmaterialien

Cellulose Acetat Filter (0,8 $\mu\text{m}$ )	Sartorius AG
MicroAmp Optical Caps	Applied Biosystems
Kryoröhrchen	Corning
Koroslex plus	Roche
LumiFilm Chemilumineszenz Detection Film	Roche
PVDF-Membran, Immobilon-FL	Millipore
PVDF-Membran für das Odyssey-System	Li-Cor
PCR-Tubes	Biozym
PCR-Platte (Microamp 96-Loch-Platten)	Applied Biosystems
Sterilfilter	Corning
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polypropylenröhrchen	Greiner
Sterilfilter	Corning
Zentrifugalkonzentratoren	VivaScience
Ultrafiltration Amicon Ultra 4 ml (30.000 D)	Millipore
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellkulturschalen	Greiner
96 well Multiply PCR-Platte (0,2 ml)	Sarstedt
Nitrozellulose (0,1 $\mu\text{m}$ Porengröße)	Schleicher & Schell
PCR-Gefäße (0,2 ml, farblos)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 0,5 ml)	Sarstedt
Filterpapier 3MM	Whatman
Phase Lock Gefäße (1,5ml; 2 ml)	Eppendorf
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter (0,5 – 10 $\mu\text{l}$ )	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner
Mikrotiterplatte (96 well)	Greiner
Petrischalen (92 x 16 mm)	Sarstedt
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter (10 – 100 $\mu\text{l}$ )	Sarstedt
Biosphere Pipettenspitzen mit Filter (100 – 1000 $\mu\text{l}$ )	Sarstedt
Zentrifugenfilter Millipore 30000	Millipore

---

### Kits zur Nukleinsäure-Aufreinigung

<i>Qiagen Plasmid Midi Kit</i>	Qiagen
<i>Concert High Plasmid Purification System</i>	Gibco BRL
<i>Qiaquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>Qiaquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen

### Sonstige Kits

BCA Kit	Pierce
---------	--------

### Molekulargewichtsmarker

DNA-Marker:

*Ikb-Marker* [1 µg/µl] GibcoBRL

[kb]: 0,075; 0,134; 0,154; 0,201; 0,22; 0,298; 0,344; 0,396; 0,506; 0,517; 1,018;  
1,636; 2,054; 3,054; 4,072; 5,09; 6,108; 7,126; 8,144; 9,162; 10,18; 11,198;  
12,216

*λ-DNA/HindIII-Fragmente* [0,5 µg/µl] GibcoBRL

[kb]: 0 Δ,135; 0,56; 2,03; 2,23; 4,63; 6,68; 9,41; 23,13

pBR322/BsuRI (Hae III) [0,5 µg/µ] MBI Fermentas

[bp]: 587; 540; 502; 458; 434; 267; 234; 213; 192; 184; 124; 123; 104; 89; 80; 64;  
57; 51

Protein-Marker:

*SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range* BioRad

[kDa]: 14,4; 21,5; 31; 45; 66,2; 97,4

*SDS-PAGE Molecular Weight Standards High Range* BioRad

[kDa]: 45; 66,2; 97,4; 116; 200

*Precision Plus Unstained, Protein Marker* BioRad

[kDa]: 250; 150; 100; 75; 50; 25

*Precision Plus Dual Colour, Protein Marker* BioRad

[kDa]: 250; 150; 100; 75; 50; 25

## 3. Methoden

### 3.1. Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

##### Mini-Plasmidpräparationen

Puffer:

Puffer P1	50 mM Tris-HCl pH 8.0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2	200 mM NaOH
	1 % SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat

4 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht oder mindestens 6 h bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden zentrifugiert (1 min, 16000 x g, RT). Das Pellet wurde in 100 µl des Puffers P1 resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von je 100 µl Puffer P2 und gekühltem Puffer P3. Die Ansätze wurden vorsichtig nach Zugabe der Puffer durch Kippen der Reaktionsgefäße gemischt. Um den ausgefallenen Niederschlag, bei dem es sich um Protein-SDS-Komplexe, chromosomale DNA und hochmolekulare RNA handelt, abzutrennen, wurde zentrifugiert (5 min, 16000 x g, RT). Der Überstand wurde mit 300 µl Isopropanol versetzt und nach 5 min Inkubation bei RT zentrifugiert (10 min, 16000 x g, RT). Anschließend wurde das Pellet mit 300 µl kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 min, 16000 x g, RT) und nach Trocknen unter Vakuum in 20 µl TE aufgenommen.

##### Midi-Plasmidpräparationen

Präparationen von DNA im Midi-Maßstab wurden mit dem QIAprep® Midi Kit der Firma Qiagen nach deren Protokoll durchgeführt.

### 3.1.2. PCR (*polymerase chain reaction*)

Mit Hilfe der PCR wird DNA amplifiziert. Zu der zu amplifizierenden Nukleinsäure werden eine hitzebeständige Polymerase und zwei Primer, einer für den sense-Strang (*forward-Primer*) und einer für den antisense-Strang (*reverse-Primer*), hinzugefügt. Durch Erhitzen wird die DNA zu Einzelsträngen denaturiert, und während der Abkühlungsphase lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Anschließend erfolgt durch *Taq*- oder *Phusion*-Polymerase eine Verlängerung der Primer und damit die Synthese des Gegenstranges. Durch wiederholende Zyklen dieser Reaktionen findet eine exponentielle Amplifikation der Nukleinsäure statt.

PCR unter Verwendung der Polymerase *Phusion*:

PCR-Ansatz:

x  $\mu\text{l}$  1 pg/ $\mu\text{l}$ -10 ng/ $\mu\text{l}$  Template

10  $\mu\text{l}$  5x *Phusion* HF-Puffer

5  $\mu\text{l}$  2 mM dNTPs

0,5  $\mu\text{l}$  *forward* Primer (100  $\mu\text{M}$ )

0,5  $\mu\text{l}$  *reverse* Primer (100  $\mu\text{M}$ )

0,5  $\mu\text{l}$  2U/ $\mu\text{l}$  *Phusion*-DNA-Polymerase

33,5 – x  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O ad 50 $\mu\text{l}$

PCR-Programm:

1. 98°C	30 s	
2. 98°C	10 s	} 25 bis 35 Zyklen
3. T <sub>m</sub> +3°C	30 s	
4. 72°C	30 s	
5. 72°C	300 s	
7. 4°C	Pause	

PCR unter Verwendung der *Taq*-Polymerase:

PCR-Ansatz:

x µl 1-100 ng/µl Template

10 µl 10x Thermo-Pol-Puffer

10 µl 2 mM dNTPs

1 µl *forward* Primer (100 µM)

1 µl *reverse* Primer (100 µM)

0,5 µl 5U/µl *Taq*-DNA-Polymerase

77,5 – x µl ddH<sub>2</sub>O ad 100µl

PCR-Programm:

1. 94°C	90 s	
2. T <sub>m</sub> -5°C	30 s	} 20 bis 25 Zyklen
3. 72°C	30 s	
4. 94°C	30 s	
5. T <sub>m</sub> -5°C	60 s	
6. 72°C	60 s	
7. 4°C	Pause	

### **Berechnung der Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) von Oligonukleotiden**

Die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) von Oligonukleotiden wird von der Zusammensetzung der Basen bestimmt und berechnet sich wie folgt:

$$T_m = (4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)) \text{ °C}$$

G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin

#### **3.1.3. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen wurde UV-photometrisch bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm bestimmt.

Bei zu geringen DNA-Mengen wurden die Konzentrationen nach Agarose-Gelelektrophorese durch Intensitätsvergleich mit Banden des Markers *λDNA/HindIII-Fragmente* (100 ng/μl) abgeschätzt.

#### 3.1.4. Agarose-Gelelektrophorese

Puffer:

1x TBE	100 mM Tris/HCl
	100 mM Borsäure
	2,5 mM EDTA, pH 8,0
2xGEBS	20% Glycerol
	50 mM EDTA
	0,05% Bromphenolblau
	0,5% Sarcosyl

Es wurden je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente 0,8% oder 1%ige Agarose-Gele hergestellt. Dazu wurden entsprechend 0,8% oder 1% Agarose in 1x TBE unter Erwärmen gelöst und in einen horizontalen Gelträger gegossen. Die DNA-Proben wurden 1:2 mit 2xGEBS verdünnt und in die Geltaschen des Gels aufgetragen. Als Größenstandards wurden je 5 μl *1 kb DNA-Marker* (100 ng/μl, Invitrogen) oder *λDNA/HindIII-Fragmente* (100 ng/μl, Invitrogen) aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 130 V mit 1xTBE als Laufpuffer.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 10 bis 20 min in Ethidiumbromid-Lösung (50 μg/ml) angefärbt, unter UV-Licht (302 nm) betrachtet und fotografiert.

#### 3.1.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen) durchgeführt.

#### 3.1.6. Restriktionsspaltung von DNA

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden Restriktionsverdau durchgeführt. Die Plasmide wurden mit Restriktionsendonukleasen an für diese Enzyme spezifischen Sequenzen geschnitten.

Für analytische Verdau wurde der folgende Ansatz verwendet:

1 µg Plasmid-DNA

2 U Restriktionsenzym

1 µl 10 x Puffer des entsprechenden Restriktionsenzym

ad 10 µl ddH<sub>2</sub>O

Der für einen präparativen Verdau verwendete Ansatz war dieser:

5 µg Plasmid-DNA

10 U Restriktionsenzym

10 µl 10 x Restriktionspuffer

ad 50 µl ddH<sub>2</sub>O

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Ansatz gelelektrophoretisch getrennt und im Fall eines präparativen Verdau aufgereinigt. Die Größe der Fragmente wurde durch den Vergleich mit dem *1 kb-Marker* abgeschätzt.

### **3.1.7.     Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die mit Restriktionsenzymen gespalten wurden (s. 3.1.6.) erfolgte über das *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen).

### **3.1.8.     Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren**

Um zu vermeiden, dass linearisierte Vektoren inter- und intramolekulare Reaktionen eingehen, wurden diese mit Alkalischer Phosphatase behandelt.

Zu 2 µg linearisierten Vektor wurden 2,5 U Alkalische Phosphatase gegeben und 60 min bei 37°C inkubiert.

### 3.1.9. Ligation

T4-DNA-Ligase-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 7,8
	10 mM Mg <sub>2</sub> Cl
	1 mM ATP
	10 mM DTT
	25 µg/ml BSA

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ist in der Lage durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe desselben Moleküls oder zweier verschiedener Moleküle sowohl überhängende als auch glatte DNA-Enden miteinander zu verknüpfen.

25 ng linearisierter Vektor wurden mit der 5-fachen Menge des zu ligierenden Fragmentes mit 300 - 400 U T4-DNA-Ligase und in Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 15-20 µl 2 h bei RT, über Nacht bei 16°C oder über das Wochenende bei 4°C ligiert.

### 3.1.10. Transformation

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde diese in CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* JM109 oder *E. coli* XL1Blue transformiert.

100 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* JM109 bzw. XL1Blue wurden auf Eis aufgetaut und mit 5-10 µl Ligationsansatz versetzt. Nach Zugabe der DNA wurde der Ansatz 10 bis 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Temperaturschock von genau 4 min bei 37°C wurde der Transformationsansatz 20 min auf Eis und nach Zugabe von 500 µl LB-Medium 30 min bei 37°C inkubiert.

100 µl des Ansatzes wurden direkt auf eine LB-Agar-Platte (100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Der Rest des Ansatzes wurde zentrifugiert (20 s, 16000 x g, RT), das Bakterienpellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls auf eine LB-Agar-Platte (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.1.11. Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* XL1Blue bzw. JM109

Alle verwendeten Gefäße und Lösungen wurden auf Eis vorgekühlt. 100 ml LB-Medium wurden mit *E. coli* XL1-Blue bzw. mit *E. coli* JM109 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 5 min auf Eis gekühlt,

10 min bei 4°C und 6000 x g zentrifugiert und die Bakterien in 40 ml eiskalter 100 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach einem Waschschrift mit 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung und erneuter Zentrifugation bei 6000 x g wurden die Bakterien in 40 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und pelletiert. Das Pellet wurde dann in 4 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, nach 20 min auf Eis mit 400 µl Glycerol versetzt und dann in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **3.1.12. Herstellung von DMSO-Stocks von *E. coli***

Zur langfristigen Lagerung wurden DMSO-Stocks hergestellt: 930 µl Bakteriensuspension wurden mit 70 µl DMSO (Endkonzentration 7%) versetzt und bei -80°C gelagert.

#### **3.1.13. Sequenzierung**

Die Sequenzierung wurde in Auftragsarbeit von „GATC-Biotech“ durchgeführt.

#### **3.1.14. RNA-Präparation**

Die Präparation von RNA aus Mäusehirn erfolgte mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion unter Verwendung von TRIZOL (Invitrogen). Auf das noch gefrorene Gehirn wurde zunächst 1 ml 4°C kaltes TRIZOL gegeben und sofort mit dem Ultraturax homogenisiert. Das Homogenat wurde mit so viel TRIZOL weiter verdünnt bis das Gewebe vollständig gelöst war. Es wurde das Homogenat in 1 ml-Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots, mit denen anschließend keine Phenol-Chloroform-Fällung durchgeführt werden sollte, wurden bei -80°C eingefroren. Zu einem 1 ml-Aliquot des TRIZOL-Lysats wurde 1 µl LPA (*linear polyacrylamide*)-Lösung (25 mg/ml) und 200 µl Chloroform gegeben und gut gemischt. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis, erfolgte ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 16.000 x g und bei 4°C. Die obere wässrige, RNA-enhaltene Phase der Phenol-Chloroform-Probe wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt, indem 500 µl Isopropanol zur wässrigen Lösung gegeben wurde, und diese anschließend gut gemischt wurde. Es folgte eine Inkubation bei RT für 10 min und ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 16.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 90 µl DEPC-Wasser (mit Diethylpyrocarbonat behandeltem Wasser) gelöst, mit 10 µl 3 M Na-Acetat-Lösung pH 5.2 und 250 µl absolutem Ethanol versetzt und bei -20°C über Nacht gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 20 min bei 4°C wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen

und auf Eis getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 300 µl DEPC-Wasser aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

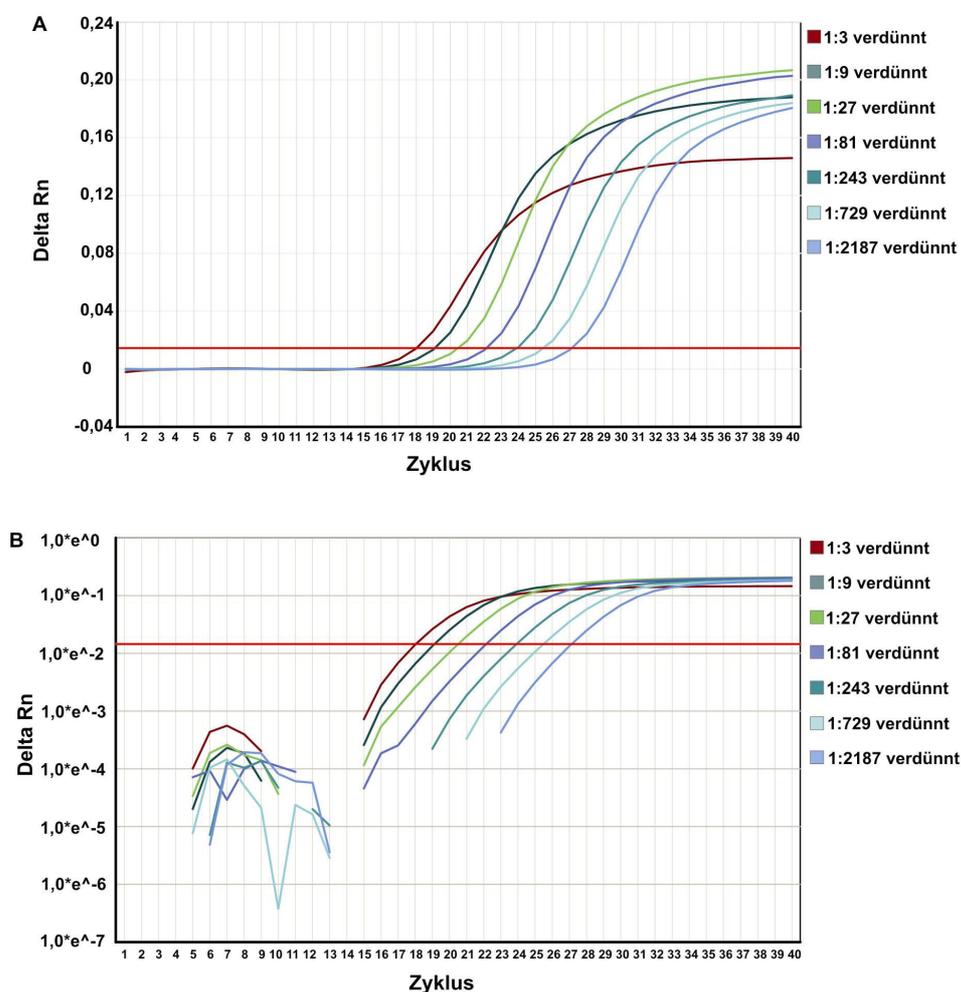
### 3.1.15. cDNA-Synthese

Für die Real-Time-PCR wurden jeweils 1 µg der aus der Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnenen RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Um sicherzustellen, dass im Reaktionsansatz keine Kontamination durch genomische DNA enthalten ist, wurde zunächst ein Verdau mit DNase I durchgeführt. Dazu wurden 1 µg Gesamt-RNA mit Ampuwa-H<sub>2</sub>O auf 7,5 µl aufgefüllt und mit 1 µl 10x DNase-Puffer und 1 µl DNaseI (1 U) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde 1 µl Stopp-Lösung und 1 µl pd(N)<sub>6</sub> Random Hexamer (entspricht 500 ng) zugegeben und der Ansatz zum Denaturieren für 10 min auf 70°C erhitzt. Für einen weiteren Inkubationsschritt für 10 min bei 25°C wurden bereits die Pufferbestandteile der Reversen Transkriptase-Reaktion, 4 µl 5x RT-Puffer, 2 µl DTT, 1 µl 10 mM dNTPs zu dem Reaktionsansatz gegeben und zusätzlich für die Inhibierung eventuell vorhandener RNasen 0,5 µl (20 U) RNAsin zugesetzt. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase (1 µl, 200 U) wurde der Reaktionsansatz 50 min bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 70°C für 15 min. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### 3.1.16. Quantitative Real-Time Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)

Um die Menge der mRNA eines bestimmten Gens zu quantifizieren, wurde in dieser Arbeit die Methode der quantitativen Real-Time Reversen-Transkriptions-PCR (qRT-PCR bzw. Real-Time-PCR) benutzt. Zunächst wird die RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben (s. cDNA-Synthese Abschnitt 3.1.15.), um anschließend die Template-DNA-Menge des zu untersuchenden Gens unter Verwendung der quantitativen Real-Time-PCR zu bestimmen. Diese Methode ermöglicht es, die Anfangsmenge der Template-DNA einer PCR-Reaktion zu messen. Mit dieser Methode werden Fluoreszenzsignale eines Fluoreszenzreporters aufgenommen und quantifiziert, die während der PCR-Reaktion emittiert werden und ein Indikator für die Amplikonproduktion jedes PCR-Zyklus sind. Im Verlauf der PCR-Reaktion steigt dieses Fluoreszenzsignal im gleichen Verhältnis wie die Menge des PCR-Produktes an. Durch die Aufzeichnung der Menge der Fluoreszenzemission während jedes PCR-Zyklus ist es möglich, die PCR-Reaktion während der exponentiellen Phase zu beobachten, in welcher der erste signifikante Anstieg der Menge des PCR-Produktes mit der Anfangsmenge des Ziel-Templates korreliert. Je höher die Start-

Kopienanzahl der Ziel-DNA ist, desto früher wird ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz beobachtet.



**Abbildung 3.1: Das Prinzip der quantitativen Real-Time-PCR.**

(A) Fluoreszenzkurven für sieben Amplifikationen mit unterschiedlichen Template-DNA-Mengen. Es wurde eine Dreifachverdünnungsreihe der Template-DNA-Menge erstellt und in die PCR eingesetzt (s. Legende). (B) Fluoreszenzkurven aus (A) in halblogarithmischer Auftragung. Die Ct-Werte werden in einem Bereich der Kurve ermittelt, in dem die Amplifikation noch exponentiell verläuft. Die rote Linie gibt den Schwellenwert an.

Um die Startkopienzahl der Ziel-DNA zu bestimmen, wird die Zykluszahl gemessen, bei der das Fluoreszenzsignal einer PCR-Reaktion sich zum ersten Mal deutlich vom Hintergrundsignal abhebt, da zu diesem Zeitpunkt die Reaktion noch exponentiell verläuft (Abbildung 3.1). Es wird in diesem exponentiellen Bereich ein Schwellenwert festgelegt, an dem man die Zykluszahl einer PCR-Reaktion ablesen kann (s. Abbildung 3.1). Diese Zykluszahl wird auch als Ct-Wert (*threshold cycle* bzw. Schwellenwert-Zyklus) bezeichnet. Abbildung 3.1B zeigt Fluoreszenzkurven im logarithmischen Maßstab. Der Ct-Wert wird in dem Bereich der Kurve ermittelt, in dem die Amplifikation exponentiell verläuft, dies entspricht dem linearen Bereich in der halblogarithmischen Darstellung (s. Abbildung 3.1B). Er steht in reziproker Beziehung zu der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA. Ist der Ct-

Wert hoch, so ist die Ausgangsmenge an DNA klein, bzw. ist er niedrig, so ist die Menge an eingesetzter DNA groß, da ein Anstieg der Fluoreszenz und somit der Amplifikatmenge zu einem früheren Zyklus zu beobachten ist.

In dieser Arbeit wurde ein unspezifisches Detektionssystem benutzt, das auf der Interkalierung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green I) in doppelsträngige DNA beruht. SYBR-Green I ist ein Farbstoff, der in Lösung stark gequenchet wird, jedoch durch die Bindung an doppelsträngige DNA ein starkes Fluoreszenzsignal emittiert (Morrison *et al.*, 1998). Da die Bindung dieses Farbstoffes unspezifisch an jede doppelsträngige DNA erfolgt, ist die Überprüfung der PCR-Produkte mit Hilfe von Analysegelelen oder Schmelzkurven-Analysen erforderlich.

Zur Normalisierung PCR-unabhängiger Fluoreszenzvariationen wurde dem Reaktionsansatz der Fluoreszenzfarbstoff ROX als passive Referenz zugefügt. Die Messung beider Farbstoffe kann unabhängig voneinander stattfinden, da SYBR-Green bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt wird und bei 520 nm emittiert, wohingegen die Anregung von ROX bei 584 nm und dessen Emission bei 612 nm erfolgt.

Die PCR wurde in einem Endvolumen von 25 µl in 10x *Platinum Taq* Polymerase-Puffer durchgeführt. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

240 nM je Primer

200 µM dNTPs

1 mM MgCl<sub>2</sub>

2 µl SYBR Green I (1:10.000 verdünnt)

0,25 µl ROX

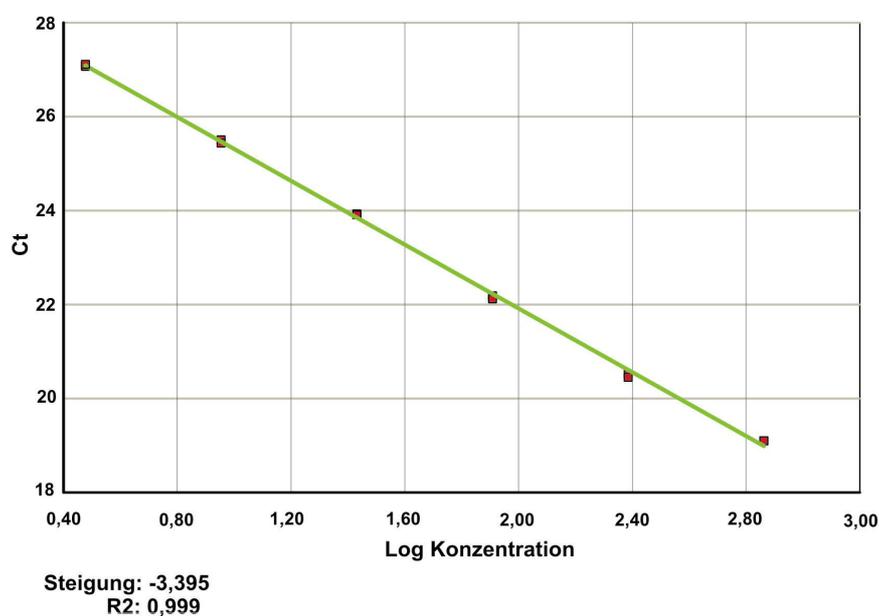
0,625 U *Platinum Taq* DNA Polymerase

5 µl cDNA (1:10 verdünnt)

Das folgende Programm wurde verwendet:

1. 95°C	5 min	
2. 95°C	30 s	} 40 Zyklen
3. 60°C	30 s	
4. 72°C	30 s	

In dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung der Template-DNA mit Hilfe der relativen Quantifizierungsmethode, in der keine Absolutmengen der Template-DNA bestimmt werden, sondern die ermittelten Ct-Werte des zu interessierenden Gens relativ auf die Werte einer endogenen Kontrolle als Referenz bezogen werden. Diese Methode setzt voraus, dass die RNA-Mengen der endogenen Kontrolle innerhalb der Versuchsreihe konstant bleiben. Es wurden in dieser Arbeit in perinatalen Mäusen (P1) das Gen der Hypoxanthine-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und für die Untersuchung von Hirnen von bis zu drei Wochen alten Mäusen das Gen des TATA-Box-bindenden Protein (TBP) jeweils als endogene Kontrollen für die RNA-Quantifizierung benutzt. Eine weitere Voraussetzung für die relative Quantifizierung ist, dass die Primer der endogenen Kontrolle und des Zielgens sehr ähnliche Effizienzen aufweisen.



**Abbildung 3.2:** Standardreihe zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz eines Primerpaares.

Es wurde für ein Primerpaar eine Standardreihe erstellt, indem für dieses Primerpaar mittels Real-Time-PCR sechs Ct-Werte einer Dreifachverdünnungsreihe einer cDNA-Lösung gemessen wurden. Pro Wert wurden Zweifachbestimmungen gemessen. Die ermittelten Ct-Werte wurden gegen den Logarithmus der Konzentration der eingesetzten DNA aufgetragen.

Die Steigung der logarithmisch-linearen Phase einer PCR-Reaktion spiegelt die Amplifikationseffizienz (E) der Primer in der Bildung eines PCR-Produktes wieder. Um diese zu bestimmen, wurde für jedes Primerpaar eine Standardreihe erstellt, indem von einer cDNA-Lösung sechs Ansätze einer Dreifachverdünnungsreihe in eine Real-Time-PCR eingesetzt wurden (s. Abbildung 3.2). Der Ct-Wert wurde in Zweifachbestimmungen ermittelt. Die Standardreihe erhält man, indem man den gemessenen Ct-Wert gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Konzentration aufträgt.

---

Die Effizienz (E) der Primer wurde anhand der Steigung der Standardkurve bestimmt.

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Eine Steigung der Standardkurve von -3,32 ist gleichbedeutend mit einer PCR-Effizienz von 2, das bedeutet, dass pro Zyklus eine Verdoppelung des PCR-Produktes stattfindet. Steiler verlaufende Kurven bedeuten eine weniger effiziente PCR, flacher verlaufende deuten auf Pipettierfehler hin.

Die Auswertung der relativen Quantifizierung erfolgte mit der vergleichenden Ct-Methode ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ). Zunächst werden die Ct-Werte auf die endogene Kontrolle normalisiert, um  $\Delta\text{Ct}$  zu erhalten:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)}$$

Dieser Wert wird für alle zu quantifizierenden Proben ausgerechnet. Eine Probe einer Messreihe wird als Referenzprobe ausgewählt. In den meisten Studien dieser Arbeit wurde als Bezugsgröße die Probe aus der Wildtyp-Maus verwendet. Es werden die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte einer Messreihe auf den  $\Delta\text{Ct}$ -Wert einer Referenzprobe normalisiert:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Probe)} - \Delta\text{Ct (Referenzprobe)}$$

In der komparativen  $\Delta\text{Ct}$ -Methode werden die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte in absolute Werte mit Hilfe der Effizienz umgerechnet (Livak and Schmittgen, 2001). In dieser Arbeit wurden für alle Berechnungen des Absolutwertes als Effizienz 1,98 angenommen. Die Formel für die Berechnung des absoluten Expressionsspiegels lautet:

$$\text{Expressionsspiegel} = E^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

### 3.1.17. Analytisches Acrylamidgel

Um zu kontrollieren, ob die erwarteten PCR-Produkte in einer Real-Time-PCR mit SYBR-Green als Fluoreszenzreporter hergestellt worden sind, wurden nach jedem PCR-Lauf die PCR-Produkte mit Hilfe einer Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert. Es wurden je 10  $\mu\text{l}$  der PCR-Proben auf ein 6% iges Acrylamidgel aufgetragen. Als Marker wurde *pBR322/BsuRI-Marker* eingesetzt. Nach der Durchführung der PAGE wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt.

Zusammensetzung des 6% Acrylamidgels:

20 ml 6% Acrylamid-Stocklösung

200 µl 10%APS

20 µl TEMED

Zusammensetzung der 6%-Acrylamid-Stocklösung:

78 ml 38% Acrylamid

50 ml 10x TBE

371 ml H<sub>2</sub>O

### **3.1.18. Schmelzkurvenanalyse**

Die Verwendung des „*SDS7500 FastSystems*“ ermöglichte die Analyse der PCR-Produkte mit Hilfe von Schmelzkurvenanalysen. Die Analyse der PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgte direkt im Anschluss jedes PCR-Laufes mit folgendem PCR-Programm:

- |         |      |
|---------|------|
| 1. 95°C | 15 s |
| 2. 60°C | 60 s |
| 3. 95°C | 15 s |

Weicht der Schmelzpunkt eines PCR-Produktes von dem erwarteten Wert ab, so handelt es sich auch nicht um das spezifische PCR-Produkt. Ein Grund für das Auftreten unspezifischer PCR-Produkten könnten unspezifische Primer, ein verunreinigter PCR-Ansatz oder die Bildung von Primerdimeren oder Hairpinstrukturen sein.

## **3.2. Zellbiologische Methoden**

### **3.2.1. Kultivierung von *Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Insektenzellen**

Sf9-Insektenzellen wurden bei 27°C in Suspensionskultur bei 75 – 100 rpm in dem Insektenzelledium *Insect-Xpress* kultiviert. Dabei wurde die Zelldichte zwischen  $0,5 \times 10^6$  und  $5,0 \times 10^6$  Zellen/ml gehalten. In gesunden Kulturen erfolgt die Verdoppelung der Zelldichte innerhalb von 20 bis 24 h. Die Insektenkulturen wurde in 250 ml-, 500 ml-,

---

1000 ml-Kulturkolben mit einer Mindestbefüllung von 30 ml, 80 ml bzw. 300 ml durchgeführt.

### 3.2.2. Auftauen von *Sf9*-Insektenzellen

Insektenzellen wurden im Cryoröhrchen in einem 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in einen 250 ml-Kulturkolben mit 30 ml Insektenzellmedium gegeben. Sie wurden bei 27°C unter Schütteln kultiviert. Insektenzellen konnten auf diese Weise ca. zwei bis drei Monate in Kultur gehalten werden.

### 3.2.3. Einfrieren von *Sf9*-Insektenzellen

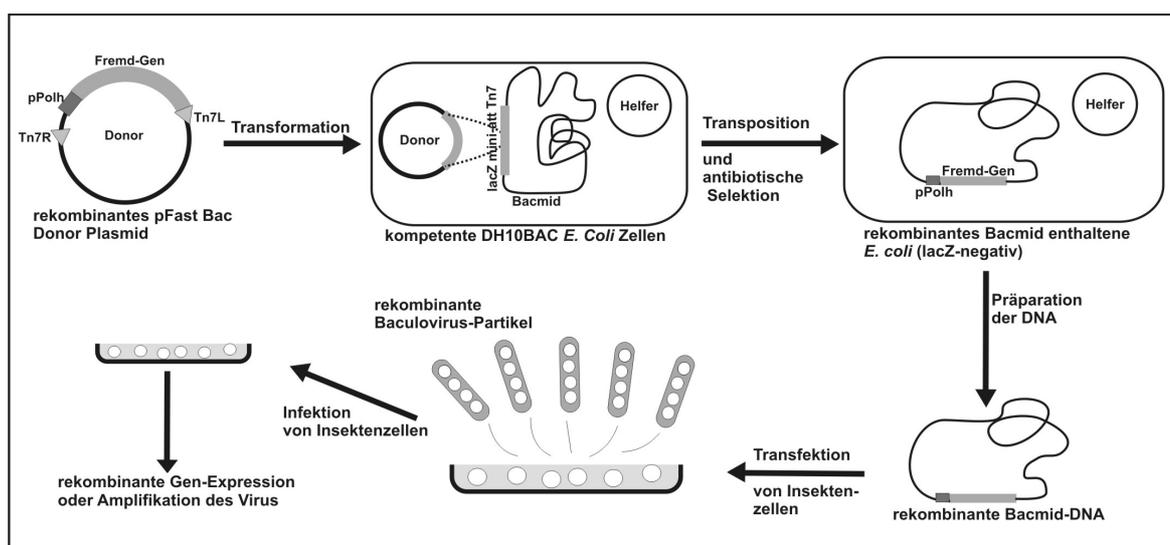
Das Einfrieren von *Sf9*-Insektenzellen wurde durchgeführt, wenn sich die Insektenzellen in der Log-Phase befinden, und die Zahl der lebendigen Insektenzellen bei mindestens 90% lag. Die Zellen wurden bei 500 x g für 3 min abzentrifugiert und in Einfriermedium, das aus 50% konditioniertem Medium, 50% frischem Medium und 7,5% DMSO besteht, aufgenommen. Die Zelldichte im Einfriermedium betrug  $1,5 \times 10^7$  Zellen/ml. Es wurde 1 ml dieser Zellsuspensionen je Cryoröhrchen eingefroren. Der Einfriervorgang erfolgte schrittweise, indem die Zellen zunächst 30 min bei 4°C, 1 h bei -20°C und über Nacht bei -70°C gelagert wurden, um sie dann im flüssigen Stickstoff zu lagern. Um zu kontrollieren, ob die Zellen den Einfriervorgang unbeschadet überstanden haben, wurde eine Auftaukontrolle durchgeführt.

### 3.2.4. *BAC-TO-BAC*-Baculovirussystem von Gibco

Mit diesem System werden rekombinante Baculoviren erzeugt, mit denen Insektenzellen infiziert werden, um rekombinante Viruspartikel zu vermehren, bzw. um das rekombinante Gen in Insektenzellen zu exprimieren.

Abbildung 3.3 gibt einen Überblick über das Baculovirussystem. Es werden durch Transposition mit dem Transpositionsprotein Tn7 fremde Gene in die Bacmid-DNA eingeschleust, die dann in *E. coli*-Bakterien vermehrt werden. Zunächst wird das zu exprimierende Gen in das pFastBac-Donor-Plasmid kloniert und das rekombinante Plasmid in DH<sub>10</sub>Bac-kompetente Zellen transformiert, die die Bacmid-DNA mit der *attTn7*-Zielsequenz und einem Helfer-Plasmid enthalten. Das Tn7-Element auf dem pFastBac-Plasmid kann auf die *attTn7*-Sequenz mit Hilfe von Transpositions-Proteinen, die von dem Helfer-Plasmid zur Verfügung gestellt werden, übertragen werden. Kolonien, die die rekombinante Bacmid-DNA enthalten, können durch „Blue-White-Screening“ identifiziert werden, da durch den Einbau

der Fremd-DNA die *LacZ-alpha*-Sequenz zerstört wird. Mit den selektierten *E. coli*-Klonen, die das rekombinante Bacmid enthalten, wird eine DNA-Präparation durchgeführt, und die rekombinante Bacmid-DNA wird in Insektenzellen transfiziert. Nach 1 - 3 Tagen können rekombinante Baculo-Viruspartikel geerntet werden, mit denen weitere Insektenzellen infiziert werden können, um rekombinantes Virus zu amplifizieren oder um das rekombinante Protein herstellen zu lassen.



**Abbildung 3.3: Generierung von rekombinanten Baculoviren und Genexpression mit dem BAC-TO-BAC-Expressionssystem.**

pPolh = Polyhedrin-Promotor, Tn7 = Tn7-Element, *mini-att Tn7* = Tn7-Zielsequenz

### DH<sub>10</sub>Bac Transposition

Um das pFastBac-Donor-Plasmid in Bacmid-DNA enthaltene DH<sub>10</sub>Bac-Zellen zu transformieren, wurden 100 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetente DH<sub>10</sub>Bac-Zellen für 5 min auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA (100 – 500 ng) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 45 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und wieder für 2 min auf Eis gestellt. Danach wurde zu den Bakterien 900 µl SOC-Medium gegeben und diese bei 37°C und 300 rpm für 4 h inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten (50µg/µl Kanamycin, 10 µg/µl Tetracyclin, 7 µg/µl Gentamycin und 40 µg/ml IPTG), auf denen zuvor 40 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF) verteilt worden ist, ausgestrichen und bei 37°C 24 bis 48°C inkubiert.

Weißer Kolonien wurden auf LB-Agarplatten neu ausgestrichen, damit neue Einzelkolonien entstehen, und um zu überprüfen, ob es sich um Kolonien handelt, die das Fremdgen aufgenommen haben. Blaue Kolonien dagegen enthalten ein intaktes *LacZ*-Gen. Es wurde je

eine 5 ml LB-Kultur (50 µg/µl Kanamycin, 10 µg/µl Tetracyclin, 7 µg/µl Gentamycin) mit je einer weißen Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C und 225 rpm über Nacht inkubiert.

### Mini-Präparation der Bacmid-DNA

Die Bacmid-DNA wurde aus LB-Kulturen mit Hilfe des DNA-Präparationskits „*Concert High Plasmid Purification System*“ von GibcoBRL präpariert und anschließend in 40 µl NE-Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 8.0) aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Um zu überprüfen, ob das Fremd-Gen, sich in der Bacmid-DNA befindet, wurde eine Kontroll-PCR durchgeführt.

PCR-Ansatz:

15,2 µl H<sub>2</sub>O

2,5 µl Thermo-Pol-Puffer

2,5 µl 2 mM dNTPs

2,5 µl Bacmid-DNA

je 1 µl Primer

0,3 µl *Taq*-DNA-Polymerase

PCR-Lauf:

1. 94°C	2 min	
2. 94°C	20 s	} 30 Zyklen
3. 51-56°C	30 s	
4. 72°C	45 s	
5. 72°C	10 min	

Das PCR-Produkt wurde auf einem 1% Agarosegel analysiert.

### 3.2.5. Transfektion von *Sf9*-Insektenzellen

Es wurden in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte  $1 \times 10^6$  *Sf9*-Insektenzellen ausgesät und für 30 min bei 27°C inkubiert, damit die Zellen an der Platte adhären. Das Transfektionsreagenz wurde aus 5 µl Cellfectin in 100 µl *InsectXPress*-Medium (BioWhittaker) und 5 µl Bacmid-DNA (1 µg – 2,5 µg) in 100 µl Medium gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen des Mediums, wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen. Daraufhin wurde in jede Vertiefung 200 µl Transfektionsgemisch und 800 µl Medium gegeben. Nach mindestens 5 h bei 27°C wurde das Transfektionsgemisch abgenommen, und es wurde frisches Medium, dem Antibiotika zugesetzt worden ist (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin), auf die Zellen gegeben. Die Insektenzellen wurden in diesem Medium so lange bei 27°C inkubiert bis eine Virusinfektion sichtbar war.

### 3.2.6. Virusamplifikation

Der Zellüberstand von Insektenzellen, die mit rekombinanter Bacmid-DNA transfiziert worden waren, wurde, sobald sich deutlich eine Virusinfektion abzeichnete, von den Zellen abpipettiert und als P1-Virusstock bei 4°C gelagert.

Um eine Amplifikation der Baculoviruskonzentration zu erzeugen, wurden 4 ml  $2 \times 10^6$  *Sf9*-Zellen in einer 25 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche ausgesät und mit 40 µl eines P1-Virusstocks versetzt. Nach einer Inkubation von 72 h bei 27°C konnte der P2-Virusstock geerntet werden. Der P2-Virusstock wurde bei -80°C gelagert.

Ein P3-Virusstock wurde erzeugt, indem in einem 300 ml Kolben eine 40 ml-Zellkultur mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit 40 µl eines P2-Virusstocks infiziert wurde. Nach 72 h bei 27°C wurde der P3-Virusstock geerntet, indem die infizierte Zellkultur für 7 min bei 750 x g abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm Filter filtriert und in einem lichtgeschützten Falcon-Röhrchen bei 4°C gelagert.

### 3.2.7. Test der Proteinexpressionsbedingungen

Um die Expressionsbedingungen des in Insektenzellen rekombinant hergestellten Proteins zu testen, wurden jeweils 30 ml einer Insektenzellkultur mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit unterschiedlichen Konzentrationen des rekombinanten Baculovirus infiziert. Es wurden je 1 ml Proben des Zellkulturüberstandes nach einer Inkubation für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h bei 27°C und 75 – 100 rpm abgenommen und bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert, um den Zellkulturüberstand von der Zellfraktion zu trennen. Mit einem Teil

des Zellüberstandes wurde eine TCA-Fällung durchgeführt (s. Abschnitt 3.4.2.). Das Zellpellet wurde in 80 µl 2x Laemmli-Puffer, und der Zellüberstand 1:2 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt. Diese Proben wurden in eine SDS-PAGE eingesetzt, um die Qualität und Quantität des rekombinant hergestellten Proteins zu überprüfen.

### 3.3. Präparation von Mausgehirnen

Es wurde das gesamte Gehirn aus Mäusen unterschiedlichen Alters (P1 bis P21 und adulte Mäuse) isoliert. Direkt nach Entnahme des Organs wurde dieses in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.4. Proteinanalytische Methoden

#### 3.4.1. Aufarbeitung von Gehirngewebe für die Western-Blot-Analyse

Puffer:

Lysepuffer I	20 mM Tris-HCl pH 8.0
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA
	1 mM PMSF
	70 µg/ml Aprotinin
	10 µg/ml Leupeptin
	2% Triton X-100
Lysepuffer II	20 mM Tris-HCl pH 8.0
	150 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,2 mM PMSF
	1 µg/ml Aprotinin
	1 µg/ml Leupeptin
	1 µg/ml Pepstatin A
	0,1 mg/ml Benzamidin
	8 µg/ml Calpain I
	8 µg/ml Calpain II
	2% Triton X-100

Gehirne, die aus Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters (P1 bis P21 und adulte Mäuse), isoliert worden waren, wurden je nach Größe in 500 µl bis 3 ml Lysepuffer 1 mit einem Ultraturax homogenisiert. Um das Detergenzienextrakt von unlöslichen Zell- und Gewebekomponenten zu trennen, wurden die Gewebekomponenten 30 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Ein Aliquot jedes Lysates wurde mit 25 ng/µl Endosialidase für 45 min auf Eis inkubiert. Aliquots aller Lysate, einschließlich mit Endosialidase behandelten Lysate, wurden 1:2 mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und bei -20°C eingefroren. Ein weiteres Aliquot jedes Lysates wurde für die Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz eingesetzt.

In Abschnitt 4.3.5. wurden Gehirne aus NCAM-defizienten Mäusen auf PolySia untersucht. Die Aufarbeitung dieser aus NCAM-defizienten Mäusen präparierten Gehirne erfolgte mit Hilfe des Lysepuffers II, dem weitere Proteaseinhibitoren zugesetzt worden sind.

#### **3.4.2. Proteinfällung mit Hilfe von 50% Trichloressigsäure**

Insektenzellüberstände wurden mit Hilfe von 50% Trichloressigsäure (TCA) gefällt, um eine 10-fache Ankonzentrierung der Proteine zu erreichen.

Zu 800 µl Zellüberstand wurden 200 µl 50% TCA gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 16.000 x g und 4°C wurde das Protein-Pellet mit 500 µl Aceton gewaschen und erneut für 10 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 5 min bei 37°C getrocknet und in 80 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen.

#### **3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Puffer:

SDS-PAGE-	50 mM Tris
Elektrophoresepuffer	380 mM Glycin
	0,1% SDS

Unter reduzierenden Bedingungen wurden über die SDS-PAGE Proteine nach der Größe der enthaltenen Proteine aufgetrennt (Laemmli, 1970). In diesem Verfahren ist die Gelmatrix Polyacrylamid, das man durch chemische Copolymerisation von Acrylamidmonomeren erhält. SDS (Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecyl sulphate*) überdeckt die Eigenladungen von Proteinen, so dass Partikel mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Es wurden aus Sammel- und Trenngel bestehende Acrylamidgele gegossen, deren Polyacrylamidanteil im Sammelgel 3% und im Trenngel 7%-10% betrug.

Es wurde das Trenngel (7-10% Acrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS) aus 40% Acrylamidlösung (40% Acrylamid 4K-Lösung), 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 10% SDS-Lösung und bidest. H<sub>2</sub>O frisch angesetzt und nach Zugabe von 1/100 Volumen 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung und 1/1000 Volumen TEMED sofort gegossen und mit bidest. H<sub>2</sub>O überschichtet. Die Überschichtung wurde nach Polymerisation des Trenngels entfernt und das Sammelgel (3% Acrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS) nach Zugabe von 1/100 Volumen 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung und 1/1000 Volumen TEMED gegossen. Zum Schluss wurde der Probenkamm eingesetzt.

Die zu analysierenden Proben wurden 1:2 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Proben von Gehirnllysaten, die auf den Polysialylierungsgrad von NCAM untersucht werden sollten, wurden vor dem Auftragen auf das auspolymerisierte Gel 10 min bei 60°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Alle übrigen Proben wurden vor dem Auftragen 5 min auf 95°C erhitzt und danach zentrifugiert (20 s, 16000 x g, RT). Als Größenstandards wurden *High Range*-Marker (Bio-Rad, 1:20 verdünnt), *Precision Plus* (BioRad) oder *Prestained Precision Plus* (BioRad) aufgetragen.

#### 3.4.4. Coomassie-Färbung

Lösungen:

Roti® Blue Färbelösung	20% Methanol
	20% Roti® Blue Färbelösung (5x- Konz.) (Roth)
Trocknerlösung	10% Glycerin
	20 % Ethanol
Waschlösung	25% Methanol

Die Färbung von SDS-Gelen erfolgte über Nacht oder übers Wochenende unter leichtem Schwenken in 20-30 ml Roti® Blue (Roth) Färbelösung. Nach der Färbung wurde das Gel zweimal für 20 min in einer Waschlösung gespült und mind. für 30 min in eine Trocknerlösung gelegt. Das Gel konnte nach diesem Schritt zwischen Cellophan getrocknet werden.

### 3.4.5. Silberfärbung

Lösungen:

Entwickler (100 ml)	6 g NaCO <sub>3</sub>
	50 µl 37% Formaldehyd
	2 ml Natriumthiosulfatlösung
	10% Essigsäure
Fixierer	100 ml Stopplösung
	50 µl 37% Formaldehyd
Natriumthiosulfatlösung	0,2 mg/ml NaS <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silbernitratlösung (100 ml)	2 ml 10% Silbernitrat
	75µl 37% Formaldehyd
Stopplösung	30% Ethanol

SDS-Gele wurden nach beendeter Elektrophorese für 1 h in Fixierlösung, anschließend dreimal 20 min in 50% Ethanol und 1 min in Natriumthiosulfatlösung geschwenkt. Nach Waschen (je 20 s) mit Wasser wurde das Gel 20 min in Silbernitratlösung inkubiert und erneut mit Wasser gewaschen (zweimal 20 s). Anschließend wurde das Gel so lange in Entwicklerlösung inkubiert, bis Banden sichtbar wurden. Die Reaktion wurde abgestoppt, indem das Gel zweimal mit Wasser gespült wurde und anschließend für 10 min in Stopplösung inkubiert wurde. Danach wurde das Gel für 30 min in 3% igem Ethanol und für weitere 30 min in Trocknerlösung inkubiert. Das Gel konnte nach diesem Schritt zwischen Zellophan getrocknet werden.

### 3.4.6. Western-Blot

Blotpuffer	48 mM Tris
	39 mM Glycin

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus Acrylamidgelen auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran erfolgte im SemiDry-Verfahren. Vor Verwendung der PVDF-Membran wurde diese für 3 s in 100% Methanol geschwenkt und anschließend mit Wasser und Blotpuffer gespült. Im SemiDry-Verfahren werden zwischen zwei parallelen, horizontal liegenden Platinelektroden von Anode zu Kathode folgende Bestandteile gestapelt: *Whatman*-Filterpapier, Nitrozellulose-Membran, SDS-Gel, *Whatman*-Filterpapier. Die einzelnen Lagen wurden auf die gleiche Größe geschnitten, in Blotpuffer getränkt und luftblasenfrei übereinandergeschichtet. Geblottet wurde für 1 h bei 2 mA/cm<sup>2</sup>.

### 3.4.7. Immunfärbung von Western Blots,

#### Entwicklung über BCIP/NBT-Farbreaktion

Puffer und Lösungen:

AP-(Alkalische- Phosphatase-) Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
BCIP	25 mg/ml BCIP in 100% DMF
BCIP-NBT-Lösung	66 µl BCIP 66 µl NBT 10 ml AP-Puffer
Blocklösung I	2% Magermilch in PBS 0,02% NaN <sub>3</sub>
NBT	50 mg/ml NBT in 70% (v/v) DMF
Ponceau S-Lösung	0,2% Ponceau S in 3% TCA

Zur Überprüfung des Proteintransfers von dem Gel auf die Membran, und zur Darstellung der Markerbanden wurden die Nitrozellulosemembranen reversibel angefärbt. Die Membran wurde 2 min in Ponceau S-Lösung gefärbt und nach Markieren der Markerbanden in Wasser entfärbt.

Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter Schütteln. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Membranen 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blocklösung I inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Membranen dreimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation der Membranen mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in Blocklösung I bei RT für 1 h. Nach dreimaligem Waschen der Membranen mit PBS wurden diese für ½ - 1 h bei RT mit einer 1:4000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (anti-Maus-Ig-AP-Konjugat (Dianova)) in Blocklösung I inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal in PBS und einmal in AP-Puffer gewaschen und in BCIP-NBT-Lösung inkubiert. Die Farbreaktionen wurden nach ca. 10 - 15 min durch Spülen mit Wasser gestoppt. Die Nitrozellulosemembranen wurden zwischen Filterpapieren getrocknet.

### Entwicklung mit dem Chemilumineszenzverfahren

#### Puffer und Lösungen:

Blocklösung II	5% Magermilch in PBS
	0,2% Tween-20

#### Chemilumineszenzlösungen:

Lösung 1	2,5 mM Luminol
	0,4 mM Cumarsäure
	0,1 M Tris-HCl pH 8,5
Lösung 2	0,1 M Tris-HCl pH 8,5
	0,05% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Ponceau S-Lösung	0,2% Ponceau S in 3% TCA
Waschpuffer II	PBS 0,1% Tween-20

Zur Überprüfung des Proteintransfers von dem Gel auf die Membran, und zur Darstellung der Markerbanden wurden die Nitrozellulosemembranen auch in diesem Verfahren zuvor mit Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt. Es erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit Blocklösung II. Es folgte eine Inkubation mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in Blocklösung II für 1 h bei RT. Nach dreimaligen Waschen der Membran mit Waschpuffer II wurde der Blot bei RT 1 h mit einer 1:20000 Verdünnung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Ratte IgG bzw. mit einer 1:8000 Verdünnung eines Peroxidase-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde die Membran sechsmal mit Waschpuffer II gewaschen. Die Chemilumineszenz-Lösung wurde frisch aus den Chemilumineszenz-Teillösungen 1 und 2 hergestellt, und die Membran für 5 min in dieser Lösung inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Membran sofort auf einen Chemilumineszenz-Detektions-Film (Roche Applied Science) gelegt und dieser mit dem Blot für 30 s, 1 min, 2 min, 5 min oder 15 min belichtet und anschließend entwickelt.

### Entwicklung mit dem *Odyssey*-System von Licor

Nach dem Blotten auf PVDF-Membran erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit der *Odyssey*-Blocklösung, die zuvor 1:2 mit PBS verdünnt worden ist, über Nacht bei 4°C oder für 1 h bei RT. Die Inkubation des primären Antikörpers wurde in *Odyssey*-Blocklösung/0,1%Tween-20 für 1,5 h bei RT durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in Waschpuffer II wurde der Blot mit einem speziellen Sekundärantikörper inkubiert, der mit einem Infrarotfarbstoff gekoppelt ist, dessen Anregungsbereich bei 680 oder 800 nm liegt, IRDye680 und IRDye800. Die Inkubation erfolgte in einer 1:20.000-Verdünnung des Antikörpers in *Odyssey*-Blocklösung/0,1% Tween-20 für 1 h bei RT im

Dunkeln. Anschließend wurde der Blot viermal mit Waschpuffer II und einmal in PBS gewaschen. Die Fluoreszenzsignale des Sekundärantikörpers wurden im 680 oder 800 nm-Kanal des *Odyssey-Infrared-Imaging Systems* detektiert.

#### 3.4.8. Quantifizierung von Proteinsignalen auf Western-Blots

Um Proteinsignale zu quantifizieren, wurden die mit Chemilumineszenz-entwickelten Western Blots belichteten Filme aus Abschnitt 3.4.7. mittels densitometrischen Scannens unter Benutzung von Kodak 1D Network Software ausgemessen.

Proteinsignale von Western-Blots, die mit Hilfe des *Odyssey-Systems* entwickelt worden sind, wurden mit Hilfe der *Odyssey 2.1-Software* gemessen und ausgewertet.

#### 3.4.9. Ermittlung der Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem BCA-Assay (Pierce). Die Gebrauchslösung wurde aus 50 Teilen Reagenz A und einem Teil Reagenz B gemischt. Für die Standardreihe wurde BSA in den Konzentrationen 200, 150, 100, 50 und 25 µg/ml in 0,9% NaCl eingesetzt. Von der Standardreihe wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Von der zu messenden Probe wurden vier unterschiedliche Verdünnungen angesetzt, deren Konzentration jeweils in Doppelwerten bestimmt wurde. Je 10 µl der Standards bzw. der Proben wurden in ELISA-Platten mit 200 µl Gebrauchslösung versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Die Messung erfolgte in dem ELISA-Reader *Digi Scan* (Asys Hitech).

#### 3.4.10. Aufreinigung rekombinanter Polysialyltransferasen aus Insektenzellkulturüberständen

Puffer und Lösungen:

Waschpuffer 1	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 0,5 M NaCl
Waschpuffer 2	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0
Waschpuffer 3	20 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,3
Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH 2,7

Voll- und minimalglykosylierte Formen von ST8SiaII und ST8SiaIV wurden als lösliche Varianten mit C-terminalem Myc- und Hexahistidin-Epitop in *Sf9*-Zellen sekretorisch exprimiert und affinitätschromatographisch unter Verwendung des mAk 9E10, der das Myc-Epitop (EQKLISEEDL) erkennt, isoliert. Je Variante wurde eine 1-Liter-Kultur mit einer

Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit rekombinanten Baculovirus infiziert und der Zellkulturüberstand 72 h nach Infektion durch Zentrifugation bei  $300 \times g$  für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  geerntet. Nachdem der pH-Wert des Überstandes mit 5 M NaOH-Lösung auf pH 7,5 eingestellt wurde, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 25 min bei  $700 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$ . Anschließend wurde der Überstand durch einen  $0,22 \mu\text{m}$  Filter filtriert. Dieser so vorbereitete Überstand wurde über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit einer Durchflussrate von 1 ml/min auf eine mAk 9E10-Sepharose-Säule (2 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule bei  $4^\circ\text{C}$  mit 50 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5/0,5M NaCl und 30 ml 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und an ein FPLC-Gerät angeschlossen. Hier erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,3 und die Elution mit 0,1 M Glycinpuffer pH 2,7. Das Eluat wurde in Fraktionen à 1 ml gesammelt, die sofort mit 1 M Tris-Puffer pH 8,0 auf pH 6,0 eingestellt wurden. Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (*Vivaspin 6 10.000*, *Vivascience*, Sartorius) ankonzentriert. Die ankonzentrierte Proteinprobe wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.4.11. Nachweis von Polysialyltransferase-Aktivität

MES-Puffer	10 mM MES (Morpholino Ethan Sulfonsäure) pH 6,5 10 mM $\text{MnCl}_2$
TMB-Substratlösung	0,1 mg/ml TMB (3,3',5,5', Tetramethylbenzidin) 90 mM Na-Acetat 90 mM Citronensäure pH 4,9 0,003% $\text{H}_2\text{O}_2$

Die enzymatische Aktivität gereinigter Polysialyltransferasen wurde mit Hilfe eines ELISA-basierten Aktivitätstests bestimmt. Für die Bestimmung der Autopolysialylierung wurden lösliche Varianten der Polysialyltransferasen mit C-terminalem Myc- und Hexa-Histidin-Epitop über einen anti-PentaHis-Antikörper an Mikrotiterplatten angelagert, mit CMP-Neu5Ac inkubiert und die an den Enzymen entstandene PolySia unter Verwendung des PolySia-spezifischen mAk 735 detektiert. Zum Nachweis von NCAM-Polysialylierungsaktivität wurde zusätzlich über den Fc-Teil des anti-PentaHis-Antikörpers ein Protein-A-NCAM-Fusionsprotein angelagert, dass durch rekombinante Expression in

CHO-2A10-Zellen gewonnen wurde und daher nicht-polysialyliert vorliegt (Mühlenhoff *et al.*, 1996a)

Zur Beschichtung der 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden je Vertiefung 30  $\mu$ l anti-PentaHis-Antikörperlösung (5  $\mu$ g/ml in PBS) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C angelagert und die Platten anschließend zweimal mit je 200  $\mu$ l PBS pro Vertiefung gewaschen. Für die Messung von NCAM-Polysialylierung wurde zunächst pro Vertiefung 25  $\mu$ l Protein-A-NCAM-Fusionsprotein (30  $\mu$ g/ $\mu$ l) für 1 h bei RT angelagert. Bei Messung von Autopolysialylierung wurde anstelle des Protein-A-NCAM-Fusionsproteins 10% BSA in PBS verwendet (25  $\mu$ l pro Vertiefung). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde je Vertiefung 1  $\mu$ g gereinigte ST8SiaII oder ST8SiaIV in insgesamt 25  $\mu$ l für 1 h bei RT angelagert. Nach zweimaligem Waschen mit je 200  $\mu$ l PBS wurde einmal mit 200  $\mu$ l MES-Puffer pro Vertiefung gewaschen. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l Substratlösung (0,5 mM CMP-Neu5Ac in 10 mM MES pH 6,7, 10 mM MnCl<sub>2</sub>) pro Vertiefung wurden die Platten über Nacht bei RT oder für 4 h bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS gestoppt. In einem nächsten Schritt folgte die Anlagerung von je 25  $\mu$ l biotinylierter Fab-Fragmente des mAk 735 (2  $\mu$ g/ml in 1% BSA/3,3% humanes Serum in PBS) für 1 h bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden je Vertiefung 25  $\mu$ l 100 mU/ml Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (in 1% BSA/PBS-Lösung) zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Detektion mittels 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Färbung. Je Vertiefung wurden 50  $\mu$ l TMB-Substratlösung zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde die Farbreaktion abgestoppt und die Absorption bei 450nm im ELISA-Reader gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *DigiWin*.

### **Modifikation des Aktivitätstests**

Da beobachtet wurde, dass die enzymatische Aktivität von ST8SiaII durch die Fixierung des Enzyms über ein C-terminales Hexa-Histidin-Epitop beeinträchtigt wird, wurde hier eine Modifikation des oben beschriebenen Aktivitätstests durchgeführt, bei der nur der Akzeptor NCAM an die Mikrotiterplatte angelagert wurde und das Enzym löslich zusammen mit dem Donor-Substrat CMP-Neu5Ac zugegeben wurde. Da so in den folgenden Waschsritten das Enzym entfernt wird, konnte mit dieser modifizierten Form des Tests nur die NCAM-Polysialylierung verfolgt werden.

Für den Test wurden je Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte 30  $\mu$ l Maus-IgG-Antikörperlösung (10  $\mu$ g/ml in PBS) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C angelagert. Nach

zweimaligem Waschen mit je 200  $\mu$ l PBS und anschließend je 200  $\mu$ l MES-Puffer wurde je Vertiefung 1  $\mu$ g gereinigte Polysialyltransferase in 25  $\mu$ l Substratpuffer (0,5 mM CMP-Neu5Ac in 10 mM MES pH 6,7, 10 mM MnCl<sub>2</sub>) zugegeben und für 4 h bei 37°C bzw. bei RT über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der ELISA wie oben beschrieben durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bedeutung der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV für die NCAM-Polysialylierung im perinatalen Maushirn

Um die Rolle der beiden Polysialyltransferasen ST8SiaII and ST8SiaIV *in vivo* zu untersuchen, wurde die NCAM-Polysialylierung in Gesamthirn-Homogenaten genetisch veränderter Mauslinien analysiert, die sich nur in der Zahl der funktionellen Polysialyltransferase-Allele unterscheiden. Durch geeignete Verpaarungen von homo- und heterozygoten ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Tieren ergeben sich insgesamt neun Genotypen, die zur Übersicht in Abbildung 4.1 dargestellt sind. Da bekannt war, dass während der Mausentwicklung die PolySia Expression um den Tag der Geburt am höchsten ist (Ong *et al.*, 1998), wurden im ersten Teil dieser Arbeit alle Untersuchungen an Hirnmaterial durchgeführt, das am ersten postnatalen Tag (P1) entnommen wurde.

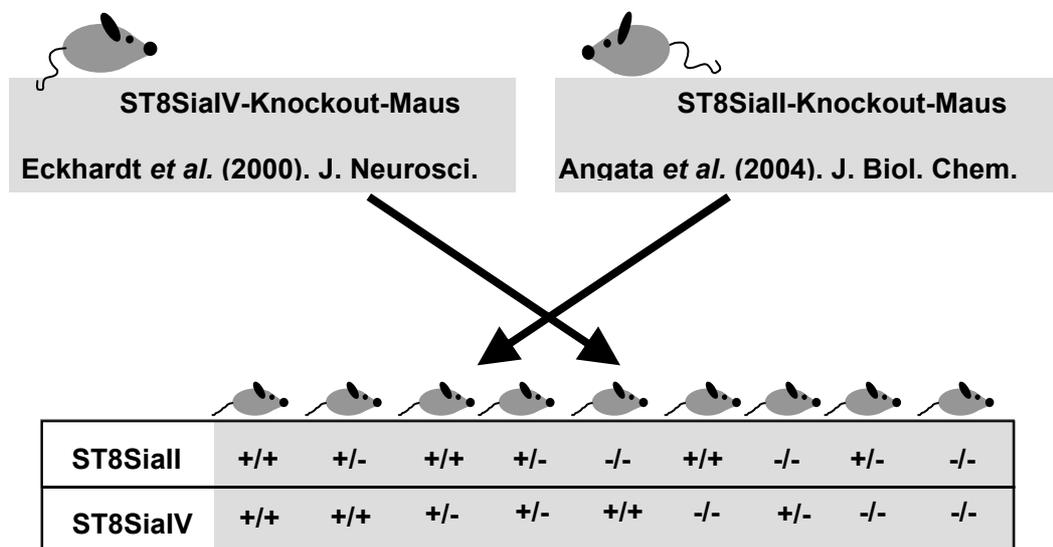


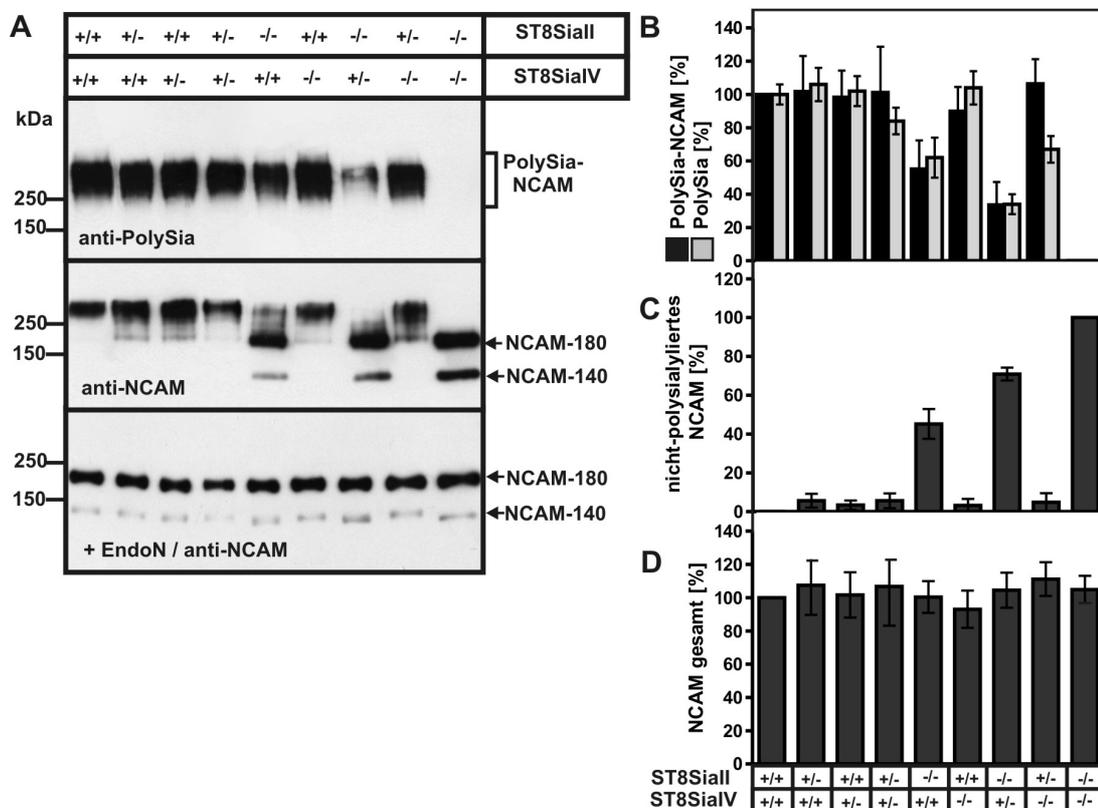
Abbildung 4.1: Überblick über die neun Genotypen, die sich in der Kombination der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Allele unterscheiden.

#### 4.1.1. NCAM-Polysialylierung in P1-Hirnen Polysialyltransferase-defizienter Mäuse

Zunächst wurde in Hirnhomogenaten aller neun Genotypen der NCAM-Polysialylierungsstatus untersucht. Je Genotyp wurden identische Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot vergleichend analysiert. Für den Nachweis

von PolySia wurde der monoklonale Antikörper (mAk) 735 verwendet, der  $\alpha$ 2,8-verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von acht Sialinsäureresten erkennt (Frosch *et al.*, 1985; Hayrinen *et al.*, 1989). Wie im oberen Abschnitt von Abbildung 4.2A dargestellt, konnte mit Ausnahme der Doppel-Knockout-Tiere für alle Genotypen ein breites Signal über 250 kDa beobachtet werden, das charakteristisch für polysialyliertes NCAM ist. Einen deutlichen Abfall der Signalintensität konnte nur für den Genotyp mit nur einem funktionellen ST8SiaIV Allel (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>) beobachtet werden. Ein genaueres Bild über den NCAM-Polysialierungsstatus der einzelnen Genotypen lieferte die Färbung des Western-Blots mit einem anti-NCAM Antikörper, welcher die gleichzeitige Darstellung von polysialyliertem und nicht-polysialyliertem NCAM erlaubt (Abbildung 4.2A, mittlerer Western-Blot). Verwendet wurde hier mAk KD11, der eine Peptidsequenz am C-terminalen Ende der Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 erkennt (Gerardy-Schahn und Eckhardt, 1994). Entsprechend kann mit diesem Antikörper die GPI-verankerte Isoform NCAM-120 nicht nachgewiesen werden, was jedoch bei der Analyse von P1-Hirnen kein Problem darstellte, da NCAM-120 in perinatalem Maushirn nicht detektierbar ist (He *et al.*, 1987) und erst im Verlauf der postnatalen Hirnentwicklung gebildet wird (s. Abschnitt 4.2.). Die Analyse der Hirnhomogenate mit mAk KD11 ergab für den Wildtyp ein einziges breites Signal oberhalb von 250 kDa, was eindeutig zeigt, dass hier der gesamte NCAM-Pool in der polysialylierten Form vorliegt. Im Gegensatz dazu wurde in der Doppel-Knockout-Maus ausschließlich nicht-polysialyliertes NCAM gefunden, welches durch zwei fokussierte Banden in der Höhe von 140 und 180 kDa gekennzeichnet ist, die den Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 entsprechen. In allen heterozygoten Mäusen (ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>, ST8SiaII<sup>+/+</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>, ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>) sowie in ST8SiaIV-Knockout-Mäusen (ST8SiaII<sup>+/+</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>) lag NCAM ähnlich wie im Wildtyp fast ausschließlich in der polysialylierten Form vor. Die Quantifizierung der fokussierten NCAM-Banden mittels densitometrischer Auswertung von vier unabhängigen Western-Blots ergab, dass in diesen Genotypen weniger als 6% des gesamten NCAM in der nicht-polysialylierten Form vorlagen (s. Abbildung 4.2C). In Mäusen, denen ST8SiaII fehlt, betrug dieser Anteil dagegen 45%. Somit konnte gezeigt werden, dass im perinatalen Hirn der Verlust von ST8SiaII einen wesentlich größeren Einfluss auf die NCAM-Polysialylierung hat als der Verlust von ST8SiaIV. Der in ST8SiaII- bzw. ST8SiaIV-Knockout-Mäusen beobachtete Unterschied im Polysialierungsstatus des NCAM wurde noch wesentlich deutlicher beim Vergleich von Tieren, die nur noch ein funktionelles Polysialyltransferase-Allel besitzen. Während in ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen 94% des NCAM in der polysialylierten und damit nur 6% in der nicht-polysialylierten Form

vorlagen, wurde in Mäusen, die nur noch ein Allel ST8SiaIV ( $ST8SiaII^{-/-}ST8SiaIV^{+/-}$ ) besitzen, 71% des gesamten NCAM im nicht-polysialylierten Zustand vorgefunden (Abbildung 4.2C).



**Abbildung 4.2: Status der NCAM-Polysialylierung in Wildtyp- und Polysialyltransferase-defizienten Mäusen.**

(A) von Gehirnlysaten, die an P1 aus Wildtyp- und Polysialyltransferase-defizienten Mäusen erhalten worden waren, wurden je 40  $\mu$ g Gesamtprotein in einer 7% SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrozellulose-Membran wurden die Proteine entweder mit dem PolySia-spezifischen mAk 735 (oberer Western-Blot) oder mit dem anti-NCAM-Antikörper mAk KD11 (mittlerer und unterer Western-Blot) gefärbt. Die Entwicklung erfolgte mittels eines anti-Maus-Peroxidase-Konjugats und Chemilumineszenzdetektion. Parallel wurden Aliquots von jedem Lysat mit EndoN behandelt, wie oben beschrieben aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulose mit mAk KD11 analysiert (unterer Western-Blot). Banden, die polysialyliertes NCAM sowie die unpolysialylierten NCAM-Isoformen NCAM-180 und NCAM-140 repräsentieren, sind durch Pfeile an der rechten Seite der Blots markiert. (B) Vergleich der Gesamt-PolySia-Spiegel (graue Säulen) und der Fraktion von polysialyliertem NCAM (schwarze Säulen) von P1 Mausgehirnen der neun Genotypen. Die Gesamt-PolySia-Mengen wurden mit Hilfe der DMB-HPLC-Analyse bestimmt. Hierzu wurden entfettete Gehirnhomogenate mit DMB derivatisiert und auf einer DNAPac PA 100 Säule aufgetrennt. Von jeder Probe wurden 9% des gesamten Gehirnhomogenates aufgetragen. Die Gesamtmenge an PolySia wurde aus der Peakfläche der HPLC-Diagramme berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus fünf unterschiedlichen Experimenten, wobei der Wildtyp-Wert auf 100% gesetzt wurde. Die Menge des polysialylierten NCAM wurde durch die Differenz der NCAM-Gesamt-Menge und der Menge von nicht-polysialyliertem NCAM berechnet, die wie unter (D) und (C) beschrieben erhalten wurden. (C) die relative Menge von nicht-polysialyliertem NCAM in P1-Gehirnen wurde über densitometrische Messung der Western-Blots bestimmt, die mit anti-NCAM mAk gefärbt wurden. Für jeden Genotyp wurden die Intensitäten der fokussierten Banden in Höhe von 140 kDa und 180 kDa bestimmt und addiert. Die in jedem Blot gemessenen Werte der Doppel-Knockout-Maus wurden als Referenz benutzt und auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. (D) die Gesamtmenge an NCAM in P1-Gehirnen wurde durch densitometrische Auswertung der Western-Blots der Endosialidase-behandelten Proben bestimmt. Nach der Färbung mit anti-NCAM mAk KD11 wurden für jeden Genotyp die Intensitäten der NCAM-Banden ermittelt. Die Signale der im Wildtyp gemessenen Werte wurden auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.1.1. Analyse der NCAM-Expression in P1-Hirnen Polysialyltransferase-defizienter Mäuse

Um auszuschließen, dass der Verlust einer oder beider Polysialyltransferasen einen Einfluss auf die NCAM-Expression hat, wurden in allen Genotypen die Expressionshöhe und das Isoform-Muster des NCAM bestimmt. Hierfür wurde je ein Aliquot aller Hirnlysate vor der Analyse im Western-Blot mit Endosialidase (Endo-N-acetylneuraminidase, EndoN) behandelt, um die PolySia abzuspalten. Die Detektion erfolgte mit dem anti-NCAM mAb KD11 und zeigte in allen Genotypen das gleiche Isoform-Muster (Abbildung 4.2A, unterer Western-Blot). Die Quantifizierung der NCAM-140- und NCAM-180-Signale mittels densitometrischer Auswertung ergab, dass in allen neun Genotypen identische Mengen NCAM exprimiert wurden (Abbildung 4.2D). Dieses Resultat verdeutlicht, dass der Verlust einer oder beider Polysialyltransferasen keinen Effekt auf die Expressionshöhe des NCAMs hat, jedoch das Verhältnis von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM deutlich verschieben kann. Insbesondere das Fehlen des ST8SiaII-Gens führte zu einer deutlichen Reduktion des Anteils an polysialyliertem NCAM. So lagen in ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>-Mäusen 55% und in Tieren mit einem funktionellen ST8SiaIV-Allel (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>) nur noch 34% des NCAM-Pools im polysialylierten Zustand vor (Abbildung 4.2B, schwarze Balken).

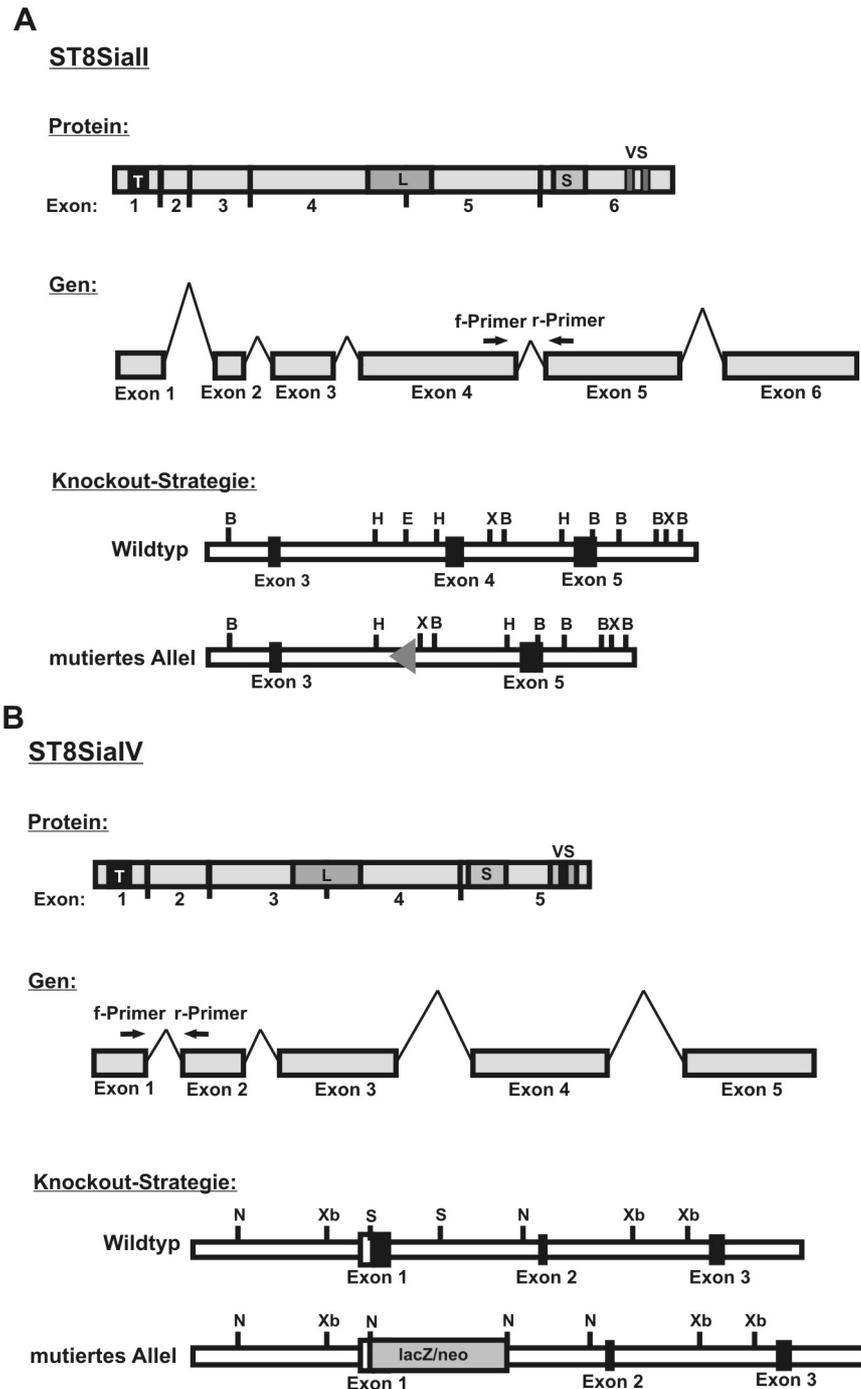
#### 4.1.1.2. Analyse des Verhältnisses von polysialyliertem NCAM zur Gesamt-PolySia-Menge

Parallel zur Untersuchung des NCAM-Polysialylierungsstatus wurde die Gesamt-PolySia-Menge in Hirnhomogenaten aller neun Genotypen bestimmt. Die Messung der PolySia-Spiegel erfolgte mit Hilfe der DMB-HPLC-Methode (Sato *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2000; Inoue und Inoue, 2001a; Inoue und Inoue, 2001b; Inoue und Inoue, 2003) und wurde von Sebastian Galuska im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Rudolf Geyer am Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der Universität Giessen durchgeführt. Bei der angewandten Methode werden die PolySia-Ketten durch saure Hydrolyse vom N-Glykan abgespalten und *in situ* mit 1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzol (DMB) derivatisiert. Die so am reduzierenden Ende fluoreszenzmarkierten PolySia-Ketten können aufgrund ihrer negativen Ladung auf einer Anionenaustauscher-Säule nach Kettenlänge aufgetrennt und fluorometrisch detektiert werden. Für die Bestimmung der Gesamt-PolySia-Menge wurden die im Chromatografie-Profil erhaltenen Peakflächen aufsummiert (Galuska *et al.*, 2006). Die so erhaltenen PolySia-Spiegel sind in Abbildung 4.2B (graue Balken) dargestellt. Während der vollständige Verlust von ST8SiaIV (ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>) keinen Einfluss auf die PolySia-

Menge hatte, führte die Abwesenheit von ST8SiaII (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>) zu einem Abfall der PolySia-Menge auf 61% des Wildtyp-Niveaus. In ST8SiaII-Knockout-Tieren, die nur noch ein funktionelles Allel ST8SiaIV besitzen (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>), wurde ein weiteres Absinken auf 35% des Wildtyp-Spiegels beobachtet. Der direkte Vergleich von Gesamt-PolySia-Menge mit den im Western-Blot ermittelten Mengen an polysialyliertem NCAM (graue und schwarze Balken in Abbildung 4.2B) zeigt, dass im Falle der ST8SiaII-Knockout-Tiere (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup> und ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>) beide Werte gleich stark abfallen und der Quotient aus PolySia-Menge und der Menge an polysialyliertem NCAM wie im Wildtyp bei einem Wert von 1 liegt. Dies deutet darauf hin, dass die NCAM-Moleküle, die polysialyliert vorliegen, im Mittel genau so viel PolySia tragen wie im Wildtyp. In ST8SiaIV-defizienten Tieren, die nur noch ein funktionelles ST8SiaII-Allel besitzen (ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>), wurde dagegen eine Veränderung im Polysialylierungsgrad beobachtet. Im Vergleich zum Wildtyp wurde hier ein Abfall der PolySia-Menge um 30% beobachtet, obwohl fast der gesamte NCAM-Pool in der polysialylierten Form vorlag. Dies legt den Schluss nahe, dass in diesen Tieren das vorliegende polysialylierte NCAM im Mittel fast ein Drittel weniger PolySia trägt als im Wildtyp.

#### 4.1.2. Polysialyltransferase mRNA-Spiegel in perinatalem Maushirn

Um zu untersuchen, ob in ST8SiaII- und ST8SiaIV-defizienten Mäusen der Verlust des einen Enzyms durch Erhöhung der Transkriptmenge des zweiten Enzyms kompensiert wird, wurden die mRNA-Spiegel beider Enzyme in Hirnhomogenaten der oben beschriebenen Genotypen zum Zeitpunkt P1 untersucht. Die Analyse erfolgte mittels quantitativer Real-Time RT-PCR (qRT-PCR) unter Verwendung Gen-spezifischer Primer und dem Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green I, der spezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA bindet (Morrison *et al.*, 1998). Wie in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt, wurde die Lage der Primer so gewählt, dass sie auf genomischer Ebene ein Intron überspannen und jedoch mit cDNA als Template kurze PCR-Fragmente liefern (68 bp bzw. 72 bp im Falle von ST8SiaII- bzw. ST8SiaIV-mRNA). Somit wird die Amplifikation genomischer DNA, die in Spuren in RNA-Präparationen vorliegen kann, unterdrückt, da hier nur PCR-Fragmente entstehen können, die um die Größe des überspannten Introns verlängert sind (6,3 kb bzw. 6,7 kb im Falle von ST8SiaII bzw. ST8SiaIV).



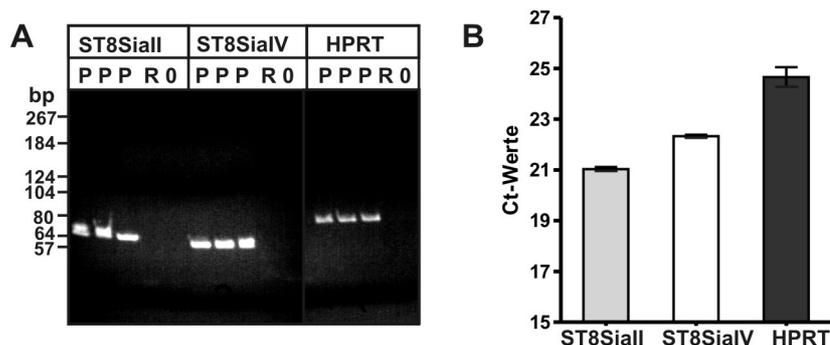
**Abbildung 4.3: Genomische Organisation von ST8SialII und ST8SialIV und Knockout-Strategie der ST8SialII<sup>-/-</sup>- und ST8SialIV<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Protein: Übersicht über den Proteinaufbau. T = Transmembrandomäne, L = Sialylmotiv L, S = Sialylmotiv S, VS = Sialylmotiv VS. Gen: Genomische Organisation der beiden Polysialyltransferasen. Die Rechtecke repräsentieren die Exons, wobei die Längen der Rechtecke maßstabsgetreu sind. Die Introns sind mit Hilfe von Verbindungslinien angedeutet, deren Längen nicht maßstabsgetreu sind. Pfeile oberhalb der Exons zeigen die Lage der gegen die Polysialyltransferasen spezifischen Primerpaare an, welche für die qRT-PCR eingesetzt wurden. f-Primer = *forward*-Primer, r-Primer = *reverse*-Primer. Knockout-Strategie: Übersicht über die Strategie des Ausschaltens des ST8SialII-Gens (A) bzw. des ST8SialIV-Gens (B) in der entsprechenden Knockout-Maus. (A) Knockout-Strategie von ST8SialII: Exon 4 ist durch eine *loxP*-Stelle ersetzt. Exons sind als schwarze Boxen und die *loxP*-Stelle ist als Dreieck angedeutet. E = Eco RI, H = HindII, X = XhoI. (B) Knockout-Strategie von ST8SialIV: Exon 2 ist durch eine *lacZ/neo*-DNA-Sequenz ersetzt. Exons sind als schwarze Boxen gekennzeichnet. N = Nco I, S = Sma I, Xb = Xba I (Eckhardt *et al.*, 2000; Angata *et al.*, 2004).

Im Falle der ST8SiaII-Knockout-Maus liegt Exon 4 deletiert vor, das für einen Proteinbereich kodiert, der für die enzymatische Aktivität essentiell ist (Angata *et al.*, 2004). Vom genetisch modifizierten Genlocus kann eine verkürzte ST8SiaII-mRNA gebildet werden, die jedoch kein funktionelles Protein liefert (Angata *et al.*, 2004). Um eine Amplifikation dieses nicht-funktionellen Transkripts in der qRT-PCR zu vermeiden, wurde für die Quantifizierung des ST8SiaII mRNA-Spiegels ein für Exon 4 spezifischer Primer mit einem Exon 5 spezifischen Primer kombiniert (s. Abbildung 4.3). Für die Generierung der ST8SiaIV-Knockout-Maus wurde der größte Teil von Exon 1 durch eine *lacZ/neo*-Genkassette ersetzt (s. Abbildung 4.3), wodurch keine ST8SiaIV-mRNA mehr gebildet wird (Eckhardt *et al.*, 2000). Analog zur oben beschriebenen Strategie wurde für den Nachweis von ST8SiaIV-mRNA ebenfalls ein Primer-Paar gewählt, bei dem ein Primer im deletierten Gen-Bereich liegt (s. Abbildung 4.3).

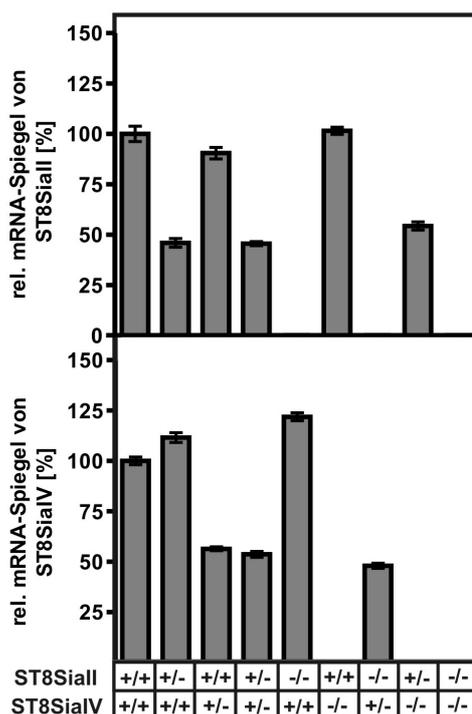
Die Bestimmung der mRNA-Spiegel beider Polysialyltransferasen erfolgte relativ zur Transkriptmenge eines Referenzgens. Hierfür wurde das Gen, das für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) kodiert, verwendet. Für dessen Transkriptquantifizierung wurden ebenfalls Intron-überspannende Primer gewählt (Größe des HPRT-PCR-Produktes: 86 bp). Zur Kontrolle der Spezifität aller Primer-Paare wurde die Größe der erhaltenen PCR-Produkte mittels 6%iger PAGE überprüft. Wie in Abbildung 4.4A dargestellt, konnte je Primer-Paar nur ein PCR-Fragment nachgewiesen werden, dessen Größe mit der berechneten Amplifikat-Größe übereinstimmte. Die Amplifikations-Effizienzen der verwendeten Primerpaare wurden aus der Steigung einer Standardkurve ermittelt, für deren Erstellung die Ct-Werte (*threshold cycle* bzw. Schwellenwert-Zyklus) gegen den Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl des Zielgens aufgetragen wurden (s. Abschnitt 3.1.16.). Für alle drei Primerpaare wurde eine Amplifikationseffizienz von  $E = 2$  (100%) ermittelt (ST8SiaII-Primer: 2,018, ST8SiaIV-Primer: 2,052 und HPRT-Primer: 2,00). Dies erlaubt nach Bestimmung der  $\Delta Ct$ -Werte ( $\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$ ) und  $\Delta\Delta Ct$ -Werte ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{ST8SiaII}} - \Delta Ct_{\text{ST8SiaIV}}$ ) den direkten Vergleich der Transkriptmengen von ST8SiaII und ST8SiaIV.

Abbildung 4.4B zeigt exemplarisch die in P1-Hirnen ermittelten Ct-Werte eines qRT-PCR-Laufes. Für alle drei Transkripte lagen die Werte im Bereich von 21-25 Zyklen, was zeigt, dass beide Polysialyltransferasen im perinatalen Maushirn eine ähnliche Expressionshöhe wie das Referenzgen aufweisen.



**Abbildung 4.4:** Analyse der PCR-Produkte von ST8SialII, ST8SialIV und HPRT eines Real-Time PCR-Laufes.

(A) Es wurden auf einem 6% Acrylamidgel die PCR-Produkte einer Real-Time-PCR aufgetragen, in die aus Wildtyp-Gehirn-RNA mittels RT-PCR erhaltene cDNA eingesetzt worden war. Als Primer wurden für ST8SialII, ST8SialIV und HPRT spezifische Primerpaare eingesetzt. Je Primerpaar wurden drei qRT-PCR Läufe analysiert (= P) sowie zwei Kontrollansätze. Im ersten Kontrollansatz wurde anstatt cDNA ein entsprechendes Aliquot eines cDNA-Synthese-Laufs ohne Reverse Transkriptase verwendet (= R) und im zweiten Kontrollansatz statt cDNA Wasser verwendet (0). (B) Ct-Werte von ST8SialII-, ST8SialIV- und HPRT-Amplifikationsprodukten einer Real-Time-PCR. Es wurden gleiche Mengen cDNA, die aus Wildtyp-Gehirn-RNA mittels RT-PCR synthetisiert worden war, eingesetzt. Die Ct-Werte wurden in Dreifachwerten gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.



**Abbildung 4.5:** Relative Transkriptmengen von ST8SialII und ST8SialIV.

Die relativen mRNA-Spiegel von ST8SialII (oberes Diagramm) und von ST8SialIV (unteres Diagramm) wurden in P1-Gehirnen mittels qRT-PCR gemessen. Es wurden für jeden Genotypen zwei unabhängig voneinander hergestellte cDNAs in die Messung eingesetzt, dabei erfolgte die Messung jedes Ct-Wertes in Triplikaten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, wobei die für die Wildtyp-Maus erhaltenen Werte auf 100% gesetzt wurden.

Abbildung 4.5 zeigt die Ergebnisse der qRT-PCR für P1-Hirne aller neun Genotypen. Während in homozygoten Knockout-Tieren kein Transkript des deletierten

Polysialyltransferase-Gens detektiert werden konnte, führte der Verlust von nur einem Allel zu einer Halbierung des entsprechenden mRNA-Spiegels. Diese Gendosis-abhängige Reduzierung der Transkriptmenge wurde für alle heterozygoten Genotypen beobachtet, unabhängig von der An- oder Abwesenheit des zweiten Enzyms. Auch der vollständige Verlust eines der beiden Enzyme führte nicht zu einer Veränderung des mRNA-Spiegels des zweiten Enzyms, was zeigt, dass die Transkription beider Polysialyltransferase-Gene unabhängig voneinander reguliert wird.

Um einen direkten quantitativen Vergleich der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Transkriptmengen machen zu können, wurden die für Wildtyp-Gehirn erhaltenen qRT-PCR Daten mit Hilfe der sogenannten  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet (Livak und Schmittgen, 2001). Somit konnte gezeigt werden, dass in perinatalem Maushirn der ST8SiaII-mRNA-Spiegel den des ST8SiaIV-mRNA-Spiegels um den Faktor  $1,93 \pm 0,58$  übersteigt (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten, die jeweils in Dreifachmessungen durchgeführt wurden). Dies widerlegt frühere aus Northern-Blot-Analysen gewonnene Daten, die auf einen vielfach höheren ST8SiaII-Spiegel in der Perinatalphase hindeuteten (Kurosawa *et al.* 1997; Hildebrandt *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998).

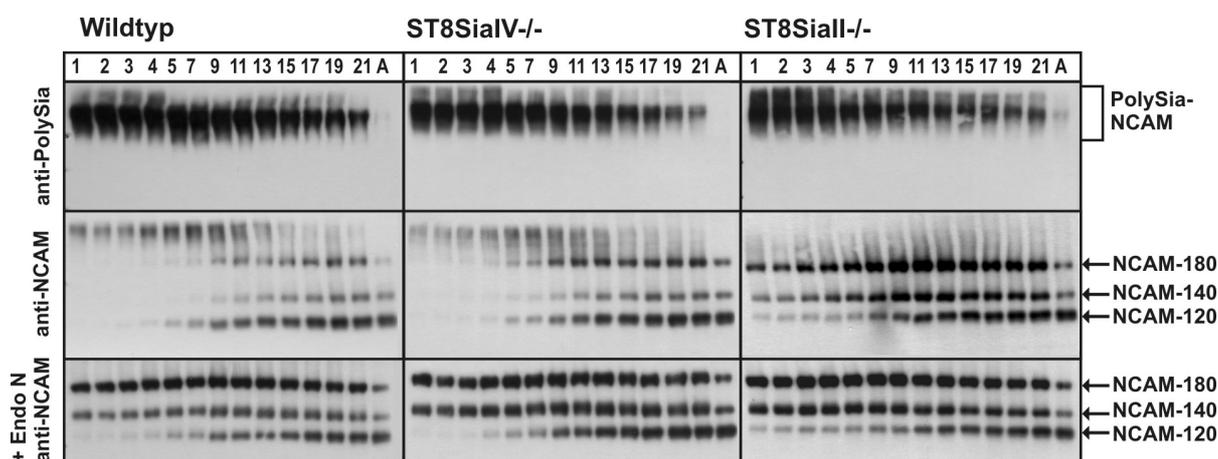
## **4.2. Einfluss der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV auf die PolySia-Synthese während der postnatalen Entwicklung des Mäusegehirns**

Obwohl seit 25 Jahren bekannt ist, dass die PolySia-Menge nach der Geburt einem dramatischen Abfall unterliegt (Edelmann *et al.*, 1982; Rothbard *et al.*, 1982), fehlen exakte Daten über den genauen Zeitverlauf sowie Informationen zur Bedeutung der beiden Polysialyltransferasen während dieser entwicklungsabhängigen Veränderungen. In der folgenden Studie wurden Homogenate von Gehirnen von Wildtyp-, ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Mäusen, die zwischen P1 und P21 sowie im erwachsenen Stadium entnommen wurden, analysiert, um aufzuklären, welchen Einfluss jede einzelne Polysialyltransferase auf die NCAM-Polysialylierung während der postnatalen Hirnentwicklung der Maus hat.

### **4.2.1. Entwicklungsabhängige Veränderungen der NCAM-Polysialylierung während der postnatalen Entwicklung von Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>, und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Charakteristisch für die postnatale Gehirnentwicklung ist neben dem Rückgang der PolySia-Menge auch der Wechsel von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM (Edelmann *et*

*al.*, 1982). Um zu untersuchen wie beide Polysialyltransferasen den Zeitverlauf dieses Prozesses beeinflussen, wurde eine detaillierte Western-Blot-Analyse durchgeführt, in der Homogenate von Gehirnen aus Wildtyp-Mäusen, ST8SiaII<sup>-/-</sup> und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert wurden, die innerhalb des postnatalen Zeitraums von P1 bis P21 und im erwachsenen Stadium entnommen wurden (s. Abbildung 4.6). Je Genotyp und Altersstadium wurden identische Proteinmengen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse vergleichend analysiert. Für den Nachweis von PolySia wurde der mAk 735 und für den Nachweis von NCAM der mAk H28 verwendet. Dieser Antikörper erkennt eine Peptidsequenz innerhalb der zweiten Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domäne, so dass alle Hauptisoformen des NCAM, einschließlich NCAM-120, detektiert werden können (Hirn *et al.*, 1987). Da sowohl polysialyliertes als auch nicht-polysialyliertes NCAM erkannt werden, eignet sich mAk H28 ebenso wie mAk KD11 für die genaue Analyse des NCAM-Polysialylierungsstatus.



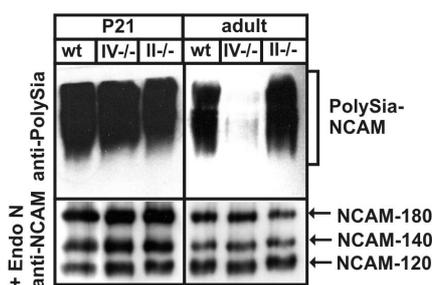
**Abbildung 4.6: Entwicklungsabhängige Veränderungen des Polysialylierungsstatus von NCAM.**

Es wurden ganze Gehirne von Wildtyp-, ST8SiaIV<sup>-/-</sup>, und ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen der angegebenen Altersstufen von P1 bis P21 und des erwachsenen Alters präpariert. Gehirnprouben wurden homogenisiert und Lysate wurden mittels 7% SDS-PAGE aufgetrennt, wobei in jede Spur des SDS-Gels 20 µg an Gesamtprotein aufgetragen worden waren. Nachdem die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen worden waren, wurden die Proteine mit dem anti-PolySia mAk 735 (obere Reihe Western-Blots) oder mit dem anti-NCAM mAk H28 (mittlere und untere Reihe Western-Blots) gefärbt. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe eines anti-Maus-Peroxidase-Konjugats und Chemilumineszenzdetektion. In einem Parallelexperiment wurden Aliquots von allen Gehirnllysaten mit EndoN behandelt, um PolySia zu entfernen, und um so die Expressionsmengen des NCAM-Gesamtproteins und das NCAM-Isoformmuster untersuchen zu können (untere Reihe Western-Blots). Banden, die die polysialylierten NCAM-Formen (PolySia-NCAM) sowie die nicht-polysialylierten NCAM-Isoformen NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 repräsentieren, sind durch Pfeile an der rechten Seite der Blots markiert.

Wie im oberen Teil der Abbildung 4.6 gezeigt, konnte polysialyliertes NCAM in den mit mAk 735 gefärbten Blots für alle drei Genotypen in dem Zeitraum von P1 bis P21 detektiert werden. Darüber hinaus war eine Abnahme der Signalintensität ab P11 in allen drei Genotypen zu beobachten. Im Vergleich zu Hirnllysaten aus bis zu drei Wochen alten Mäusen konnte in Hirnhomogenaten adulter Mäuse unter den verwendeten Detektionsbedingungen

kaum PolySia nachgewiesen werden. Allerdings konnten über den PolySia-Nachweis mittels mAk 735 keine signifikanten Unterschiede im Verlauf dieser Abnahme festgestellt werden (Abbildung 4.6, obere Reihe). Die Färbung der Western-Blots mit mAk H28 lieferte dagegen ein detailliertes Bild des entwicklungsabhängigen Übergangs von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM (Abbildung 4.6, mittlere Reihe). Die Analyse der Hirnhomogenate aus den Wildtyp-Tieren ergab, dass im Zeitraum P1 bis P7 fast der gesamte NCAM-Pool in der polysialylierten Form vorliegt und erst ab P5 geringe Mengen nicht-polysialyliertes NCAM-120 auftreten. Nach P9 konnte eine Abnahme der Signalintensität von PolySia-NCAM beobachtet werden, die von einem Anstieg der Signalstärke der unpolysialylierten NCAM-Isoformen, NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 begleitet wurde (Abbildung 4.6, mittlere Reihe, linker Western-Blot).

In Gehirnen von ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde in diesem Zeitraum eine ähnliche Verteilung von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM gefunden (Abbildung 4.6, mittlere Reihe, mittlerer Western-Blot). Indessen wurde in ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen ein vorzeitiges Auftreten von PolySia-freiem NCAM beobachtet (Abbildung 4.6, mittlere Reihe, rechter Western-Blot). Während in Wildtyp- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Gehirnen zwischen P1 und P5 kein PolySia-freies NCAM detektiert werden konnte, waren für diesen Zeitraum in Hirnlysaten der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäuse deutliche Signale von PolySia-freiem NCAM, insbesondere von NCAM-140 und NCAM-180, zu erkennen. Dieses Resultat verdeutlicht, dass während der frühen postnatalen Hirnentwicklung ST8SiaII einen entscheidenden Beitrag leistet, den NCAM-Pool in der polysialylierten Form zu halten.



**Abbildung 4.7:** Vergleich von polysialyliertem NCAM in Gehirnen von drei Wochen alten und erwachsenen Tieren.

Es wurden ganze Gehirne von Wildtyp-, ST8SiaIV<sup>-/-</sup>- und ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von P21 und im erwachsenen Alter präpariert. Hirnhomogenate wurden mittels 7% SDS-PAGE aufgetrennt, wobei je Probe 40 µg an Gesamtprotein aufgetragen worden sind. Ein Aliquot der Hirnhomogenate wurde mit EndoN behandelt, bevor es in die SDS-PAGE eingesetzt wurde. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran geblottet, und die Entwicklung der Blots erfolgte wie in Abbildung 4.6 beschrieben. Banden, die die polysialylierte Form von NCAM (PolySia-NCAM) und von nicht-polysialyliertem NCAM repräsentieren, NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180, sind durch Pfeile an der rechten Seite der Blots markiert.

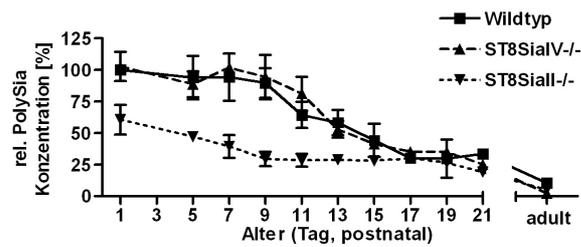
Da unter den gewählten Bedingungen der Blotentwicklung kaum PolySia in adulten Hirnen nachgewiesen werden konnte, wurden Lysate dieser Hirne im Vergleich zu P21-Hirnen unter Verlängerung der Expositionszeit für die Chemilumineszenz-Detektion analysiert (s. Abbildung 4.7). Unter diesen für den Nachweis von PolySia in adulten Hirnen optimierten Bedingungen konnten deutliche Unterschiede zwischen den drei Genotypen sichtbar gemacht werden. Während in Wildtyp- und ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Hirnen deutliche PolySia-Signale mit ähnlicher Intensität beobachtet wurden, wurden in ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Hirnen nur sehr geringe Mengen PolySia detektiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass ST8SiaIV im adulten Gehirn, im Gegensatz zur Situation in der Perinatalphase, einen wesentlich größeren Einfluss auf die NCAM-Polysialylierung hat als ST8SiaII.

Um das NCAM-Expressionsmuster in der postnatalen Gehirnentwicklung der drei Genotypen zu analysieren, wurden weitere Western-Blot-Analysen mit Endosialidase-behandelten Hirnhomogenaten durchgeführt (s. Abbildung 4.6, untere Reihe). Auf diese Analysen wird in Abschnitt 4.2.3. eingegangen.

#### **4.2.2. Quantifizierung der PolySia-Mengen während der postnatalen Entwicklung der Gehirne von Wildtyp, ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>- Mäusen**

Ergänzend zu der Untersuchung des NCAM-Polysialylierungsstatus wurde die Gesamt-PolySia-Menge in Hirnhomogenaten von Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen während der postnatalen Entwicklung analysiert. Die Messung der PolySia-Spiegel erfolgte mit Hilfe der DMB-HPLC-Methode (Sato *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2000; Inoue und Inoue, 2001a; Inoue und Inoue, 2001b; Inoue und Inoue, 2003) und wurde von Sebastian Galuska in der Arbeitsgruppe von Prof. Rudolf Geyer am Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der Universität Giessen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind als relative PolySia-Konzentrationen in Abbildung 4.8 zu sehen.

Während sich der PolySia-Spiegel in der Wildtyp-Situation während der ersten postnatalen Woche nicht signifikant verändert hatte, konnte eine starke Abnahme des PolySia-Spiegels ab P9 beobachtet werden. Innerhalb eines engen Zeitraums, zwischen P9 und P17, fiel der PolySia-Spiegel um 70% ab, so dass an P17 nur noch 30% der Ausgangsmenge am Tag P1 vorlagen. Dieses niedrige Niveau blieb während der weiteren Entwicklung bis P21 konstant. Zwischen P21 und dem adulten Stadium konnte eine weitere Reduzierung der PolySia-Menge beobachtet werden, so dass im adulten Gehirn nur noch 10% der perinatalen PolySia-Menge gemessen wurde.



**Abbildung 4.8: Veränderungen der PolySia-Menge während der postnatalen Gehirnentwicklung.**

Es wurden ganze Gehirne von Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup> und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert, die sich in den angegebenen postnatalen Altern zwischen P1 und P21 und dem erwachsenen Alter befanden. Es wurde in Gehirnhomogenaten die PolySia-Konzentration mit Hilfe der DMB-HPLC-Analyse bestimmt (s. auch Abbildungsunterschrift von Abbildung 4.2B). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Werte, die für den Wildtyp an P1 gemessen worden sind, wurden auf 100% gesetzt.

Der Vergleich der PolySia-Konzentrationen in den beiden Knockout-Tieren bestätigte eindrucksvoll, dass ST8SiaII eine entscheidende Rolle während der frühen postnatalen Gehirnentwicklung zukommt. Während der Verlust von ST8SiaIV in den ersten 21 Tagen zu keiner Veränderung des PolySia-Spiegels führte, wurden in Hirnen von ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen dramatische Abweichungen zum entwicklungsabhängigen Verlauf des PolySia-Spiegels beobachtet. Ausgehend von einer an P1 um 40% reduzierten Menge fiel der PolySia-Spiegel bereits direkt nach der Geburt ab, und an P9 wurde bereits der Wert erreicht, der in ST8SiaIV<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen erst an P17 gefunden wurde. Zwischen P9 und P21 blieb der PolySia-Spiegel dagegen konstant. Bemerkenswert ist, dass die bedeutenden Unterschiede zwischen den ST8SiaII-Knockout-Mäusen und den beiden übrigen Genotypen, Wildtyp und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>, auf den Zeitraum P1 bis P15 beschränkt waren, so dass ab P17 in allen drei Genotypen identische PolySia-Mengen vorlagen, die 30% des Wildtyp-Spiegels an P1 entsprachen. Im Zeitraum von P21 zum adulten Stadium wurde in allen drei Genotypen eine weitere Reduktion der PolySia-Spiegel festgestellt. So konnte in adulten Gehirnen von Wildtyp-Mäusen nur noch 10%, von ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen 5% und von ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen 2% der an P1 im Wildtyp-Hirn vorliegenden PolySia-Menge nachgewiesen werden.

**4.2.3. Analyse der Expression der NCAM-Isoformen während der postnatalen Gehirnentwicklung in Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>, und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen**

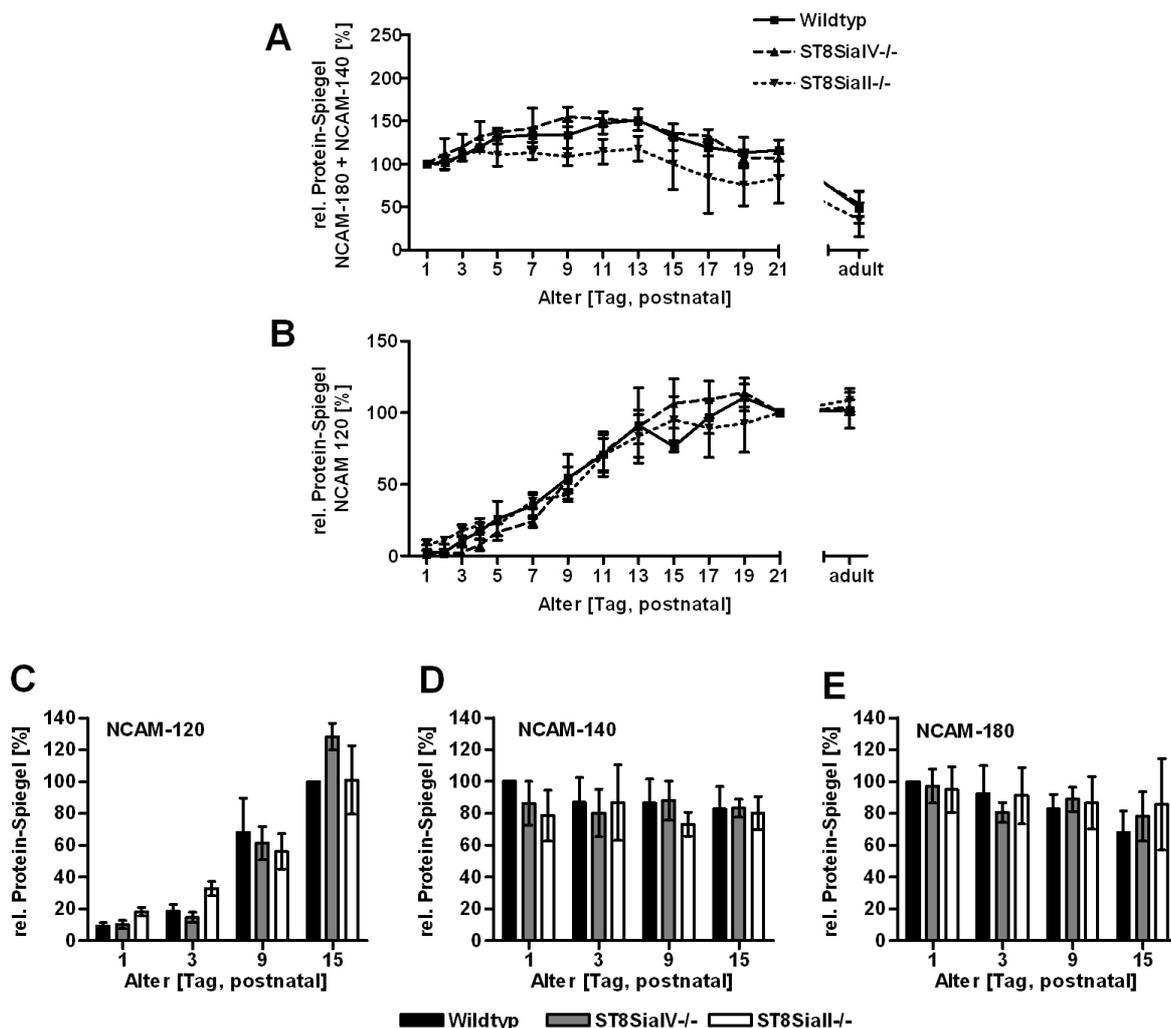
Mittels Western-Blot-Analyse wurde in ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen ein frühzeitigeres Auftreten von nicht-polysialyliertem NCAM beobachtet (s. Abbildung 4.6). Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf eine Zunahme der Gesamt-NCAM-Menge oder ausschließlich auf die Abnahme der an NCAM gebundenen PolySia zurückzuführen ist, wurde in Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen die Expressionshöhe von NCAM während der postnatalen

Gehirnentwicklung vergleichend untersucht. Hierfür wurde eine Western-Blot-Studie durchgeführt, in der Endosialidase-behandelte Hirnlysate aus unterschiedlichen postnatalen Stadien (P1 bis P21 und adult) analysiert wurden.

#### 4.2.3.1. NCAM-Expressionsmuster der Wildtyp-Maus

Die Western-Blot-Analyse der Wildtyp-Hirne zeigte, dass in der frühen postnatalen Gehirnentwicklung (von P1 bis P21) NCAM-140 und NCAM-180 die vorherrschenden NCAM-Isoformen sind (s. Abbildung 4.6, untere Reihe, linker Blot). Die Quantifizierung der Signale von NCAM-140 und NCAM-180 mittels densitometrischer Auswertung ergab, dass die Expressionsmengen von NCAM-140 und NCAM-180 innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen nahezu konstant sind, und dass erst im adulten Stadium die Expressionsmenge beider Isoformen um 50% reduziert ist (Abbildung 4.9A). Im deutlichen Gegensatz zu den Transmembran-Formen NCAM-140 und NCAM-180 wurden in den ersten postnatalen Wochen für die GPI-verankerte Isoform NCAM-120 starke entwicklungsabhängige Veränderungen beobachtet. Während in den ersten vier postnatalen Tagen NCAM-120 kaum nachweisbar war, erfolgte ab P5 ein kontinuierlicher Anstieg des NCAM-120-Spiegels, der an P17 ein Maximum erreichte und bis zum erwachsenen Alter konstant blieb (Abbildung 4.9B). Ein Vergleich der entwicklungsabhängigen Verläufe von NCAM-120 und PolySia-Spiegel verdeutlicht, dass die Hochregulierung von NCAM-120 parallel zur Herunterregulierung der PolySia erfolgte. Darüber hinaus zeigte der Vergleich der Signalstärken der drei NCAM-Isoformen im adulten Gehirn, dass NCAM-120 in diesem Stadium die dominierende Isoform darstellt (Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7).

Anhand des Vergleiches der NCAM-120-Signale der unbehandelten und der mit EndoN-behandelten Hirnlysate wird deutlich, dass sich die Signalintensitäten von unpolysialyliertem NCAM-120 der unbehandelten Proben nicht von denen der Endosialidase-behandelten Proben unterscheiden (s. Abbildung 4.6, linke Spalte, mittlerer und unterer Blot). Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass sich der Hauptteil der NCAM-120-Isoform in der unpolysialylierten Form befindet. Im Gegensatz dazu führte der Endosialidase-Verdau im Fall von NCAM-140 und NCAM-180 zu einer Erhöhung der Signalstärke von unpolysialyliertem NCAM, da in den nicht mit Endosialidase behandelten Proben der größte Anteil von NCAM-140 und NCAM-180 in der polysialylierten Form vorliegt. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass im Hirn der Wildtyp-Maus die PolySia vor allem an die Transmembran-Isoformen NCAM-140 und NCAM-180 gebunden wird, während NCAM-120 in der unpolysialylierten Form vorliegt.



**Abbildung 4.9:** NCAM-Proteinspiegel während der postnatalen Entwicklung des Gehirns.

Entwicklungsabhängige Veränderungen des NCAM-Proteinspiegels in Gehirnen von Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup> und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden über densitometrische Messungen der Western-Blots mit Endosialidase-behandelten Hirnlysaten bestimmt, s. Abbildung 4.6 untere Reihe Western-Blots. Für jeden der angegebenen Zeitpunkte wurden die Intensitäten der Proteinbanden der Isoformen NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 bestimmt. Die Ergebnisse der NCAM-140- und NCAM-180-Quantifizierung wurden addiert (A) und die Ergebnisse der NCAM-120-Quantifizierung wurden separat dargestellt (B). Es wurden für jeden Genotyp drei unabhängige Blots ausgemessen. Die Werte, die an P1 in der NCAM-140+180-Messung erhalten worden waren, wurden als Referenz benutzt und auf 100% gesetzt. In der NCAM-120-Messung wurden die Werte, die an P21 erhalten worden waren, auf 100% gesetzt. (C), (D), (E), um die NCAM-Expressionslevel von NCAM-120 (C), NCAM-140 (D) und NCAM-180 (E) direkt miteinander vergleichen zu können, wurden Endosialidase-behandelte Hirnlysate von vier ausgewählten Zeitpunkten (P1, P3, P9, P15) aller drei Genotypen auf derselben Blot analysiert. Als Blotmembran wurde eine PVDF-Membran verwendet, und die Proteine wurden mit dem Antikörper gegen NCAM, mAk H28, gefärbt. Die Entwicklung und Quantifizierung der Blots erfolgte mit einem Infrarotfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper ( $\alpha$ -Ratte-IRDye 800) und dem Odyssey-System von Licor. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten. Für die Auswertung von NCAM-140 und NCAM-180 wurden die Werte, die an P1 im Wildtyp gemessen worden waren, auf 100% gesetzt und für die Auswertung von NCAM-120 wurden die Werte, die an P15 im Wildtyp gemessen worden waren, auf 100% gesetzt.

#### 4.2.3.2. NCAM-Expressionsmuster der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Maus

Die Quantifizierung der NCAM-140- und NCAM-180-Signale in der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Maus ergab, dass in den Gehirnen dieser beiden Genotypen ähnliche entwicklungsabhängige Veränderungen der NCAM-Isoform-Muster stattfinden wie in der Wildtyp-Maus. Es konnte in beiden Polysialyltransferase-Knockout-Mäusen festgestellt werden, dass sowohl NCAM-180 als auch NCAM-140 in nahezu konstanten Mengen in dem Zeitraum von P1 bis P21 exprimiert werden (Abbildung 4.9A). Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass der Anteil der Isoform NCAM-120 in diesem Zeitabschnitt in beiden Knockout-Mäusen in demselben Maße ansteigt wie es in der Wildtyp-Maus beobachtet worden war (Abbildung 4.9B).

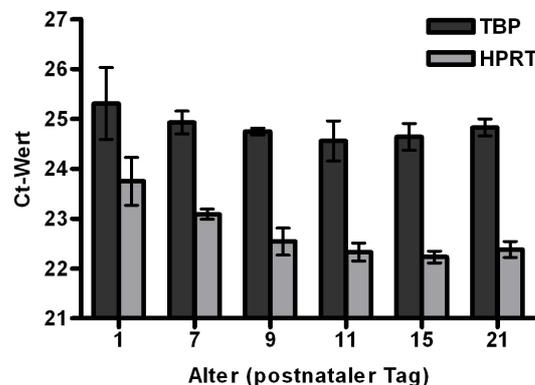
Um die NCAM-Expression in den drei Genotypen direkt miteinander vergleichen zu können, wurden von allen drei Genotypen Hirnhomogenate, die mit EndoN behandelt worden waren, auf demselben Blot analysiert. Um die Hirnhomogenate der drei Genotypen gemeinsam auf einem SDS-Gel auftragen zu können, wurden vier Zeitpunkte, P1, P3, P9 und P15, ausgewählt, an denen die NCAM-Expression näher betrachtet werden sollte. Für die Bestimmung der relativen Expressionshöhen von NCAM-140 und NCAM-180 wurden die Messergebnisse der densitometrischen Auswertung auf die an P1 im Wildtyp gemessenen Werte bezogen (Abbildung 4.9D und E). Die Quantifizierung ergab, dass keine signifikanten Unterschiede in den Spiegeln von NCAM-140 und NCAM-180 zwischen den drei Genotypen an den exemplarisch ausgewählten Zeitpunkten vorlagen (Abbildung 4.9D und E). Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass das frühzeitige Auftreten von nicht-polysialyliertem NCAM-140 und NCAM-180 im Gehirn der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus nicht durch eine im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen stärkere Expression von NCAM-140 und NCAM-180 verursacht wurde, sondern auf eine verminderte Herstellung von PolySia zurückzuführen ist.

Das Ergebnis der densitometrischen Quantifizierung von NCAM-120 in allen drei Genotypen an den Zeitpunkten P1, P3, P9 und P15 ist in Abbildung 4.9C dargestellt. Da zum Zeitpunkt P1 kaum NCAM-120 detektierbar war, wurden hier alle Messwerte auf den an P15 ermittelten Wildtyp-Wert bezogen. Es zeigte sich, dass in Gehirnen der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäuse an P1 und P3 im Vergleich zu Wildtyp- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen etwa doppelt soviel NCAM-120 vorliegt. So wurden in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus an P1 20% und an P3 38% des P15-Wildtyp-Werts gemessen, während in den anderen beiden Genotypen an P1 10% und an P3 ca. 20% des P15 Wildtyp-Spiegels erreicht wurden. Im Gegensatz zu den Differenzen, die in den Proben der ersten drei postnatalen Tagen gemessen wurden, wurden an P9 und P15 keine signifikanten Unterschiede zwischen ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen und den anderen beiden Genotypen festgestellt.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Fehlen der Polysialyltransferase ST8SiaII einen Einfluss auf die Expression von NCAM-120 hat, dass dieser jedoch auf die ersten postnatalen Tage beschränkt ist.

#### 4.2.4. Entwicklungsabhängige Veränderungen der NCAM-mRNA-Spiegel

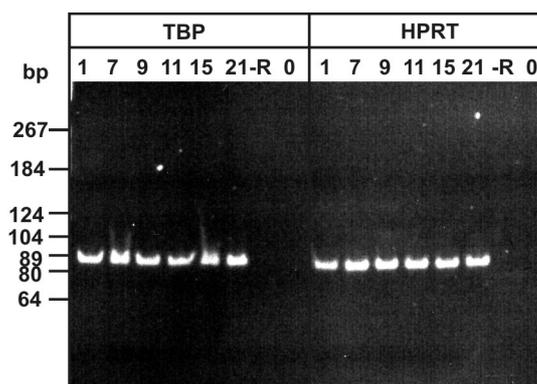
Um entwicklungsabhängige Veränderungen der NCAM-mRNA-Spiegel zu verfolgen, wurden qReal-Time-PCR-Analysen unter Verwendung Gen-spezifischer Primer und des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I durchgeführt. Hierbei galt es zunächst, ein geeignetes Referenzgen zu finden, dessen Expression während der gesamten postnatalen Hirnentwicklung konstant exprimiert wird. Wie in Abbildung 4.10 dargestellt, unterliegt die Expression des zuvor in der P1-Studie als Referenz verwendeten HPRT-Gens einer starken postnatalen Abnahme. Im Gegensatz hierzu konnte für das Gen des TATA-Box bindenden Proteins (TBP) im Zeitraum P1 bis P21 eine relativ konstante Expression beobachtet werden, so dass im Folgenden das TBP-Gen als Referenzgen zur relativen Quantifizierung der NCAM-mRNA-Spiegel verwendet wurde.



**Abbildung 4.10: Messung der Ct-Werte von HPRT und TBP in Gehirnen von P1-P21 alten Wildtyp-Mäusen mittels Real-Time-PCR.**

Es wurden die Veränderungen der Ct-Werte der PCR-Produkte von HPRT und TBP innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen im Gehirn der Maus in einer Real-Time-PCR bestimmt. Dafür wurde cDNA, die aus Gehirn von Wildtyp-Mäusen im Zeitraum von P1 bis P21 mit RT-PCR erhalten worden war, eingesetzt. Als Primer wurden spezifisch an TBP und HPRT bindende Oligonukleotide benutzt. Die Ct-Werte wurden in Dreifachwerten gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

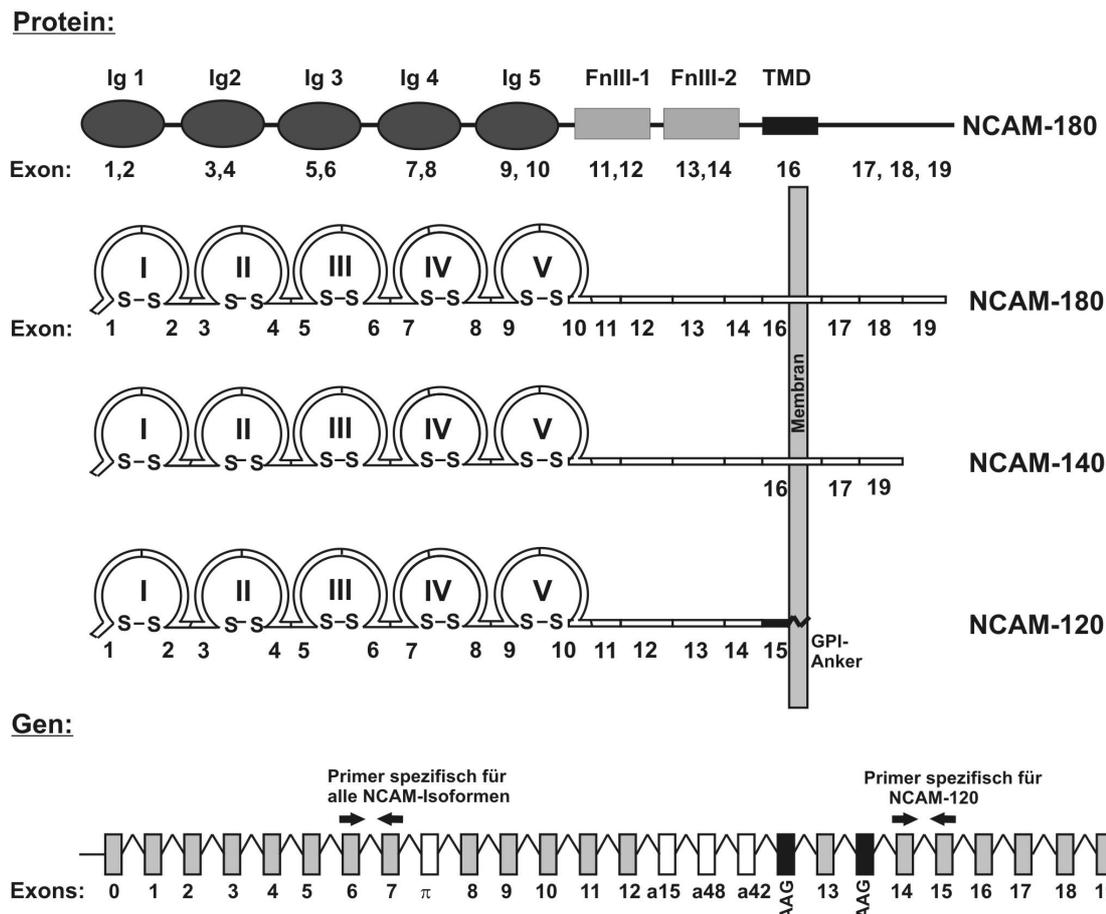
Zur Überprüfung der Spezifität der verwendeten TBP-Primer wurde die Größe aller PCR-Produkte mittels 6%iger PAGE überprüft. Wie in Abbildung 4.11 dargestellt, konnte in Hirnen unterschiedlich alter Mäuse (P1 bis P21) nur je ein PCR-Fragment nachgewiesen werden, dessen Größe mit der berechneten Amplifikat-Größe (Größe des TBP-PCR-Produktes: 89 bp, Größe des HPRT-PCR-Produktes: 86 bp) übereinstimmte.



**Abbildung 4.11: Analyse der PCR-Produkte von TBP und HPRT**

Es wurden in einer 6% PAGE die PCR-Produkte einer Real-Time-PCR eingesetzt, in der die Transkriptmengen von HPRT und TBP bestimmt werden sollten. In diese PCR waren TBP- und HPRT-spezifische Primer eingesetzt worden, und als Template war cDNA verwendet worden, die zuvor mittels RT-PCR von RNA aus Gehirnen von Wildtyp-Mäusen im Alter von P1-P21 (1-21) erhalten worden war. Als Kontrollen wurden in diese Real-Time-PCR Proben eingesetzt, die anstelle von cDNA Wasser enthielten (= 0) und Proben, die anstatt cDNA eine Negativkontrolle der cDNA-Synthese enthielten, denen die Reverse Transkriptase nicht zugesetzt worden war (= -R).

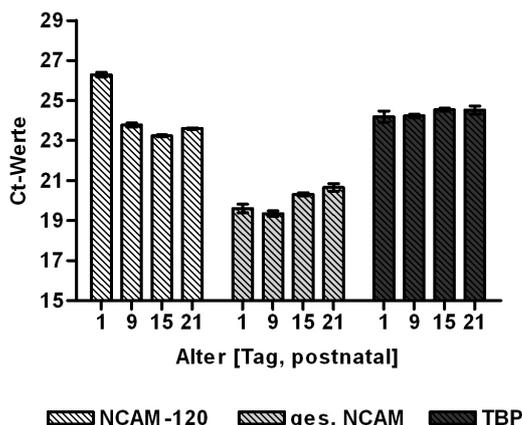
Die Lage der NCAM-spezifischen Primer, die zur Bestimmung der Transkriptspiegel von Gesamt-NCAM, das heißt die Gesamtheit aller NCAM-Isoformen, und NCAM-120 verwendet wurden, ist in Abbildung 4.12 dargestellt. Um spezifisch die mRNA-Menge von Gesamt-NCAM quantifizieren zu können, wurde ein für Exon 6 spezifischer Primer mit einem für Exon 7 spezifischen Primer ausgewählt (s. Abbildung 4.12), die ausgehend von cDNA ein 68 bp großes PCR-Fragment bilden. Da die NCAM-120-Isoform über einen GPI-Anker an die Membran gebunden ist, enthält die entsprechende mRNA das Exon 15, das für eine Signalsequenz kodiert, die die Anhängung eines GPI-Ankers erlaubt. Um die Menge der NCAM-120-Transkripte separat quantifizieren zu können, wurde ein Primerpaar gewählt, das an Exon 14 und an Exon 15 bindet und ausgehend von cDNA ein 67 bp langes PCR-Fragment bildet.



**Abbildung 4.12: Die durch alternatives Spleißen produzierten NCAM-Isoformen.**

Im oberen Teil dieses Schemas sind die Proteinstrukturen der wichtigsten NCAM-Isoformen aus der Maus dargestellt. NCAM-140 und NCAM-180 sind transmembrangängig. NCAM-120 dagegen verfügt über keine Transmembrandomäne. Stattdessen ist es durch Glykosyl-Phosphatidylinositol in der Membran verankert. Extrazellulär besitzen alle NCAM-Isoformen fünf Immunglobulin- und zwei Fibronectin-Typ-III-Domänen. Es ist markiert, welcher Bereich des Proteins durch welches Exon kodiert wird. Im unteren Teil dieses Schemas ist die genomische Organisation von NCAM in der Maus dargestellt. Die Kästchen stellen die Exons dar, wobei graue Kästchen konstitutive und weiße Exons alternative Exons repräsentieren. Die Pfeile geben die Bindungsregionen für Gesamt-NCAM und NCAM-120 spezifischen Primer an. I-V = Immunglobulindomänen 1 bis 5, FnIII = Fibronectin-TypIII-Domäne, TMD = Transmembrandomäne

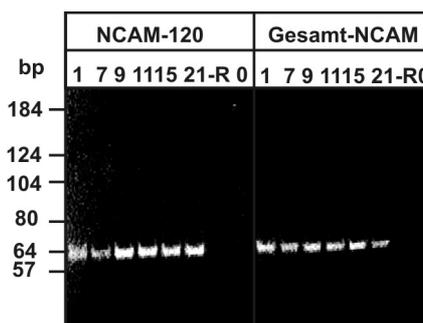
Abbildung 4.13 zeigt die in Hirnen vier unterschiedlich alter Wildtyp-Mäuse (P1, P9, P15 und P21) ermittelten Ct-Werte von Gesamt-NCAM, NCAM-120 und TBP eines Real-Time-PCR-Laufes. Die Ct-Werte der NCAM-120-Messung nahmen von P1 bis P9 um 2,5 Zyklen ab, während ab P9 keine Veränderung der Zyklenzahl festgestellt werden konnte. Die Abnahme um 2,5 Zyklen bedeutet, dass sich die NCAM-120-mRNA-Menge um das 6-fache erhöht hat. Im Gegensatz zu NCAM-120 konnten keine bemerkenswerten Unterschiede der Ct-Werte von Gesamt-NCAM beobachtet werden. Die Ct-Werte von Gesamt-NCAM sind um 3 bis 6,5 Zyklen niedriger als die Ct-Werte von NCAM-120. Das bedeutet, dass in dieser Zeitspanne die Gesamt-NCAM-Template-Menge um Faktor 90 (an P1) bis Faktor 8 (an P21) größer ist.



**Abbildung 4.13: Bestimmung der Ct-Werte von NCAM-120, Gesamt-NCAM und TBP innerhalb der ersten drei postnatalen Wochen in Gehirnen von Wildtyp-Mäusen mittels Real-Time-PCR.**

Es wurden die Ct-Werte von NCAM-120, Gesamt-NCAM und TBP im Gehirn von Wildtyp-Mäusen an P1, P9, P15 und P21 innerhalb eines Real-Time-PCR-Laufes bestimmt. Es wurde cDNA, die aus Wildtyp-Gehirn mit RT-PCR erhalten worden war, eingesetzt. Als Primer wurden spezifisch an NCAM-120, Gesamt-NCAM und TBP bindende Oligonukleotide benutzt. Die Ct-Werte wurden in Dreifachwerten gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Mittels einer 6%igen PAGE konnte die Spezifität der Primer für Gesamt-NCAM und NCAM-120 nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 4.14 dargestellt, konnte je Primer-Paar nur ein PCR-Fragment detektiert werden, dessen Größe mit der zuvor berechneten Größe des Amplifikats übereinstimmt. Außerdem wurden für alle verwendeten Primer die Amplifikations-Effizienzen von  $E = 2$  (100%) ermittelt (Gesamt-NCAM-Primer: 2,1, NCAM-120-Primer: 2,1 und TBP-Primer: 2,0). Diese können somit für die relative Quantifizierung der Transkriptmengen von NCAM-120 und Gesamt-NCAM eingesetzt werden.



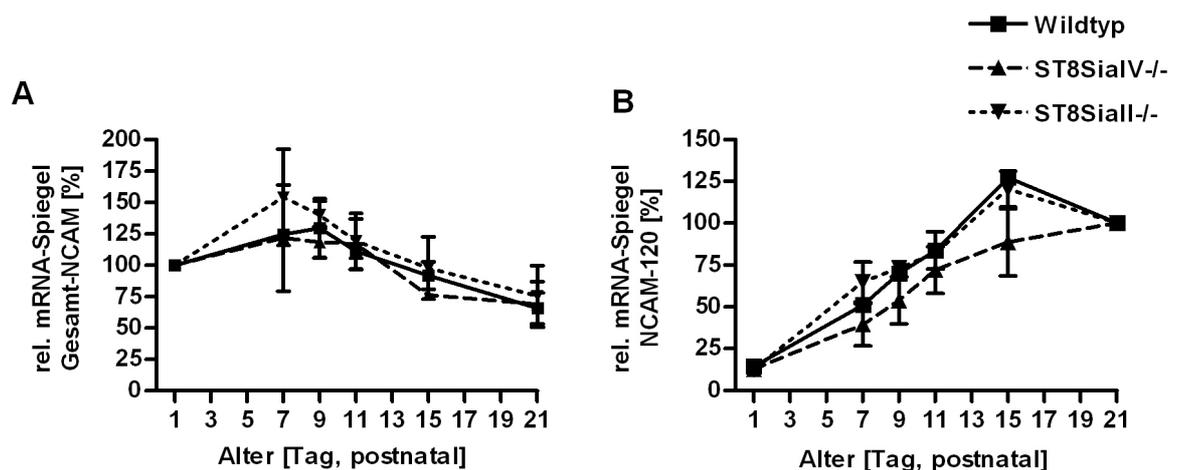
**Abbildung 4.14: Analyse der PCR-Produkte von NCAM-120 und Gesamt-NCAM einer Real-Time-PCR.**

Es wurden in einer 6% PAGE PCR-Produkte einer Real-Time-PCR analysiert, in der aus Hirn-RNA von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters (P1 bis P21) hergestellte cDNA eingesetzt worden war, um Transkriptmengen von NCAM-120 und NCAM zu analysieren. Als Primer wurden spezifisch an NCAM-120 und Gesamt-NCAM bindende Oligonukleotide benutzt. Als Kontrollen wurden in diese Real-Time-PCR Proben eingesetzt, die anstelle von cDNA Wasser (= 0) bzw. eine Negativkontrolle der cDNA-Synthese enthielten (= -R).

Abbildung 4.15A zeigt den Verlauf der relativen mRNA-Spiegel von Gesamt-NCAM in Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen während der postnatalen Entwicklung von P1

bis P21. Innerhalb der Messreihe jedes Genotyps wurde der an P1 gemessene Wert auf 100% gesetzt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die mittels Western-Blot-Analyse erhalten wurden, konnten innerhalb der drei ersten postnatalen Wochen in keinem Genotyp drastische Veränderungen des Transkriptspiegels von Gesamt-NCAM festgestellt werden. Es konnte in jedem Genotyp beobachtet werden, dass der Gesamt-NCAM-Spiegel um ca. 25% bis P9 steigt und dass sich ab P9 die mRNA-Menge bis auf ein Niveau von 75% an P21 vermindert.

Der Verlauf der relativen mRNA-Spiegel von NCAM-120 in den drei Genotypen innerhalb des postnatalen Zeitraums P1 bis P21 wird in Abbildung 4.15B gezeigt. Ähnlich wie bei der Zunahme der Proteinmenge wurde auch hier eine starke Hochregulierung von P1 bis P21 in allen drei Genotypen beobachtet, was darauf hinweist, dass die Höhe der NCAM-120-Expression hauptsächlich auf Ebene der Transkription reguliert wird. Der Vergleich der relativen NCAM-120-mRNA-Mengen zeigte für alle drei Genotypen im Rahmen der Messgenauigkeit übereinstimmende entwicklungsabhängige Verläufe.

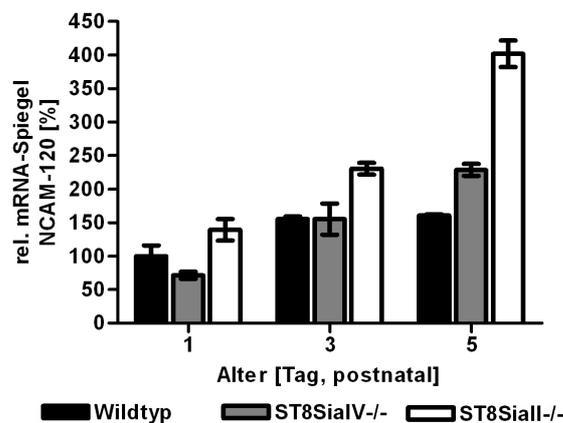


**Abbildung 4.15: Transkript-Spiegel von Gesamt-NCAM (A) und NCAM-120 (B) während der postnatalen Gehirnentwicklung.**

(A), (B) der relative mRNA-Spiegel von Gesamt-NCAM und NCAM-120 wurde mit Hilfe von qRT-PCR in Gehirnen von Wildtyp-, ST8SialV<sup>-/-</sup>- und ST8SialII<sup>-/-</sup>-Mäusen innerhalb des Zeitraums P1-P21 bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurden zwei unabhängig voneinander hergestellte cDNAs in Triplikaten gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Für Gesamt-NCAM wurden die Werte, die in jedem Genotyp an P1 gemessen worden waren, auf 100% gesetzt, und für NCAM-120 wurden die Werte, die an P21 gemessen worden waren, auf 100% gesetzt.

Da auf Proteinebene Unterschiede in der Expression von NCAM-120 zwischen den drei Genotypen innerhalb der ersten drei postnatalen Tage festgestellt worden waren (s. Abschnitt 4.2.3.), wurde der Anstieg der Transkriptmenge von NCAM-120 in Gehirnen von Mäusen, die sich im Alter von P1, P3 und P5 befanden, näher untersucht. Damit ein direkter Vergleich zwischen den drei Genotypen möglich ist, erfolgte die Messung der relativen NCAM-120-mRNA-Mengen aller drei Genotypen auf derselben PCR-Platte (Abbildung

4.16). Während sich der in ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen von P1 bis P5 ermittelte ansteigende NCAM-120-Transkriptspiegel kaum von den im Wildtyp gemessenen Werten unterscheidet, wurde in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus eine frühere Zunahme der NCAM-120-Transkriptmenge festgestellt. Bereits an P1 konnte in dieser Maus ein um 50% und an P5 ein um 100% höherer mRNA-Spiegel im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen nachgewiesen werden. Somit konnte auf Transkript-Ebene bestätigt werden, dass der Verlust der Polysialyltransferase ST8SiaII in den ersten fünf Tagen nach der Geburt einen Einfluss auf die Expressionshöhe von NCAM-120 hat.



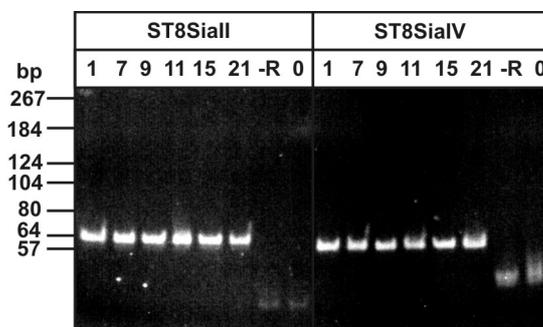
**Abbildung 4.16: mRNA-Spiegel von NCAM-120 im Gehirn von Wildtyp-, ST8SiaIV<sup>-/-</sup>- und ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen während der ersten fünf postnatalen Tage.**

Es wurde der relative mRNA-Spiegel von NCAM-120 mit Hilfe von qRT-PCR in Gehirnen von Wildtyp-, ST8SiaIV<sup>-/-</sup>- und ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen an den ersten fünf postnatalen Tagen bestimmt. Dabei erfolgte die Messung aller Proben auf derselben PCR-Platte. Es wurden für jeden Genotyp und Zeitpunkt zwei unabhängig voneinander hergestellte cDNAs in die Messung eingesetzt und jeweils als Triplikate gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, wobei die an P1 in der Wildtyp-Maus ermittelten Werte auf 100% gesetzt wurden.

#### 4.2.5. Expression der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV während der postnatalen Gehirnentwicklung

Um zu analysieren, welchen Einfluss die Expressionsmengen beider Polysialyltransferasen auf den Verlauf der PolySia-Abnahme während der postnatalen Entwicklung haben, wurden die relativen Transkriptspiegel von ST8SiaII und ST8SiaIV in Gehirnen von Wildtyp-Mäusen analysiert, die an acht unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen P1 und P21 isoliert worden waren. Für die qRT-PCR-Analyse wurden die in Abschnitt 4.1.2. beschriebenen ST8SiaII- und ST8SiaIV-spezifischen Primerpaare eingesetzt und TBP als Referenzgen verwendet. Zunächst wurde überprüft, ob die Primer-Spezifität der für ST8SiaII und ST8SiaIV spezifischen Primer auch in Hirnmaterial von Mäusen im Alter von P1 bis P21 gewährleistet ist. Es konnte mittels 6%iger PAGE für beide Primerpaare in allen PCR-Läufen nur ein PCR-Produkt nachgewiesen werden, dessen Größe mit der berechneten Amplifikatgröße

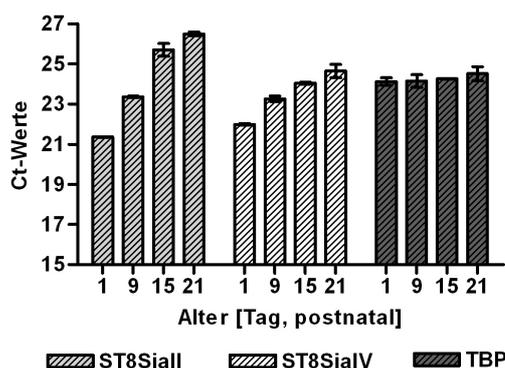
übereinstimmte (Abbildung 4.17). Für alle drei Primerpaare wurde eine Amplifikationseffizienz von  $E = 2$  (100%) ermittelt (ST8SiaII-Primer: 2,13, ST8SiaIV-Primer: 2,13 und TBP-Primer: 2,07).



**Abbildung 4.17: Analyse der PCR-Produkte von ST8SiaII und ST8SiaIV einer Real-Time-PCR.**

In einer 6% PAGE wurden PCR-Produkte einer Real-Time-PCR analysiert, in der cDNA eingesetzt worden war, die aus RNA aus dem Gehirn von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters (P1 bis P21) hergestellt worden war. Als Primer wurden spezifisch an ST8SiaII und ST8SiaIV bindende Oligonukleotide benutzt. Als Kontrollen wurden in diese Real-Time-PCR Proben eingesetzt, die anstelle von cDNA Wasser (= 0) bzw. eine Negativkontrolle der cDNA-Synthese enthielten (= -R).

Abbildung 4.18 zeigt exemplarisch die in Hirnen von Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters (P1, P9, P15 und P21) gemessenen Ct-Werte von ST8SiaII, ST8SiaIV und TBP, die in einem gemeinsamen Real-Time-PCR-Lauf ermittelt wurden. Für die Transkripte von ST8SiaII und ST8SiaIV konnte in diesem Zeitraum eine Zunahme der Ct-Werte beobachtet werden, was zeigt, dass die Expression der beiden Polysialyltransferasen während der postnatalen Entwicklung abnimmt.



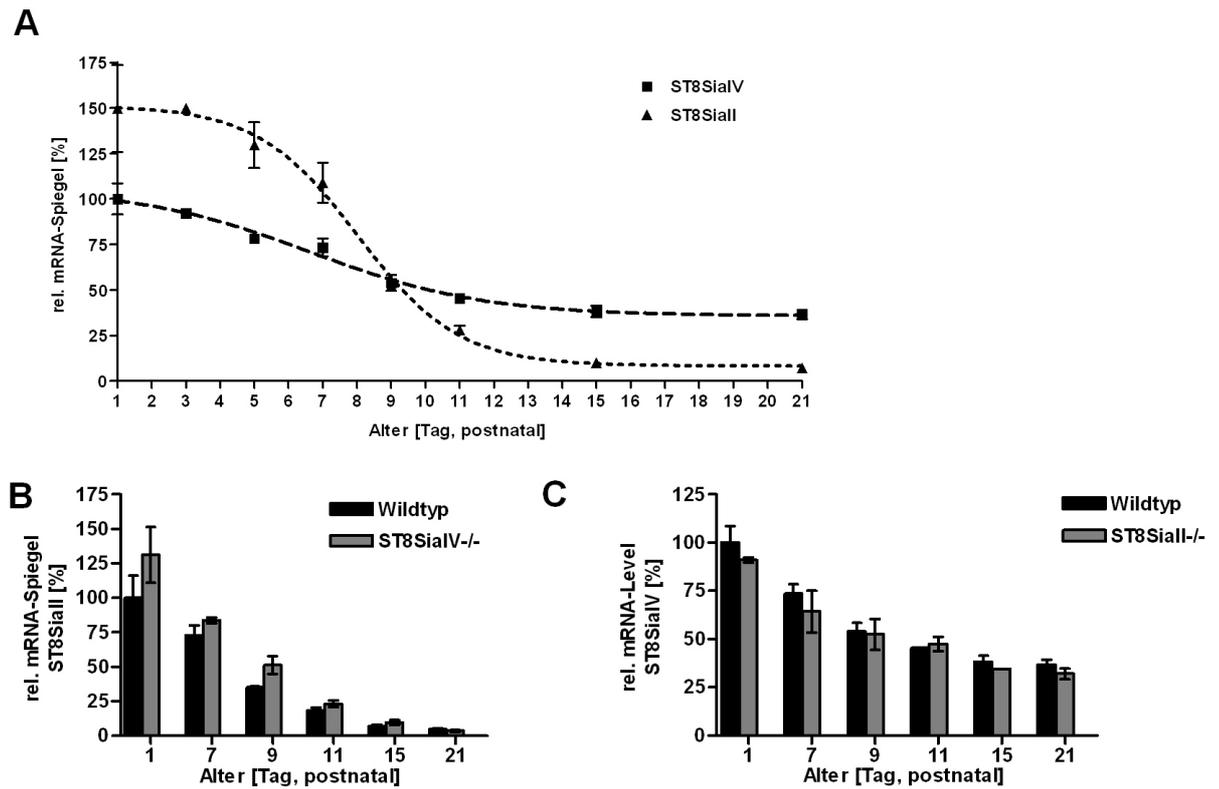
**Abbildung 4.18: Ct-Werte von ST8SiaII, ST8SiaIV und TBP in Gehirnen von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters (P1, P9, P15 und P21).**

Es wurden die Ct-Werte von ST8SiaII, ST8SiaIV und TBP im Gehirn von Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters (P1, P9, P15, P21) in einer gemeinsamen Real-Time-PCR bestimmt. Es wurde cDNA, die aus Wildtyp-Gehirn-RNA mittels RT-PCR erhalten worden war, eingesetzt. Als Primer wurden spezifisch an ST8SiaII, ST8SiaIV und TBP bindende Oligonukleotide benutzt. Die Ct-Werte wurden in Dreifachwerten gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

In Abbildung 4.19 sind die Ergebnisse der qRT-PCR für Hirne aus Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen postnatalen Alters dargestellt. Um die Transkriptspiegel von ST8SiaII und

ST8SiaIV miteinander vergleichen zu können, wurden alle Werte auf den an P1 gemessenen ST8SiaIV-Wert bezogen. Diese Daten verdeutlichen, dass an P1 ST8SiaII die vorherrschende Polysialyltransferase ist. Der im ersten Teil dieser Arbeit bestimmte Faktor von 1,93 ( $\pm 0,58$ ), um den die ST8SiaII-Transkriptmenge den ST8SiaIV mRNA-Spiegel an P1 übersteigt, wurde im Rahmen der Messgenauigkeit in dieser unabhängig durchgeführten Studie bestätigt 1,51 ( $\pm 0,25$ ). Unmittelbar nach der Geburt wurde für beide Polysialyltransferasen eine Abnahme der mRNA-Menge festgestellt, wobei deutliche Unterschiede im Ausmaß des Rückgangs beobachtet wurden. Während innerhalb der drei ersten postnatalen Wochen die Menge der ST8SiaIV-Transkripte um 60% abnahm, reduzierte sich in dem gleichen Zeitabschnitt der ST8SiaII-Spiegel um 140%. Dabei wurde für beide Polysialyltransferasen der stärkste Rückgang ihrer Transkriptspiegel in einem Zeitraum von P5 bis P11 gemessen. Aufgrund des unterschiedlich starken Rückganges beider mRNA-Spiegel, erreichten ST8SiaII und ST8SiaIV an P9 identische Transkript-Mengen. Danach kehrte sich das Verhältnis der beiden Polysialyltransferasen um, und an P21 wurde ein fünffach höherer ST8SiaIV-mRNA-Spiegel bestimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass das zeitliche Auftreten beider Polysialyltransferasen in der postnatalen Entwicklung streng reguliert ist. Während ST8SiaII in der ersten postnatalen Woche die prominentere Polysialyltransferase ist, wird ST8SiaIV ab P11 in größerer Menge transkribiert als ST8SiaII.

Um herauszufinden, ob der Verlust einer Polysialyltransferase durch die erhöhte Expression des zweiten Enzyms ausgeglichen wird, wurden die mRNA-Mengen beider Polysialyltransferasen in ST8SiaII- und ST8SiaIV-defizienten Gehirnen gemessen (Abbildung 4.19B und C). An sechs Zeitpunkten von P1 bis P21 wurden die mRNA-Mengen von ST8SiaII in Gehirnen von ST8SiaIV<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen bestimmt, während die ST8SiaIV-mRNA-Spiegel in ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen gemessen wurden. Für beide Knockout-Mäuse konnte festgestellt werden, dass sich die Transkriptmengen der jeweils noch vorhandenen Polysialyltransferase in den ersten drei postnatalen Wochen nicht signifikant von den in der Wildtyp-Maus bestimmten Werten unterscheiden. Dies bedeutet, dass die Expression beider Enzyme über den gesamten Zeitraum von P1 bis P21 unabhängig voneinander reguliert wird.

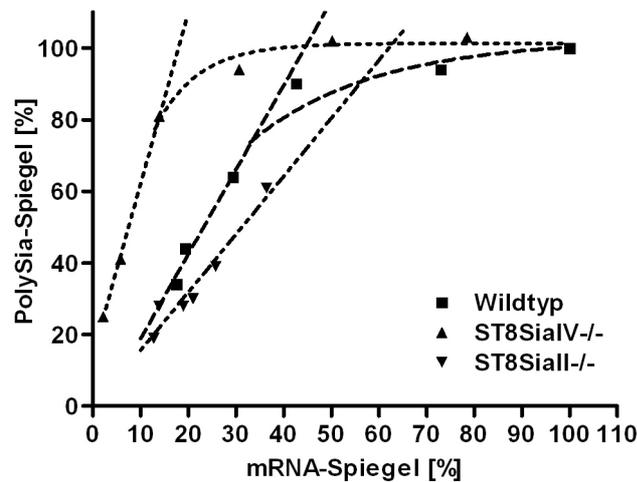


**Abbildung 4.19: Entwicklungsabhängige Veränderungen der Transkriptspiegel von ST8SiaII und ST8SiaIV.**

(A) es wurden die relativen mRNA-Spiegel von ST8SiaII und ST8SiaIV im Gehirn von Wildtyp-Mäusen an unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen P1 und P21 mit Hilfe von qRT-PCR ermittelt. Dabei wurden für jeden Zeitpunkt zwei unabhängig voneinander hergestellte cDNAs in Triplikaten gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, wobei der an P1 gemessene ST8SiaIV-mRNA-Wert als Referenzpunkt genutzt und auf 100% gesetzt wurde. (B) Vergleich des ST8SiaII-mRNA-Spiegels im Gehirn der Wildtyp-Maus mit dem ST8SiaII-mRNA-Spiegel im Gehirn der ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Maus. (C) Vergleich des ST8SiaIV-mRNA-Spiegels im Gehirn der Wildtyp-Maus mit dem ST8SiaIV-mRNA-Spiegel in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus. Die relativen mRNA-Spiegel von ST8SiaII (B) und ST8SiaIV (C) wurden mit Hilfe von qRT-PCR bestimmt. Für jeden Genotyp und jeden Zeitpunkt wurden zwei unabhängig voneinander hergestellte cDNAs in Dreifachwerten gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, wobei die für den Wildtyp an P1 gemessenen Werte auf 100% gesetzt wurden.

#### 4.2.6. Korrelation der Gesamt-mRNA-Spiegel beider Polysialyltransferasen mit der Menge an gebildeter PolySia

Der Vergleich des Verlaufs der PolySia-Abnahme während der postnatalen Hirnentwicklung (Abbildung 4.8) mit den Veränderungen der mRNA-Mengen von ST8SiaII und ST8SiaIV (Abbildung 4.19) deutet darauf hin, dass die Produktbildung eng mit den Transkriptmengen beider Polysialyltransferasen verknüpft ist. Um diese Abhängigkeit näher zu untersuchen, wurden die in allen drei Genotypen in den ersten drei postnatalen Wochen ermittelten PolySia-Mengen gegen die jeweils an diesen Tagen gemessenen Gesamt-Polysialyltransferase- mRNA-Spiegel in einem Diagramm aufgetragen (s. Abbildung 4.20).



**Abbildung 4.20: Korrelation der Polysialyltransferase mRNA-Spiegel mit der Menge an PolySia.**

Es wurden die Gesamt-Polysialyltransferase-mRNA-Spiegel in Gehirnen von Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels qRT-PCR bestimmt (s. Abbildung 4.19) und die Werte von sechs ausgewählten Zeitpunkten (P1, P7, P9, P11, P15 und P21) wurden gegen die korrespondierenden PolySia-Spiegel aufgetragen, die mit DMB-HPLC-Analyse bestimmt worden waren (s. Abbildung 4.8). Der Gesamt-Polysialyltransferase-mRNA-Spiegel der Wildtyp-Gehirne wurde erhalten, indem die Transkriptspiegel von ST8SiaII und ST8SiaIV addiert wurden. Der Transkript- und der PolySia-Spiegel, die im Wildtyp-Gehirn an P1 gemessen worden waren, wurden auf 100% gesetzt.

Es konnte in allen drei Genotypen festgestellt werden, dass die Produktbildung linear mit der Zunahme der Polysialyltransferase-Transkriptspiegel ansteigt. Da eine größere Steigung für die durch ST8SiaII katalysierte PolySia-Bildung festgestellt werden konnte als für die durch ST8SiaIV katalysierte Reaktion (siehe im Vergleich die Kurven der ST8SiaIV<sup>-/-</sup> und der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus), bedeutet das, dass ST8SiaII im Vergleich zu ST8SiaIV PolySia effizienter synthetisiert oder dass die ST8SiaII-mRNA mit einer höheren Effizienz translatiert wird. Auffallend ist, dass nur die Kurven der Wildtyp- und der ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäuse im Bereich hoher Transkriptmengen, d.h. während der ersten postnatalen Tage, einen Sättigungsbereich erreichen. Da an diesen ersten Tagen (P1-P7) alle NCAM-Moleküle polysialyliert vorlagen (Abbildung 4.6), bedeutet das, dass die Herstellung der PolySia-Menge durch die Zahl der vorliegenden NCAM-Moleküle limitiert wird. In den ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte von P1 bis P7 bereits nicht-polysialyliertes NCAM detektiert werden, was zeigt, dass noch freie Akzeptormoleküle vorliegen, und entsprechend wurde für diese Mäuse auch im Bereich hoher ST8SiaIV-Transkriptmengen keine Sättigung der PolySia-Herstellung beobachtet. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass in ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen die PolySia-Bildung nicht durch die verfügbare NCAM-Menge sondern einzig durch die PolySia-Biosynthese-Kapazität limitiert wird.

### 4.3. Einfluss der NCAM-Gendosis auf die Menge an polysialyliertem NCAM

Wie wichtig die posttranslationale Modifizierung des NCAM mit PolySia für die neuronale Entwicklung ist, wird durch den schweren Phänotyp der Polysialyltransferase-Doppel-Knockout-Maus verdeutlicht, der durch Wachstumsretardation, Hydrozephalus, postnataler Letalität und Defekten der Gehirnhauptfasertrakte gekennzeichnet ist (Weinhold *et al.*, 2005). Da diese letalen Defekte in der Doppel-Knockout-Maus durch nicht-polysialyliertes NCAM hervorgerufen werden und sie durch das Ausschalten des NCAM-Gens in der Tripel-Knockout-Maus (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>NCAM<sup>-/-</sup>) wieder aufgehoben werden, stellt sich die Frage, in welchem Maße die Konzentration an PolySia-freiem NCAM diese phänotypischen Veränderungen im Gehirn der Maus beeinflusst. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Mäuse analysiert, die sich nicht nur in der Anzahl der funktionellen Polysialyltransferase-Allele sondern auch in der Zahl der funktionellen NCAM-Allele unterscheiden (NCAM<sup>+/+</sup> versus NCAM<sup>+/-</sup>). Die verwendeten Genotypen, die durch Kreuzung von ST8SiaII-, ST8SiaIV- und NCAM-Knockout-Mäusen generiert wurden, sind in Abbildung 4.21 dargestellt. Da bereits gezeigt werden konnte, dass unterschiedliche Kombinationen der Polysialyltransferase-Allele den Grad der NCAM-Polysialylierung verändern können (s. Abschnitt 4.1.), wurde in diesem Abschnitt der Arbeit untersucht, in wie weit die Menge an PolySia-freiem NCAM durch Halbierung der NCAM-Gendosis verändert werden kann. Um schließlich den Einfluss von unpolysialyliertem NCAM auf die phänotypischen Veränderungen zu untersuchen, wurde in den unterschiedlichen Knockout-Mäusen der Gehalt an PolySia-freiem NCAM bestimmt und mit deren morphologischen Veränderungen in Beziehung gesetzt.

Abbildung 4.21 gibt einen Überblick über die in dieser Studie verwendeten Genotypen. Wie in Abschnitt 4.1. wurden alle Untersuchungen an Hirnmaterial durchgeführt, das an P1 entnommen wurde.

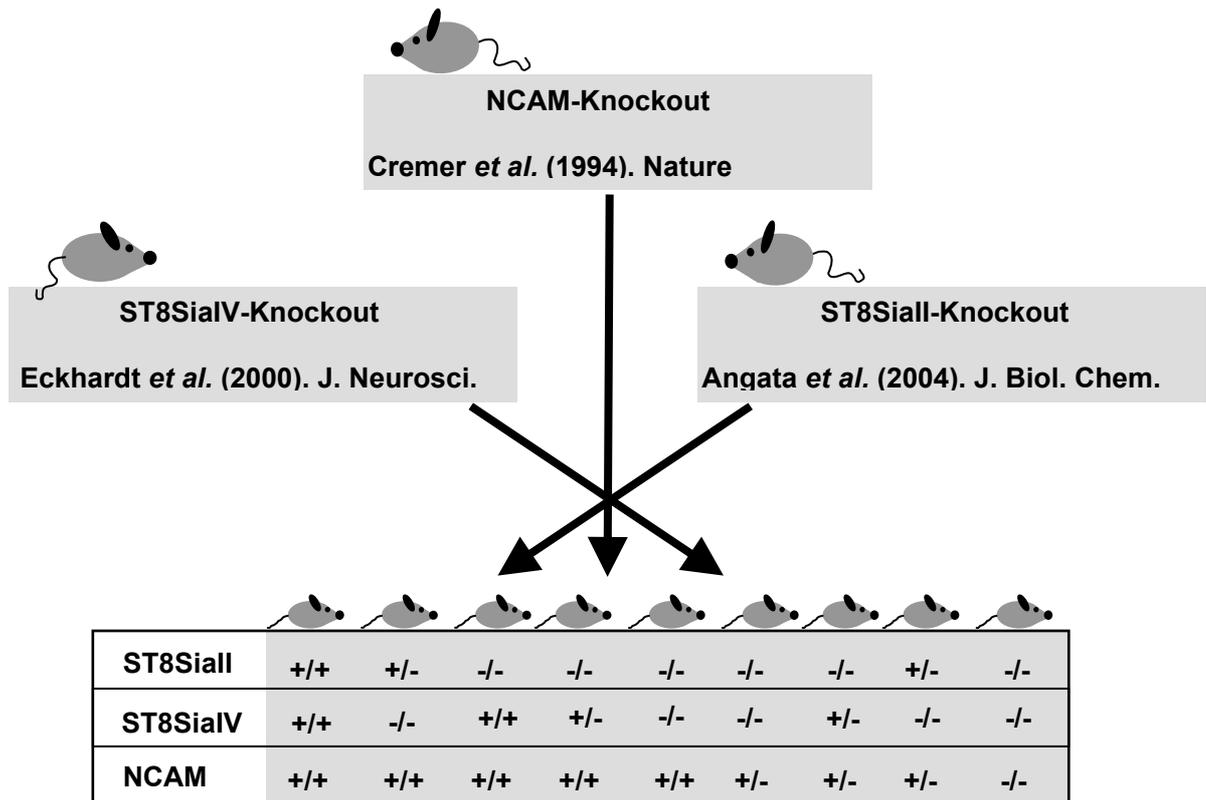
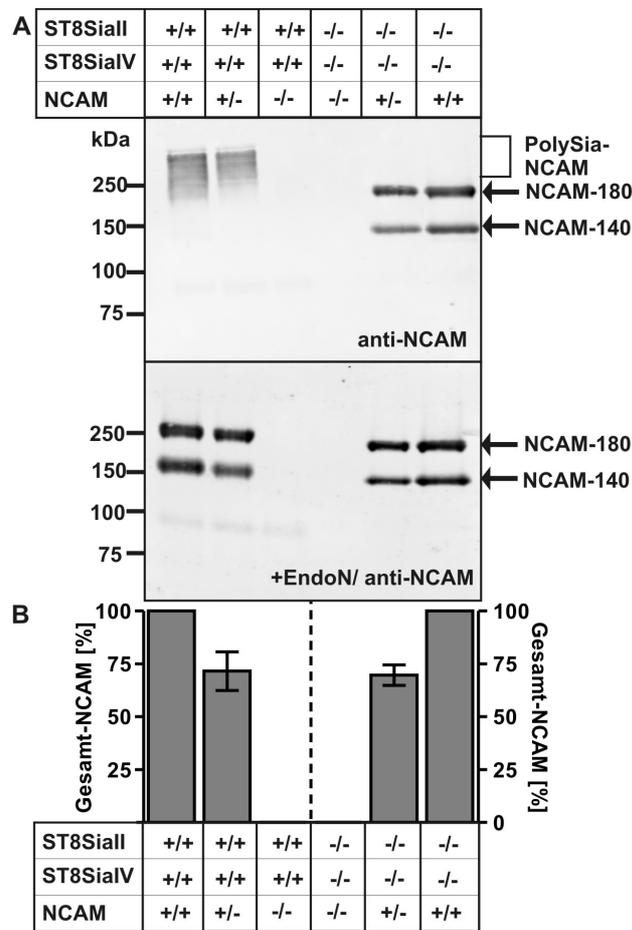


Abbildung 4.21: Überblick über die neun zu untersuchenden Genotypen, die sich in der Kombination der Allele von ST8SiaII, ST8SiaIV und NCAM unterscheiden.

#### 4.3.1. Analyse der NCAM-Proteinmengen in Mäusen, die sich in der Allelkombination von NCAM unterscheiden

Um zu untersuchen, in wie weit sich die Gesamt-NCAM-Menge verändert, wenn Mäuse nur ein Allel NCAM besitzen, wurde eine Western-Blot-Analyse mit Gehirnhomogenaten von Geschwistertieren eines Wurfes durchgeführt, die sich in der Allelkombination des NCAM unterscheiden. Um NCAM-Mengen in unterschiedlichen Hirn-Proben vergleichen zu können, wurden in jede Spur der SDS-PAGE identische Proteinmengen aufgetragen, und die Färbung der Blots erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper KD11. Auf der linken Hälfte des Blots der Abbildung 4.22A sind die Ergebnisse der Mäuse zu sehen, die einen vollen Allelsatz beider Polysialyltransferasen besitzen, sich aber in der Anzahl der NCAM-Allele unterscheiden. Im Vergleich zu der Wildtyp-Maus konnte in der ST8SiaII<sup>+/+</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>NCAM<sup>+/-</sup>-Maus ein schwächeres Signal von polysialyliertem NCAM beobachtet werden. Da keine zusätzlichen Banden von nicht-polysialyliertem NCAM im Blot zu detektieren waren, ist die Ursache für diese verminderte Menge an polysialyliertem NCAM die Abnahme der Gesamt-NCAM-Menge. Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse von Endosialidase-behandelten Gehirnhomogenaten konnte die Abnahme der NCAM-Gesamtmenge bestätigt werden. Die Quantifizierung der Signale von NCAM-140 und

NCAM-180 ergab, dass in Mäusen, die nur ein Allel NCAM besitzen, die NCAM-Gesamtmenge im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen um 30% reduziert ist.



**Abbildung 4.22: Vergleich der NCAM-Mengen von Mäusen, die sich in der Anzahl ihrer NCAM-Allele unterscheiden.**

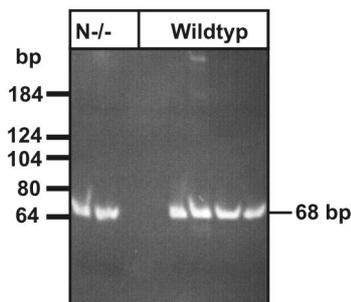
(A) Gehirnllysate von Mäusen (P1), die beide Polysialyltransferase-Allele besitzen und sich nur in der Anzahl der NCAM-Allele unterscheiden und von Mäusen (P1), denen beide Polysialyltransferase-Allele fehlen und sich in der Anzahl der NCAM-Allele unterscheiden, wurden mittels einer 7% SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden 40  $\mu$ g des Gesamtproteins auf jede Spur aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit dem NCAM-spezifischen Antikörper mAk KD11 gefärbt. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit Hilfe von Infrarotfarbstoff gekoppelten zweiten Antikörpern ( $\alpha$ -Maus-IRDye 800), deren Fluoreszenzsignale mit dem *Odyssey*-Gerät von Licor aufgenommen und quantifiziert wurden. Analog wurden in einem weiteren Experiment Aliquots von jeder Gehirnprobe mit Endosialidase (EndoN) behandelt, um PolySia zu entfernen, und um so die Expressionsspiegel von NCAM messen zu können (unterer Western-Blot). Banden, die polysialyliertes NCAM und die unpolysialylierten NCAM-Isoformen NCAM-180 und NCAM-140 repräsentieren, sind durch Pfeile an der rechten Seite der Blots markiert. (B) die Gesamtmenge an NCAM in P1-Gehirnen wurde durch densitometrische Auswertung der Western-Blots der Endosialidase-behandelten Proben mit Hilfe des *Odyssey*-Gerätes von Licor bestimmt. Die Signale der im Wildtyp-Tier gemessenen Werte wurden für jeden Blot als Referenz genutzt und auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Darüber hinaus wurden auf demselben Blot Gehirne von Geschwistertieren untersucht, die sich ebenfalls in der Anzahl der NCAM-Allele unterscheiden, aber keine funktionellen Polysialyltransferase-Allele besitzen (s. Abbildung 4.22, rechte Hälfte des Blots). Mit der Quantifizierung der NCAM-Signale von NCAM-140 und NCAM-180 wurde in ST8SialII<sup>-/-</sup>ST8SialIV<sup>-/-</sup>NCAM<sup>+/-</sup>-Tieren im Vergleich zu Tieren, die den kompletten NCAM-

Allelsatz besitzen, ebenfalls eine Reduzierung der NCAM-Gesamtmenge um 30% festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass unabhängig von der An- oder Abwesenheit der beiden Polysialyltransferasen eine Halbierung der NCAM-Gendosis zu einer Verringerung der Gesamt-NCAM-Menge um 30% führt.

#### 4.3.2. Analyse der NCAM-Transkriptspiegel in heterozygoten NCAM-Knockout-Tieren

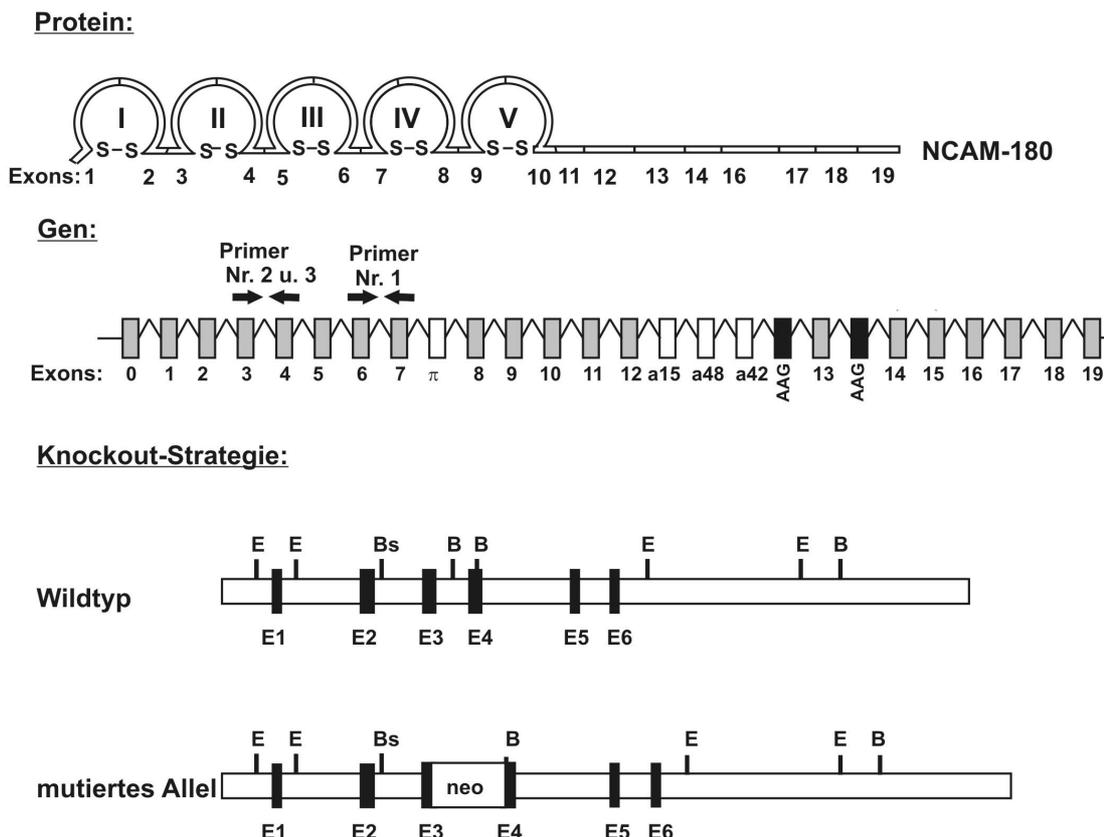
Da die Halbierung der NCAM-Gendosis nur zu einer 30%igen Reduktion der gebildeten Proteinmenge führte, stellte sich die Frage nach der Höhe der NCAM-Transkriptspiegel in heterozygoten NCAM-Knockout-Mäusen. Für die Bestimmung der mRNA-Spiegel mittels qRT-PCR wurde zunächst das NCAM-spezifische Primerpaar (Primerpaar Nr. 1) aus Abschnitt 4.2.5. verwendet. Allerdings wurde in einem Kontrollansatz mit diesem Primerpaar auch in P1-Hirn von NCAM-Knockout-Tieren ein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen (s. Abbildung 4.23) und die gemessenen Ct-Werte lagen im Bereich der Werte, die in den Wildtyp-Proben gemessen wurden ( $Ct_{\text{NCAM}^{-/-}} = 21$ ;  $Ct_{\text{Wildtyp}} = 19$ ).



**Abbildung 4.23:** Analyse der NCAM spezifischen PCR-Produkte einer Real-Time PCR-Messung in Gehirnen von Wildtyp- und  $\text{NCAM}^{-/-}$ -Mäusen.

Es wurden mittels 6% PAGE die PCR-Produkte einer qRT-PCR analysiert, in die cDNA aus Gehirnen von Wildtyp- und der  $\text{NCAM}^{-/-}$ -Mäusen eingesetzt worden war. Als NCAM-spezifische Primer wurde das auch schon in Abschnitt 4.2.4. eingesetzte Primerpaar Nr. 1 benutzt

Dies zeigte, dass trotz des deletierten NCAM-Gens in NCAM-Knockout-Mäusen hohe NCAM-Transkript-Mengen vorliegen. Diese Transkripte sind jedoch nicht funktionell, da die Western-Blot-Analyse gezeigt hatte, dass in diesen Tieren kein NCAM-Protein gebildet wird (s. Abbildung 4.22). Der Nachweis dieser nicht-funktionellen mRNA war mit dem für Exon 6/7 spezifischen Primerpaar möglich, da für die Generierung der NCAM-Knockout-Maus der größte Teil von Exon 3 und ein Teil des Exons 4 durch eine *neo*-Genkassette ersetzt worden war (Cremer *et al.*, 1994). Für die Bestimmung der mRNA-Spiegel in heterozygoten NCAM-Knockout-Mäusen wurden daher Primerpaare gewählt, die in einem Bereich des NCAM-Gens binden, der in der NCAM-Knockout-Maus deletiert wurde.

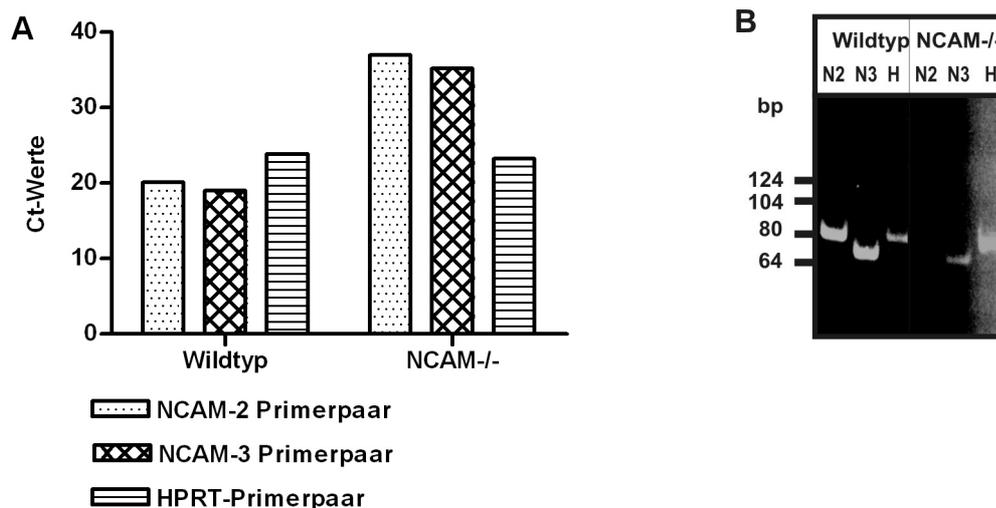


**Abbildung 4.24: Knockout-Strategie von NCAM<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Gen: Genomische Organisation von NCAM in der Maus (s. auch Abbildung 4.12). Die Pfeile geben die Region an, in denen die gegen NCAM spezifischen Primer binden. Primer Nr. 1 = in Abschnitt 4.2.4. eingesetztes Primerpaar, Primer Nr. 2 und Nr. 3 = zwei neue Primerpaare, die in dem deletierten Exonbereich des NCAM-Gens binden. Knockout-Strategie: Teile von Exon 3 und Exon 4 wurden durch ein Neo<sup>r</sup>-Gen ersetzt. Schnittstellen für Restriktionsenzyme: E = EcoRI, B = Bam HI, Bs = BstEII.

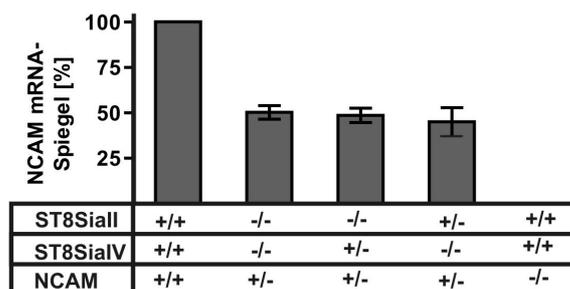
Abbildung 4.24 gibt einen Überblick über die Knockout-Strategie und die Lage der verwendeten Primer. Es wurden vorab zwei mögliche NCAM-Primerpaare (NCAM-Primerpaar 2 und 3), die intronübergreifend an Exon 3 und 4 annealen, in einer Real-Time-PCR-Analyse mit cDNA-Proben aus der Wildtyp- und der NCAM-Knockout-Maus getestet. In Hirnlysaten aus der Wildtyp-Maus wurde mit Primerpaar 2 ein Ct-Wert von 20 und mit Primerpaar 3 ein Ct-Wert von 19 gemessen. Diese Werte liegen in dem Größenbereich, in dem auch Ct-Werte lagen, die mittels der bisher verwendeten Primer in Proben aus Wildtyp-Gehirn gemessen worden waren, s. Abschnitt 4.2.4.. Indessen wurden unter Verwendung dieser beiden neuen NCAM-Primerpaare in Proben aus der NCAM-Knockout-Maus Ct-Werte in einem Bereich von >35 gemessen, was zeigt, dass in diesen Proben keine funktionelle NCAM-mRNA vorliegt (Abbildung 4.25A). Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurden in der Analyse der PCR-Proben der NCAM-Knockout-Maus mittels einer 6%igen PAGE keine bzw. nur sehr schwache Signale der NCAM-PCR-Produkte detektiert. Darüber hinaus

konnte mit Hilfe der Untersuchung der NCAM-PCR-Produkte aus der Wildtyp-Maus auf einem analytischen Gel gezeigt werden, dass beide Primerpaare die erforderliche Spezifität für die Analyse von NCAM-Transkripten aufweisen (s. Abbildung 4.25B). So konnte je Primerpaar nur ein PCR-Fragment nachgewiesen werden, dessen Größe mit der berechneten Amplifikatgröße übereinstimmt (das PCR-Produkt des NCAM-Primerpaar 2 sollte 84 bp und das PCR-Produkt des NCAM-Primerpaar 3 sollte 75 bp betragen). Da dennoch Ergebnisse einer Schmelzkurvenanalysen der PCR-Proben von Primerpaar 2 einen Hinweis für unspezifisch gebildetes PCR-Produkt lieferte (das Ergebnis dieser Analyse ist nicht abgebildet), wurde für weitere Analysen das NCAM-Primerpaar 3 eingesetzt. Die Transkriptmengen von NCAM wurden mit Hilfe der relativen Quantifizierung bestimmt, wobei das HPRT-Gen als Referenzgen verwendet wurde. Für beide Primerpaare konnte eine Amplifikationseffizienz von 2 ermittelt werden (NCAM-Primer 3: 2,008, HPRT: 2,03), so dass sich beide Primer für die relative Quantifizierung eignen.



**Abbildung 4.25: Messung der Ct-Werte von NCAM unter Benutzung neuer NCAM-spezifischer Primerpaare in Wildtyp- und NCAM<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels Real-Time-PCR.**

(A) Es wurden die Ct-Werte von NCAM im Gehirn von perinatalen Wildtyp- und NCAM<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Real-Time-PCR unter Benutzung der Primerpaare, die an Exon 3 und 4 binden (Primerpaar Nr 2 und Nr.3), ermittelt. Dafür wurde cDNA, die aus Wildtyp- und NCAM<sup>-/-</sup>- Gehirnen von perinatalen Mäusen (P1) mittels RT-PCR erhalten worden war, eingesetzt. (B) Die PCR-Produkte wurden anschließend in einer 6% PAGE analysiert. N2 = PCR-Produkt einer PCR, in die NCAM-Primerpaar 2 eingesetzt worden war; N3 = PCR-Produkt einer PCR, in die NCAM-Primerpaar 3 eingesetzt worden war, H = PCR-Produkt einer PCR, in die das HPRT-spezifisches Primerpaar eingesetzt worden war.



**Abbildung 4.26: Relative Transkriptmengen von NCAM in NCAM-heterozygoten Mäusen.**

Die relativen mRNA-Spiegel von NCAM wurden in Gehirnen von perinatalen Mäusen (P1), Wildtyp-Mäusen, NCAM<sup>-/-</sup>-Mäusen und Mäusen mit nur einem Allel NCAM (s. angegebene Genotypen) mittels qRT-PCR bestimmt. Es wurden für jeden Genotyp zwei unabhängig voneinander hergestellte cDNAs in die Messung eingesetzt, und jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Die in der Wildtyp-Maus gemessenen Werte wurden auf 100% gesetzt.

Abbildung 4.26 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung der NCAM-mRNA-Spiegel in heterozygoten NCAM-Knockout-Tieren, die sich in der Allelzusammensetzung beider Polysialyltransferasen unterscheiden. Die Abwesenheit eines NCAM-Allels (NCAM<sup>+/-</sup>) führte zu einer Reduzierung des mRNA-Spiegels um 50%. Dabei konnte eine Gendosis-abhängige Reduzierung der mRNA-Menge für alle untersuchten heterozygoten Genotypen festgestellt werden, unabhängig von der An- oder Abwesenheit der Polysialyltransferasen. Im Gegensatz zu der Analyse der NCAM-Proteinmenge, die zeigte, dass der NCAM-Proteinspiegel in heterozygoten Tieren 70% der NCAM-Menge aus Wildtyp-Tieren entspricht, wurde mit Hilfe der Real-Time-PCR für alle heterozygoten NCAM-Knockout-Tiere eine Halbierung des mRNA-Spiegels beobachtet. Diese Diskrepanz deutet daraufhin, dass die Menge des NCAM-Proteins auch auf Ebene der Translation und/oder der Proteinstabilität reguliert werden kann.

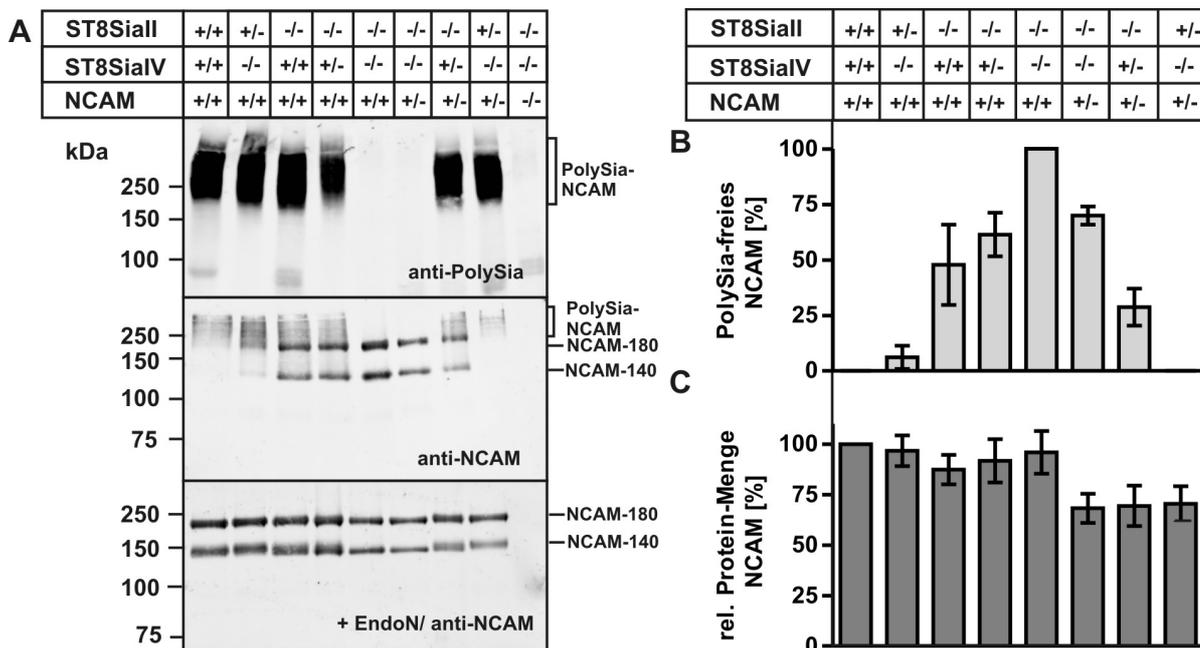
#### 4.3.3. Modifikationen der Menge an polysialyliertem NCAM durch variierende Allelkombinationen von ST8SialII, ST8SialIV und NCAM

Da die vorangegangene Western-Blot-Studie zeigen konnte, dass durch die Halbierung der NCAM-Gendosis auch eine Reduzierung der NCAM-Proteinmenge möglich ist, sollte nun die Menge an polysialyliertem NCAM in Hirnhomogenaten von Mäusen untersucht werden, die sich sowohl in der Allel-Kombination beider Polysialyltransferasen, ST8SialII und ST8SialIV, als auch des NCAM unterscheiden. Diese Mäuse wurden durch geeignete Verpaarung von ST8SialII-, ST8SialIV- und NCAM-Knockout-Mäusen von Dr. Birgit Weinhold in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerardy-Schahn hergestellt. Die Untersuchung der NCAM-Polysialylierung wurde mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung des PolySia-spezifischen mAk 735 und dem für NCAM-140 und NCAM-180 spezifischen mAk KD11 durchgeführt. Da im perinatalen Gehirn der Maus die NCAM-Isoform-120 nicht detektierbar

ist (He *et al.*, 1987), stellt es kein Problem dar, den Antikörper KD11 für die Analyse von NCAM in P1-Hirnen zu benutzen. Die Western-Blot-Analyse der Hirnhomogenate mit mAk 735 ergab für alle Proben außer für die Proben der Mäuse, denen beide Polysialyltransferasen fehlen, ein breites Signal oberhalb von 250 kDa, das charakteristisch für polysialyliertes NCAM ist (Abbildung 4.27A, oberster Blot). Dagegen lieferte die Färbung mit mAk KD11 einen genauen Einblick in die Verteilung von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM (Abbildung 4.27A, mittlerer Blot). Die Signale von PolySia-freiem NCAM-140 und NCAM-180 wurden für jeden Genotyp quantifiziert und aufsummiert. Um die Menge an unpolysialyliertem NCAM in den einzelnen Genotypen miteinander vergleichen zu können, wurde die Summe aus beiden NCAM-Isoform-Signalen auf den Wert der NCAM-Gesamtmenge der Polysialyltransferase-Doppel-Knockout-Maus bezogen. In der Wildtyp-Maus und der Maus mit nur einem Allel ST8SiaII (ST8SiaIV<sup>-/-</sup>ST8SiaII<sup>+/-</sup>NCAM<sup>+/+</sup>) lagen fast alle NCAM-Proteine im polysialylierten Zustand vor. Aufgrund des Verlustes der Polysialyltransferase ST8SiaII in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>-Maus nahm der Anteil an nicht-polysialyliertem NCAM im Vergleich zum Wildtyp zu und konnte mit der Reduzierung der Allelzahl von ST8SiaIV in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>-Maus noch weiter gesteigert werden. So wurde in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus 47% und in der Maus mit nur noch einem Allel ST8SiaIV 61% nicht-polysialyliertes NCAM gemessen. Im Vergleich zu der Polysialyltransferase-Doppel-Knockout-Maus lag in der Maus, in der ebenfalls beide Polysialyltransferasen ausgeschaltet sind und die nur ein Allel NCAM besitzt, wie bereits in Abschnitt 4.3.1. beschrieben, 30% weniger Gesamt-NCAM vor (s. Abbildung 4.27A mittlerer Blot und Abbildung 4.27B). In den Genotypen, die nur ein Allel NCAM und ein Allel ST8SiaIV tragen (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>NCAM<sup>+/-</sup>), wurden nur noch 28% unpolysialyliertes NCAM gemessen, während in Mäusen, die beide NCAM-Allele und nur ein Allel ST8SiaIV besitzen (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>NCAM<sup>+/+</sup>), die Menge an nicht-polysialyliertem NCAM 61% betrug. Es konnte somit gezeigt werden, dass durch die Halbierung der NCAM-Genosis, die Menge an unpolysialyliertem NCAM um mehr als die Hälfte reduziert werden kann.

In allen Genotypen wurde zusätzlich in Endosialidase-vorbehandelten Gehirnllysaten die Gesamt-Proteinmenge des vorliegenden NCAM mittels Western-Blot-Analyse bestimmt (Abbildung 4.27A unterster Blot und Abbildung 4.27C). Unabhängig von der An- oder Abwesenheit von ST8SiaII und ST8SiaIV lagen in Mäusen, die beide NCAM-Allele besitzen, die relativen Proteinmengen von Gesamt-NCAM bei 100% (s. auch Abschnitt 4.1.1.). In NCAM-heterozygoten Mäusen dagegen konnten, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.3.1., nur 70% der Gesamt-NCAM-Menge des Wildtyps gemessen werden.

Hiermit wurde nochmals bestätigt, dass die Expression der NCAM-Proteine unabhängig von der Expression der Polysialyltransferasen reguliert wird.



**Abbildung 4.27: Status der NCAM-Polysialylierung in Mäusen, die sich in der Allelkombination von ST8SialII, ST8SialIV und NCAM unterscheiden.**

(A) Gehirnllysate von Mäusen, die unterschiedliche Kombinationen der Allele beider Polysialyltransferasen, ST8SialII und ST8SialIV, und NCAM besitzen (siehe angegebene Genotypen) wurden mittels einer 7% SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden 20  $\mu$ g des Gesamtproteins jeder Probe in die PAGE eingesetzt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit dem Antikörper gegen PolySia, mAk 735, (oberer Blot) und dem Antikörper gegen NCAM, mAk KD11, (mittlerer Blot) gefärbt. Die Entwicklung der Blots erfolgte mit Hilfe von Infrarotfarbstoff gekoppelten zweiten Antikörpern ( $\alpha$ -Maus-IRDye 800) und dem Odyssey-System von Licor. Analog wurden in einem weiteren Experiment Aliquots von jeder Gehirnprobe mit Endosialidase (EndoN) behandelt, um PolySia zu entfernen, und um so die Expressionsspiegel von NCAM messen zu können (unterer Western-Blot). Banden, die polysialyliertes NCAM und die unpolysialylierten NCAM-Isoformen, NCAM-180 und NCAM-140, repräsentieren, sind an der rechten Seite der Blots markiert. (B) die relative Menge von nicht-polysialyliertem NCAM in den Gehirnen der angegebenen Genotypen wurde über densitometrische Messung der Western-Blots bestimmt, die mit mAk KD11 gefärbt worden waren. Für jeden Genotyp wurden die Intensitäten der fokussierten Banden in Höhe von 140 kDa und 180 kDa des mittleren Western-Blots der Abbildung (A) bestimmt und addiert. Die in jedem Blot gemessenen Werte der Doppel-Knockout-Maus wurden als Referenz benutzt und auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten. (C) die Gesamtmenge von NCAM in diesen Gehirnen wurde durch densitometrische Auswertung der Western-Blots der Endosialidase-behandelten Proben bestimmt (siehe unterer Western-Blot in (A)). Die Signale der im Wildtyp gemessenen Werte wurden für jeden Blot als Referenz genutzt und auf 100% gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus vier unabhängigen Experimenten.

#### 4.3.4. Korrelation der Menge von PolySia-freiem NCAM mit dem Phänotyp

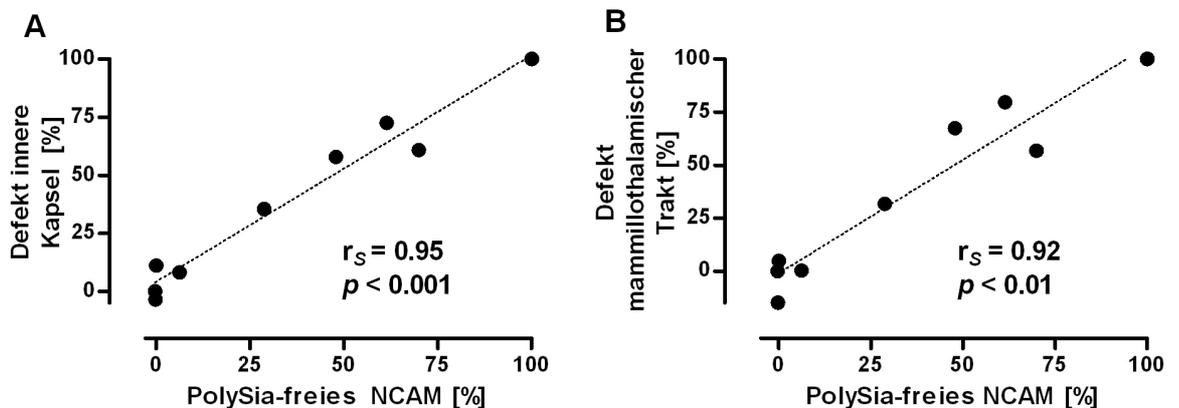
Parallel zu der oben beschriebenen biochemischen Charakterisierung wurden alle in Abbildung 4.21 dargestellten Mauslinien von Prof. Dr. Hildebrandt (Abteilung Zelluläre Chemie in der Medizinischen Hochschule Hannover) phänotypisch analysiert, so dass die ermittelten Mengen an PolySia-freiem NCAM mit dem Ausmaß neurologischer Defekte in diesen Tieren korreliert werden konnten. Da die Polysialyltransferase-Knockout-Maus

Schädigungen der inneren Kapsel, des corticospinalen Traktes, des mammillothalamischen Traktes und der vorderen Kommissur aufwiesen, wurden besonders die morphologischen Veränderungen dieser Fasern betrachtet. In Gehirnschnitten der zu analysierenden Genotypen wurde jeweils die Faserdicke der vier Gehirnhaupfasertrakte gemessen und miteinander verglichen. Dabei wurde die Differenz zwischen dem Durchmesser einer Nervenfasern einer Wildtyp-Maus und dem Durchmesser einer Nervenfasern einer Knockout-Maus als Defekt dieser Nervenfasern definiert. Da die stärksten Defekte dieser Fasern jeweils in der Polysialyltransferase-Doppel-Knockout-Maus vorlagen, wurden die in diesen Mäusen gemessenen Defekte auf 100% gesetzt. Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung dieser Faserdefekte in den neun unterschiedlichen Genotypen. Die Schwere der Defekte nimmt innerhalb der neun Genotypen mit abnehmender Anzahl von Polysialyltransferase-Allelen und gleichbleibender Anzahl von NCAM-Allelen zu. Bemerkenswerterweise konnten in den Genotypen, in denen die Anzahl der Polysialyltransferase-Allele stark reduziert ist, die aber nur ein Allel NCAM besitzen, schwächere Defekte in allen Gehirnfasern beobachtet werden als in den vergleichbaren Genotypen, die noch beide Allele NCAM aufweisen. So wurden im Vergleich zur  $ST8SiaII^{-/-}ST8SiaIV^{-/-}NCAM^{+/+}$ -Doppel-Knockout-Maus ( $ST8SiaII^{-/-}ST8SiaIV^{-/-}NCAM^{+/+}$ ), in der alle Defekte auf 100% gesetzt worden waren, in der Doppel-Knockout-Maus, die nur noch ein Allel NCAM trägt ( $ST8SiaII^{-/-}ST8SiaIV^{-/-}NCAM^{+/-}$ ), eine Reduzierung der Faserdefekte beobachtet. Es wurden in der  $ST8SiaII^{-/-}ST8SiaIV^{-/-}NCAM^{+/-}$ -Maus in der inneren Kapsel nur ein Defekt von 60,8%, im corticospinalen Trakt ein Defekt von 78,8%, im mammillothalamischen Trakt ein Defekt von 56,8% und in der vorderen Kommissur nur noch ein Defekt von 35,9% gemessen. In Mäusen mit nur einem Allel NCAM und einem Allel  $ST8SiaIV$  ( $ST8SiaII^{-/-}ST8SiaIV^{+/-}NCAM^{+/-}$ ) waren die Defekte der einzelnen Fasern noch geringer ausgeprägt, und in Mäusen, die statt einem Allel  $ST8SiaIV$  ein Allel  $ST8SiaII$  besitzen ( $ST8SiaII^{+/-}ST8SiaIV^{-/-}NCAM^{+/-}$ ), konnten in fast allen Fasern, bis auf den corticospinalen Trakt, die Defekte vollständig aufgehoben werden.

Genotypen:									
ST8SiaII	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-
ST8SiaIV	+/+	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
NCAM	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/-	+/-	+/-	-/-
unpolysialyliertes NCAM [%]	0	6,1	47,8	61,4	100	70,0	28,7	-0,27	0
Defekte [%]									
innere Kapsel	0	8,1	57,9	72,5	100	60,8	35,5	-3,5	11,1
mammillothalamischer Trakt	0	0,2	67,4	79,7	100	56,9	31,7	-14,9	4,9
vordere Kommissur	0	1,7	4,8	60,1	100	35,9	2,5	-0,95	14,8
corticospinaler Trakt	0	12,7	54,0	71,2	100	78,8	49,5	42,4	60,0

**Tabelle 4.1: Relative Menge an unpolysialyliertem NCAM [%] und Grad der Defekte [%] unterschiedlicher Gehirnfasertrakte (innere Kapsel, mammillothalamischer Trakt, vordere Kommissur, corticospinaler Trakt) in neun Genotypen, die sich in der Kombination der Allele von ST8SiaII, ST8SiaIV und NCAM unterscheiden.**

Bestimmung der relativen Menge an unpolysialyliertem NCAM [%] siehe Abbildungsunterschrift zu Abbildung 4.27. Die Ermittlung der Gehirnfasertraktdefekte erfolgte in vier bis sechs Wochen alten Tieren, und die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 bis 9 unabhängigen Messungen. Die Differenz zwischen dem Durchmesser einer Nervenfasern einer Wildtyp-Maus und dem Durchmesser einer Nervenfasern einer Knockout-Maus wurde als Defekt dieser Nervenfasern definiert. Die in den Polysialyltransferase-Doppel-Knockout-Mäusen gemessenen Defekte wurden auf 100% gesetzt.



**Abbildung 4.28: Korrelation der Defekte der Gehirnfasertrakte der inneren Kapsel (A) bzw. der mammillothalamischen Faser (B) mit der relativen Menge an nicht-polysialyliertem NCAM.**

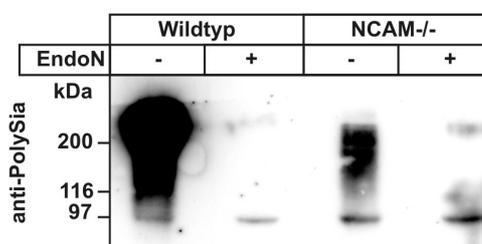
Die Ergebnisse der Quantifizierung von nicht-polysialyliertem NCAM aus Abbildung 4.24 wurden mit den Ergebnissen der Fasertraktdefekte von innerer Kapsel (A) und mammillothalamischer Faser (B) (s. Tabelle 1) in Beziehung gesetzt.  $r_s$  = Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman;  $p$  = statistische Irrtumswahrscheinlichkeit

Der Vergleich der Gehirnfaserdefekte mit der Menge an nicht-polysialyliertem NCAM zeigt, dass die für die jeweiligen Genotypen bestimmten Werte der relativen Faserdefekte mit den relativen Mengen an PolySia-freiem NCAM nahezu übereinstimmen. Es konnte eine lineare Beziehung zwischen den Defekten der Gehirnfasertrakte der inneren Kapsel bzw. des mammillothalamischen Traktes und dem Spiegel an nicht-polysialyliertem NCAM festgestellt werden (s. Abbildung 4.28 A und B), wobei ein Verhältnis von relativem Faserdefekt zu relativem PolySia-freiem NCAM-Spiegel von 1 berechnet wurde. Auf diese Weise konnte ein

direkter Zusammenhang zwischen der Menge an nicht-polysialyliertem NCAM und dem Grad der vorliegenden morphologischen Defekte festgestellt werden.

#### 4.3.5. PolySia in NCAM-defizienten Mäusen

Nach der Untersuchung des Einflusses beider Polysialyltransferasen auf die Polysialylierung von NCAM und der Bedeutung der Menge an PolySia-freiem NCAM auf die Entwicklung bestimmter Gehirnfasern wurden in einer weiteren Studie Hirnhomogenate von Mäusen untersucht, denen das Hauptträgerprotein für PolySia, NCAM, fehlt. Um zu untersuchen, ob und wieviel PolySia in Gehirnen von NCAM-Knockout-Mäusen vorliegt, wurden Gehirne aus perinatalen NCAM<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen isoliert und die Hirnlysate mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Unter Verwendung der in Abschnitt 4.1. und 4.2. verwendeten Methoden, konnte keine PolySia in NCAM-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Homogenisierung der Gehirne und die Western-Blot-Analyse optimiert (s. Abschnitt 3.4.1.). Nach Erweiterung des im Lysepuffer eingesetzten Spektrums an Proteaseinhibitoren und durch Verwendung einer Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) anstelle von Nitrozellulose konnte schließlich PolySia auch in Hirnhomogenaten aus NCAM-Knockout-Mäusen erfolgreich detektiert werden.



**Abbildung 4.29: PolySia in NCAM-defizienten Mäusen.**

Gehirnlysate von perinatalen Wildtyp- und NCAM<sup>-/-</sup>-Mäusen (P1) wurden mittels einer 7% SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden 40 µg des Gesamtproteins jeder Probe eingesetzt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine mit mAk 735 gefärbt. Analog wurden Aliquots der Hirnlysate mit Endosialidase (EndoN) behandelt und in die SDS-PAGE eingesetzt. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit dem Chemilumineszenzverfahren und der Belichtung von Filmen.

Abbildung 4.29 zeigt einen Western-Blot mit Proben aus der Wildtyp- und der NCAM<sup>-/-</sup>-Maus, der mit dem mAk 735 gefärbt wurde. Es konnte in der Probe der NCAM<sup>-/-</sup>-Maus in Höhe von 200 kDa ein eindeutiges Signal von PolySia detektiert werden. Das Verschwinden des Signals nach Inkubation dieser Probe mit Endosialidase belegt ebenfalls, dass es sich hierbei um PolySia handelt. Somit konnte gezeigt werden, dass in der NCAM-Knockout-Maus noch nachweisliche Mengen an PolySia vorliegen.

#### 4.4. Heterologe Expression und Aufreinigung der eukaryontischen Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV

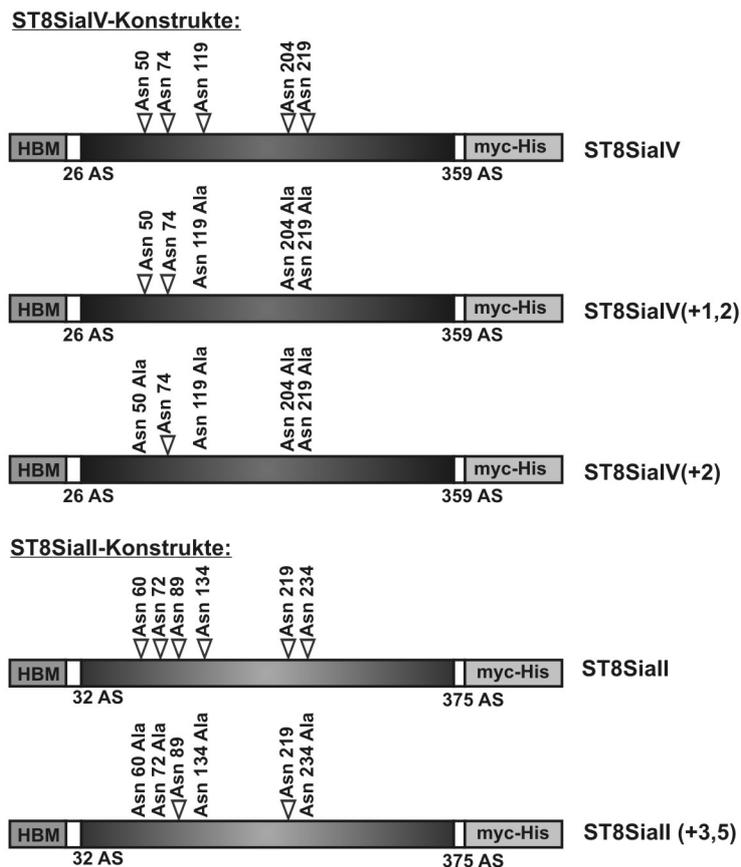
Neben der Aufklärung, welche Rolle beide Polysialyltransferasen in der Polysialylierung von NCAM im Gehirn der Maus spielen, sollten in einem weiteren Projekt die enzymatischen Eigenschaften beider Polysialyltransferasen näher untersucht werden. Beide Enzyme, ST8SiaII und ST8SiaIV, besitzen neben der Fähigkeit NCAM zu polysialylieren auch die Fähigkeit der Autopolysialylierung. Dabei wird PolySia auf N-Glykane des Enzyms übertragen. Mutagenese-Studien haben gezeigt, dass die 2. N-Glykosylierungsstelle der ST8SiaIV und die 3. und 5. N-Glykosylierungsstelle der ST8SiaII entscheidend für die katalytische Aktivität der Polysialyltransferasen sind (Mühlenhoff *et al.*, 2001). So führen Deletionen der 2. N-Glykosylierungsstelle der ST8SiaIV und der 3. und 5. N-Glykosylierungsstelle der ST8SiaII zu drastisch reduzierter Auto- und NCAM-Polysialylierungsfähigkeit (Mühlenhoff *et al.*, 2001), während minimal glykosylierte Formen, die nur noch diese N-Glykosylierungsstellen besitzen (ST8SiaIV(+2) und ST8SiaII(+3,5)), vollständig biologisch aktiv sind. Um die Struktur polysialylierter N-Glykane der beiden Polysialyltransferasen aufzuklären, stellen insbesondere die beiden minimal glykosylierten Polysialyltransferasen ST8SiaIV+2 und ST8SiaII+3,5 ideale Ausgangsformen dar.

Vorrangiges Ziel dieser Studie war es, ausreichend Material für eine weitergehende N-Glykan-Analyse beider Polysialyltransferasen zu produzieren. Dafür sollten sowohl vollständig glykosylierte als auch minimal glykosylierte Polysialyltransferasen als lösliche Proteine exprimiert und anschließend aufgereinigt werden. In detaillierten Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerardy-Schahn war die Produktion von rekombinanten eukaryontischen Polysialyltransferasen bereits in einer Reihe von Expressionssystemen getestet worden. Da N-Glykosylierung für die Aktivität der Enzyme entscheidend ist, lieferte die bakterielle Expression kein aktives Protein. Allerdings konnten in Säuger- und Insektenzellen (CHO- und *Sf9*-Zellen) rekombinante lösliche Formen von beiden Polysialyltransferasen exprimiert werden. Da die Expression in Insektenzellen aus *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) besonders hohe Ausbeuten der löslichen und aktiven Polysialyltransferasen lieferte, wurde in der folgenden Studie dieses Expressionssystem verwendet.

---

#### 4.4.1. Herstellung von N-Glykosylierungsvarianten von ST8SiaII und ST8SiaIV mit C-terminalem Myc-His-Tag und deren Expression in *Sf9*-Insektenzellen

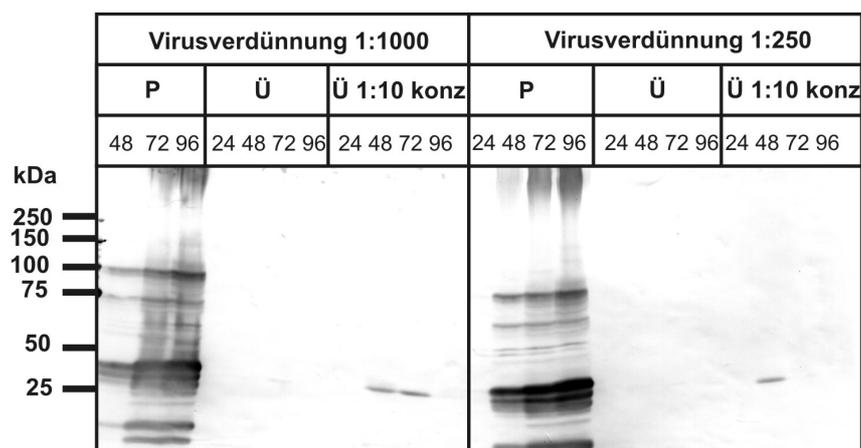
Zur Expression rekombinanter Polysialyltransferasen in Insektenzellen wurde das „*BAC-TO-BAC*-System“ der Firma Invitrogen verwendet. Dabei wird das zu exprimierende Konstrukt über ein Transferplasmid in ein Bacmid eingebracht, welches zur Produktion rekombinanter Baculoviren in *Sf9*-Zellen transfiziert wird (s. Methodenteil, Abschnitt 3.2.4. und 3.2.5.). Abbildung 4.30 gibt einen Überblick über die hergestellten Konstrukte. Es wurden N-terminal um 25 bzw. 31 AS verkürzte Varianten von ST8SiaII und ST8SiaIV generiert, denen die Transmembrandomäne fehlt, um eine lösliche Expression dieser Proteine zu ermöglichen. N-terminal wurde die Sequenz des „*honey bee mellitin*“- (HBM)-Sekretionssignal angefügt, mit dessen Hilfe die hergestellten Enzyme ins Kulturmedium sekretiert werden. Um Detektion und affinitätschromatografische Aufreinigung zu ermöglichen, wurde an das C-terminale Ende der Polysialyltransferasen ein Myc-Epitop und eine Hexahistidin-Sequenz fusioniert. Da sowohl die N-Glykosylierungsvarianten (ST8SiaIV(+2), ST8SiaIV(+1,2) und ST8SiaSiaII(+3,5)) als auch die vollständig glykosylierten Polysialyltransferasen aufgrund vorangegangener Studien (Mühlenhoff *et al.*, 2001) in Vektoren für die Expression in Säugerzellen vorlagen, konnten Transferplasmide der geplanten Konstrukte mit Hilfe von PCR und Umklonierungsstrategien hergestellt werden.



**Abbildung 4.30: Überblick über die fünf hergestellten Polysialyltransferase-Varianten.**

Die Dreiecke stellen die N-Glykane dar. Die Länge der Polysialyltransferasesequenzen ist unterhalb der Balken angegeben. HBM = *honey bee melittin signal*, Myc-His = Sequenz für das Myc-Epitop und die Hexahistidin-Sequenz. Aminosäureaustausche sind durch AS X AS dargestellt. So gibt zum Beispiel Asn60Ala den Aminosäureaustausch an der Position 60 von Asparagin durch Alanin an.

Nach Generierung der Baculoviren wurden zunächst die optimalen Expressionsbedingungen der ST8SialII- und der ST8SialIV-Varianten in *Sf9*-Insektenzellen getestet. Dabei wurde insbesondere der Einfluss von unterschiedlichen Virusverdünnungen und von unterschiedlichen Inkubationszeiten der infizierten Insektenzellen auf die Expression des rekombinanten Proteins untersucht. Der Test der Expressionsbedingungen wurde wie in Abschnitt 3.2.7. beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Proben wurden mittels Western-Blot-Analyse untersucht.



**Abbildung 4.31:** Western-Blot-Analyse einer Testexpression des Konstruktes ST8SiaII(+3,5) in *Sf9*-Insektenzellen.

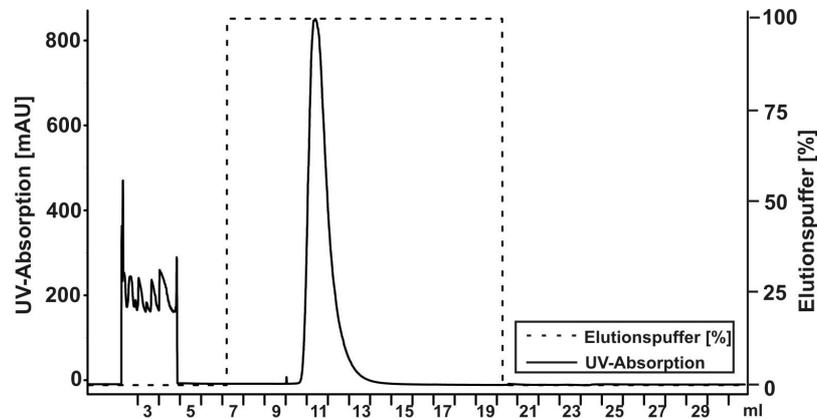
Es wurden jeweils 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach der Infektion einer Insektenzellkultur ( $2 \cdot 10^6$ -Zellen/ml) mit einem P3-Virusstocks (1:250 oder 1:1000) des Konstruktes ST8SiaII(+3,5) 1 ml Aliquots entnommen. Jede dieser Proben wurde in Zellkulturüberstand (= Ü) und Zellfraktion (= P) getrennt, und ein Teil des Überstandes wurde mit Hilfe einer TCA-Fällung 1:10 (= Ü 1:10) ankonzentriert. Es wurden je 10  $\mu$ l dieser in 2x Laemmli aufgenommenen Proben in eine 10% SDS-PAGE eingesetzt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurden die Proteine mit einem anti-Penta-His-Antikörper gefärbt.

Abbildung 4.31 zeigt als Beispiel die Western-Blot-Analyse der Testexpression der Variante ST8SiaII(+3,5). Die Expression konnte sowohl in einer Kultur, die mit einer Virusverdünnung von 1:1000 infiziert worden war, als auch in einer Kultur, die mit einer 1:250-Verdünnung des rekombinanten Virus infiziert worden war, im Western-Blot nach 48 h bis 72 h nachgewiesen werden. Allerdings wurde in beiden Fällen erst nach Konzentrierung des Überstandes sekretiertes Protein detektiert. Dabei führte der Einsatz der höheren Virusverdünnung zu einer größeren Menge an lösliches rekombinantes Protein. Darüber hinaus sind in den Proben der Zellfraktion deutliche Signale sichtbar, die auf größere Mengen von intrazellulär verbliebenen Protein und Proteinfragmenten hinweisen. Auf diese Weise wurden für jede der fünf Proteinvarianten die optimalen Expressionsbedingungen ermittelt. Diese entsprachen für alle Konstrukte einer Virusverdünnung des jeweiligen P3-Virusstocks von 1:1000 und einer Inkubationsdauer von 72 h.

#### 4.4.2. Aufreinigung der N-Glykosylierungsvarianten der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV mit Hilfe einer 9E10-Säule

Die Expression der Polysialyltransferasen in Insektenzellen und die anschließende affinitätschromatografische Aufreinigung wurde wie in Abschnitt 3.4.10. beschrieben durchgeführt. Dabei wurde die Bindung des C-terminalen Myc-Epitops an eine mit anti-Myc Antikörper (mAk 9E10) beladene Matrix zur säulenchromatographischen Aufreinigung genutzt. Für die präparativen Ansätze wurde jeweils 1 l-Insektenzellkulturen mit den entsprechenden rekombinanten Baculoviren infiziert. Die Ernte der enzymhaltigen

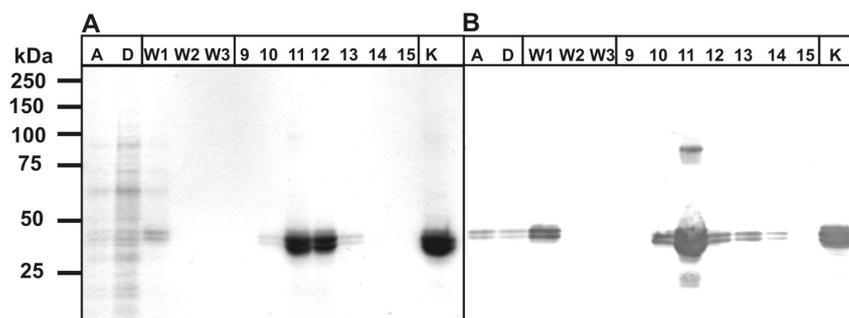
Insektenzellkulturüberstände erfolgte für alle Enzyme nach 72 h. Abbildung 4.32 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil der Affinitätschromatografie für die vollglykosylierte Variante von ST8SiaII.



**Abbildung 4.32:** Elutionsprofil einer Affinitätschromatografie der rekombinant hergestellten ST8SiaII.

Es wurde 1 Liter einer Insektenzellkultur ( $2 \cdot 10^6$ -Zellen/ml) mit P3-Virusstock des vollständig glykosylierten Konstruktes von ST8SiaII (HBM-ST8SiaII(Ile32-Thr375)-MycHis) infiziert. Nach 72 h wurde der Überstand der Insektenzellkultur geerntet und für 16 h bei  $4^\circ\text{C}$  an eine mit dem anti-Myc mAk (9E10)-gekoppelte Sepharose-Säule angelagert. Die Säule wurde mit folgenden Waschpuffern gewaschen: Waschpuffer I (20 mM Natriumphosphatpuffer, 0,5 M Natriumchlorid pH 7,5), Waschpuffer II (20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0) und Waschpuffer III (20 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,3). Die Elution erfolgte mit Hilfe eines 100 mM Glycin-Puffers pH 2,7 unter Messung der UV-Absorption und der Leitfähigkeit. Es wurden Fraktionen à 1 ml aufgefangen. Die im Diagramm aufgeführten Milliliter entsprechen den aufgefangenen Fraktionen.

Nach Beginn der Elution wurde jeweils nur ein Proteinpeak detektiert, dessen Fraktionen aufgefangen und vereinigt wurden. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes des Elutionspuffers, (pH 2,7) wurde der pH-Wert der Proteinfraktion sofort auf pH 6,8 eingestellt. Schließlich wurde das aufgereinigte Protein aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Nach der Aufreinigung wurden Proben der Auftragslösung, des Durchlaufs, der Waschfraktionen sowie der Peakfraktionen auf einem Coomassie-Gel und einem Western-Blot analysiert (s. Abbildung 4.33). Die Peakfraktionen 10 - 12 zeigen deutliche Signale des ST8SiaII-Proteins, wobei der Hauptteil des Proteins in Fraktion 11 nachgewiesen werden konnte. Das Signal des ST8SiaII-Proteins erscheint als Doppelbande, was auf unterschiedlich glykosylierte Formen dieses Enzyms hindeutet. Das Coomassie-Blau-gefärbte Gel verdeutlicht, dass die Polysialyltransferase über den affinitätschromatografischen Schritt nahezu homogen aufgereinigt werden konnte. Da allerdings in der Waschfraktion 1 und im Durchlauf noch Banden zu detektieren waren, war vermutlich die Säulenkapazität bereits überschritten.



**Abbildung 4.33: SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) der über Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfractionen der vollglykosylierten Variante von ST8SiaII.**

Es wurden je 50  $\mu\text{l}$  von den Auftrags- (A)-, Durchlauf (D)-, Waschfraktionen (W1-W3), dem aufgereinigten und ankonzentrierten Protein (K) und den mittels FPLC erhaltenen Proteinfractionen (9 -15) entnommen und mit Laemmli-Puffer versetzt. Je 10  $\mu\text{l}$  dieser Proben wurde für eine 10% SDS-PAGE eingesetzt. Es wurden zwei SDS-PAGE durchgeführt. Mit einem Gel wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt, und das zweite Gel wurde für eine Western-Blot-Analyse verwendet. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte die Färbung der Proteine mit dem mAk 9E10.

Mit der gleichen Methode wurden alle fünf Polysialyltransferasekonstrukte aus Insektenzellmedium aufgereinigt. Tabelle 4.2 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Ausbeuten.

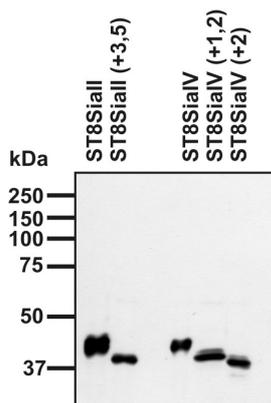
Protein	Menge an aufgereinigtem Protein [ $\mu\text{g/l}$ ]
ST8SiaII	720
ST8SiaII(+3,5)	90
ST8SiaIV	450
ST8SiaIV(+1,2)	90
ST8SiaIV(+2)	160

**Tabelle 4.2: Übersicht über die Ausbeuten der fünf aufgereinigten Polysialyltransferase-Varianten.**

Die Expression der Polysialyltransferasen erfolgte im 1-Liter Maßstab in *Sf9*-Insektenzellen und die Aufreinigung affinitätschromatographisch mit Hilfe einer mAk 9E10-gekoppelten Sepharose-Säule (s. auch Abbildungsunterschrift von Abbildung 4.32).

Der Vergleich der Aufreinigungsergebnisse aller fünf Proteine verdeutlicht, dass die Ausbeute an minimal glykosylierten Polysialyltransferasen um ein Vielfaches geringer als im Falle der vollglykosylierten Enzyme war. So konnte zum Beispiel im Gegensatz zu der vollglykosylierten ST8SiaII von dem ST8SiaII(+3,5)-Protein nur eine 8-fach kleinere Menge aufgereinigt werden.

Abschließend wurde die Reinheit aller fünf Polysialyltransferase-Varianten mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert (Abbildung 4.34). Für alle aufgereinigten Enzyme konnten neben den Enzymbanden keine weiteren Proteinbanden detektiert werden. Somit konnten unter Verwendung eines affinitätschromatografischen Aufreinigungsschritts alle Enzyme homogen dargestellt werden.



**Abbildung 4.34: Silbergel der mit Hilfe von Affinitätschromatographie aufgereinigten Polysialyltransferase-Varianten.**

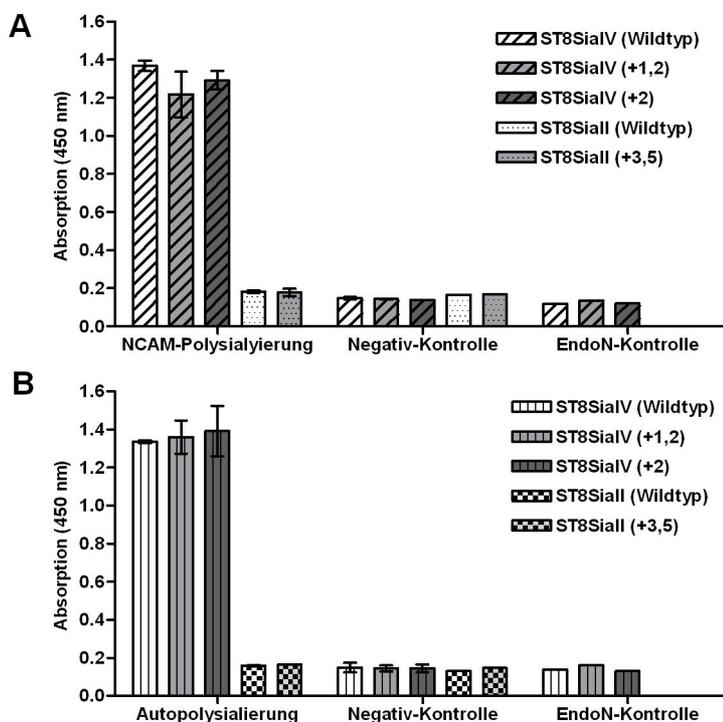
Alle fünf Polysialyltransferase-Varianten wurden in Insektenzellen exprimiert und mittels 9E10-Affinitätschromatografie aufgereinigt. Es wurden 300 ng von jedem aufgereinigtem Protein über eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde mittels Silberfärbung entwickelt.

#### 4.4.3. Überprüfung der Aktivität der fünf Polysialyltransferasevarianten mit Hilfe eines ELISA-basierten Aktivitätstests

Die aufgereinigten Enzyme wurden mittels eines ELISA-basierten Aktivitätstests auf ihre Aktivität untersucht. Dieser Test ermöglicht es, Autopolysialylierung getrennt von NCAM-Polysialylierung zu messen. Zur Analyse der NCAM-Polysialylierung werden sowohl die Enzyme also auch NCAM an Mikrotiterplatten gebunden, wohingegen zur Analyse der Autopolysialylierung ausschließlich die Enzyme angelagert wurden. Die Durchführung dieses Aktivitätstests ist in Abschnitt 3.4.11. im Detail beschrieben.

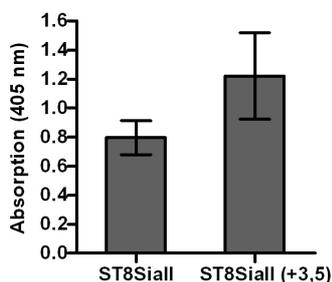
Abbildung 4.35 zeigt die gemessenen NCAM- und Autopolysialylierungsaktivitäten der fünf Polysialyltransferase-Varianten. Im Falle von ST8SiaIV konnten sowohl für die vollständig glykosylierten als auch für die minimal glykosylierten Formen NCAM- und Autopolysialylierungsaktivität nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Endosialidase-Kontrolle konnte zusätzlich bestätigt werden, dass PolySia von allen drei ST8SiaIV-Enzymen gebildet worden war. Im Gegensatz hierzu konnte für keine der beiden ST8SiaII-Varianten NCAM- oder Autopolysialylierungsaktivität nachgewiesen werden. Da in dem eingesetzten Aktivitätstest die Enzyme über das C-terminale Hexahistidin-Epitop an die Mikrotiterplatte angelagert werden, besteht die Möglichkeit, dass die Aktivität von ST8SiaII durch die Fixierung beeinträchtigt wird. Um dies zu überprüfen, wurde eine modifizierte Testvariante durchgeführt, bei dem der Akzeptor NCAM an die Platte angelagert und das Enzym löslich zugegeben wird. (s. Methoden, Abschnitt 3.4.11.). Dementsprechend kann über diesen Test nur NCAM-Polysialylierungsaktivität nicht aber Autopolysialylierung gemessen werden. Abbildung 4.36 zeigt die Ergebnisse des modifizierten Aktivitätstest. Unter den verwendeten

Bedingungen konnte für beide ST8SiaII-Varianten eindeutig NCAM-Polysialylierungsaktivität nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass auch die gereinigte minimal glykosylierte Form von ST8SiaII enzymatisch aktiv ist.



**Abbildung 4.35:** ELISA-basierter Aktivitätstest der fünf Polysialyltransferase-Varianten auf (A) NCAM-Polysialylierungsaktivität und auf (B) Auto-Polysialylierungsaktivität.

Die aufgereinigten Proteine der fünf Polysialyltransferase-Varianten wurden in einem ELISA-basierten Aktivitätstest auf (A) NCAM-Polysialylierungsaktivität und (B) Auto-Polysialylierungsaktivität getestet. Es wurde eine ELISA-Platte mit dem anti-Penta-His-Antikörper beschichtet. An diese Platte wurden jeweils 1 µg der aufgereinigten ST8SiaII und ST8SiaIV Varianten angelagert. Um NCAM-Polysialylierung messen zu können, wurde eine lösliche Form des NCAM mit N-terminalem Protein A-Fusionsanteil ebenfalls an die ELISA-Platte gelagert. Der Polysialyltransferase-Test erfolgte wie in Abschnitt 3.4.11. beschrieben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.



**Abbildung 4.36:** ELISA-basierter Aktivitätstest der ST8SiaII-Varianten auf NCAM-Polysialylierungsaktivität.

An eine mit IgG-beschichtete ELISA-Platte wurde NCAM mit N-terminalem Protein A-Fusionsanteil angelagert. Eine Anlagerung der Enzyme an die Platte erfolgte in diesem Test nicht. Stattdessen wurden je 1 µg der aufgereinigten ST8SiaII-Varianten in Lösung zusammen mit dem Substrat in den Test eingesetzt. Der Polysialyltransferase-Test wurde, wie in Abschnitt 3.4.11. beschrieben, durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

## 5. Diskussion

### 5.1. Rolle der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV für die NCAM-Polysialylierung im perinatalen Maushirn

Die charakteristischen Hirndefekte der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Mäuse (Eckhardt *et al.*, 2000; Angata *et al.*, 2004) sowie die postnatale Letalität von Mäusen, die aufgrund des Ausschaltens beider Polysialyltransferase-Gene keine PolySia mehr besitzen (Weinhold *et al.*, 2005; Angata *et al.*, 2007) verdeutlichen die außerordentliche Bedeutung der PolySia in der postnatalen Entwicklung der Maus. Obwohl PolySia eine Schlüsselstellung in der Regulation NCAM-vermittelter Interaktionen einnimmt, wurde der Beitrag, den jede einzelne Polysialyltransferase zur NCAM-Polysialylierung leistet, *in vivo* bislang nicht untersucht. Unter Verwendung von neun unterschiedlichen Mauslinien, die sich nur in der Zahl der funktionellen Polysialyltransferase-Allele unterscheiden, konnte in der hier vorgelegten Studie erstmals gezeigt werden, dass das Verhältnis von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM maßgeblich durch die Expressionshöhe von ST8SiaII bestimmt wird. Obwohl mehrere voneinander unabhängige *in vitro*-Studien darauf hindeuteten, dass ST8SiaII die weniger effiziente Polysialyltransferase ist (Kojima *et al.*, 1996; Angata *et al.*, 2000; Kitazume-Kawaguchi *et al.* 2001; Angata *et al.*, 2002), konnte mit Hilfe dieser *in vivo*-Studie demonstriert werden, dass in der perinatalen Phase ST8SiaII essentiell ist, um den gesamten NCAM-Pool des Hirns in der polysialylierten Form zu halten. An P1 führt der Verlust von ST8SiaII zu einem Anstieg des Anteils an nicht-polysialyliertem NCAM von 0% auf 45% in ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8Sia<sup>+/+</sup>- und von 0% auf 70% in ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8Sia<sup>+/-</sup>-Mäusen. Im Gegensatz dazu reicht die Anwesenheit von nur einem funktionellen ST8SiaII-Allel aus, um auch in Abwesenheit von ST8SiaIV (ST8SiaII<sup>+/+</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>) fast 95% des NCAM-Pools zu polysialylieren. Die Ursache für diese beachtliche Diskrepanz in der NCAM-Polysialylierungsfähigkeit der beiden Enzyme liegt nicht in unterschiedlichen räumlichen Expressionmustern begründet, da im perinatalen Hirn von ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout Tieren das gleiche ubiquitäre PolySia-Expressionsmuster wie im Wildtyp-Hirn gefunden wurde (Galuska *et al.*, 2006). Somit müssen die Unterschiede in ungleichen Enzymspiegeln oder unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften begründet sein. Frühere Daten, die auf Northern-Blot Analysen beruhen, deuteten darauf hin, dass in der Perinatalphase die mRNA-

Menge von ST8SiaII die von ST8SiaIV um ein Vielfaches übersteigt (Kurosawa *et al.*, 1997; Hildebrandt *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998). Wie jedoch schon von Ong und Mitarbeitern hervorgehoben wurde, besitzen ST8SiaII-spezifische Hybridisierungssonden einen wesentlich höheren G/C-Gehalt als ST8SiaIV-spezifische Sonden, so dass Northern-Blot-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen zu einer deutlichen Überschätzung der ST8SiaII-Transkriptmengen führen (Ong *et al.*, 1998). Um diese Problematik zu umgehen, wurde in dieser Arbeit qRT-PCR verwendet, um die mRNA-Spiegel beider Enzyme zu bestimmen. Auf diesem Wege konnte erstmals gezeigt werden, dass im perinatalen Maushirn die ST8SiaII-Transkriptmenge den ST8SiaIV-mRNA-Spiegel maximal um den Faktor 2 übersteigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines ST8SiaII-Allels zu einer Halbierung der ST8SiaII-mRNA führt, so dass zum Zeitpunkt P1 ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>- und ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>-Tiere identische Polysialyltransferase mRNA-Spiegel aufweisen. Dennoch lag der Anteil des polysialylierten NCAMs in Tieren mit nur einem Allel ST8SiaII (ST8SiaII<sup>+/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>) um fast 50% über dem der Tiere mit zwei Allelen ST8SiaIV (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/+</sup>). Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei gleicher Transkriptmenge aufgrund ungleicher mRNA-Stabilitäten unterschiedliche Enzymmengen gebildet werden, jedoch unterstützen *in vitro*-Befunde die Vermutung, dass der Grund für die unterschiedlichen Polysialylierungsfähigkeiten von ST8SiaII und ST8SiaIV auf Unterschieden in ihren kinetischen Eigenschaften beruht. So wurde in Übereinstimmung mit dem *in vivo*-Befund, dass ST8SiaII eine höhere NCAM-Polysialylierungskapazität besitzt, ein 3-fach geringerer NCAM-*Km*-Wert für dieses Enzym gegenüber ST8SiaIV bestimmt (Kitazume-Kawaguchi *et al.*, 2001).

Die besondere Bedeutung von ST8SiaII für die NCAM-Polysialylierung wurde auch über die Quantifizierung der Gesamt-PolySia-Mengen deutlich, die in Kooperation mit Dr. Hildegard Geyer (Biochemisches Institut, Fachbereich Medizin, Universität Gießen) durchgeführt wurde. Während das Fehlen von ST8SiaIV zu keiner Veränderung des PolySia-Spiegels führte, wurde in ST8SiaII-Knockout Tieren eine Reduzierung um fast 40% beobachtet, die mit einem Anstieg der Menge an nicht-polysialyliertem NCAM von 0% auf 45% einherging. Im klaren Gegensatz zu der *in vitro* gemachten Beobachtung, dass ST8SiaII und ST8SiaIV zusammen eine größere PolySia-Menge bilden als sich durch Aufsummieren der individuell gebildeten Mengen ergibt (Angata *et al.*, 1998; Angata *et al.*, 2002), konnte ein solcher synergistischer Effekt in Bezug auf die Gesamt-PolySia-Menge *in vivo* nicht beobachtet werden. Allerdings ergaben neueste Analysen der polysialylierten N-Glykane des NCAM aus Wildtyp-, ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Mäusen, dass an Glykanen der

5. N-Glykosylierungsstelle die Menge an langen PolySia-Ketten in Gegenwart beider Polysialyltransferasen höher ist (Galuska *et al.*, 2007).

Weitere Unterschiede zwischen Daten aus *in vivo*- und *in vitro*-Studien wurden bei den von ST8SiaII und ST8SiaIV gebildeten Kettenlängen beobachtet (Galuska *et al.*, 2006). Eine parallel zu dieser Arbeit durchgeführte Analyse der PolySia-Kettenlängen in P1-Hirnen von ST8SiaII- und ST8SiaIV-Knockout-Mäusen ergab, dass beide Polysialyltransferasen in der Lage sind, PolySia-Polymere mit einer Kettlänge von bis zu 50 Neu5Ac-Resten zu synthetisieren (Galuska *et al.*, 2006), wohingegen *in vitro*-Daten klare Unterschiede in den von ST8SiaII und ST8SiaIV synthetisierten PolySia-Ketten gezeigt hatten (Kitazume-Kawaguchi *et al.*, 2001; Angata *et al.*, 2002). Die unterschiedlichen Resultate von *in vivo*- und *in vitro*-Befunden verdeutlichen, dass die korrekte Funktion der Enzyme von ihrer zellulären Umgebung abhängt. In allen *in vitro*-Studien wurden lösliche Enzyme verwendet, denen die Transmembrandomäne fehlt, mit der sie in der Zelle in der Golgi-Membran verankert sind. Da neu synthetisiertes NCAM während des intrazellulären Transports zur Zelloberfläche ebenfalls in der Golgi-Membran verankert ist, spielt die Befestigung von Enzym und Akzeptor an der Golgi-Membran und die daraus entstehende räumliche Nähe offensichtlich eine wichtige Rolle für die Prozessivität und andere kinetische Eigenschaften der beiden Polysialyltransferasen.

Der Befund, dass die in ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen gefundenen PolySia-Mengen zusammen genommen die PolySia-Menge im Wildtyp-Hirn deutlich übersteigt, deutet darauf hin, dass beide Polysialyltransferasen die Fähigkeit besitzen, das Fehlen des jeweiligen anderen Enzyms in einem gewissen Umfang zu kompensieren. Die Quantifizierung der Polysialyltransferase-Transkriptspiegel ergab, dass der vollständige Verlust einer Polysialyltransferase nicht durch einen erhöhten mRNA-Level der zweiten Polysialyltransferase ausgeglichen wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der ST8SiaIV durch ST8SiaII besser ausgeglichen wird als umgekehrt. *In vitro* wurde die Beobachtung gemacht, dass die Übertragung von PolySia auf NCAM durch ST8SiaIV effizienter erfolgt, wenn eine der N-Glykanstellen des NCAM-Moleküls bereits PolySia trägt und dass ST8SiaIV PolySia-Ketten verlängern kann, die zuvor von ST8SiaII synthetisiert worden sind (Angata *et al.*, 2002). Entsprechend sollte der Verlust von ST8SiaII einen größeren Einfluss auf die NCAM-Polysialylierung haben als umgekehrt, was genau mit den in dieser Arbeit gemachten *in vivo*-Befunden übereinstimmt.

Die Beobachtung, dass der Verlust einer Polysialyltransferase durch das zweite Enzym partiell kompensiert wird, spiegelt sich im milden Phänotyp der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Einzel-Knockout-Tiere wider. Überlappende Funktionen der beiden Enzyme wurden zum Beispiel bei der tangentialen Migration von Neuroblasten von der SVZ in den olfaktorischen Bulbus beobachtet. In beiden Einzel-Knockout-Mäusen ist diese Struktur noch polysialyliert und es wurden im Gegensatz zur ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus keine morphologischen Veränderungen beobachtet (Eckhardt *et al.*, 2000; Angata *et al.*, 2004). Auf der anderen Seite verdeutlichen die unterschiedlichen Phänotypen der beiden Einzel-Knockout-Mäuse, dass beiden Polysialyltransferasen individuelle Funktionen zukommen. So führt der Verlust von ST8SiaII im Hippocampus zu defaszikulierten Moosfasern und ectopischer Synaptogenese, obwohl die betroffenen Nervenfasern noch PolySia-positiv sind (Angata *et al.*, 2004). Dies bedeutet, dass die durch ST8SiaIV synthetisierte PolySia die Faserdefekte nicht verhindern kann. Konform mit diesen Befunden konnten in dieser Arbeit signifikante Veränderungen der NCAM-Polysialylierung im perinatalen Gehirn der ST8SiaII-Knockout-Maus festgestellt werden. So wurde eine Reduktion der PolySia-Menge um fast 40% festgestellt, die mit einer Verschiebung des Anteils an nicht-polysialylierten NCAMs von 0% auf 45% einherging. Im Gegensatz dazu wird der Verlust von ST8SiaIV im perinatalen Maushirn fast vollständig kompensiert. So wurde keine Veränderung im PolySia-Spiegel beobachtet, und fast alle NCAM-Moleküle lagen polysialyliert vor. Nur im Erwachsenenalter, wenn ST8SiaII und ST8SiaIV unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen, führt der Verlust von ST8SiaIV zu einem Phänotyp der durch veränderte synaptische Plastizität in der CA1-Region des Hippocampus charakterisiert ist (Eckhardt *et al.*, 2000).

## **5.2. Beitrag der Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV zur NCAM-Polysialylierung während der postnatalen Hirnentwicklung der Maus**

Die ersten drei Wochen der postnatalen Hirnentwicklung der Maus sind durch eine schnelle Zunahme der Hirngröße und einer neuen Neurogenese-Welle charakterisiert, in der eine riesige Zahl an Interneuronen gebildet wird, die für den cerebellaren Cortex, den Hippocampus und den olfaktorischen Bulbus bestimmt sind (Hatten, 1999). Darüber hinaus setzt in diesem Zeitraum die Proliferation von Gliazellen, die neuronale Reifung von Axonen und Dendriten sowie die Myelinisierung von Nervenzellen ein (Benjamins *et al.*, 1972). Mit Beendigung dieser bedeutenden morphogenetischen Prozesse ist ein starker Abfall der

---

PolySia-Menge und der Wechsel von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM verbunden (Edelman und Chuong, 1982; Rothbard *et al.*, 1982). Um die Rolle der beiden Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV während dieser wichtigen Phase der postnatalen Hirnentwicklung zu analysieren, wurde die NCAM-Polysialylierung zu verschiedenen Zeitpunkten der frühen postnatalen Hirnentwicklung sowie im adulten Hirn von Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen vergleichend analysiert. In allen drei Genotypen wurden die entwicklungsabhängigen Veränderungen (1.) der PolySia-Menge, (2.) der Polysialyltransferase mRNA-Spiegel, (3.) der NCAM-Expression und Isoform-Verteilung und (4.) des NCAM-Polysialylierungsstatus untersucht.

So konnte erstmals nachgewiesen werden, dass im Wildtyp-Gehirn die PolySia-Biosynthese während der ersten neun postnatalen Tage mit dem Gehirnwachstum Schritt hält, und in diesem Zeitraum nahezu alles NCAM im polysialylierten Zustand vorliegt. Dabei ist die PolySia hauptsächlich an die NCAM-Isoformen NCAM-180 und NCAM-140 gebunden, deren Expressionshöhe innerhalb der ersten drei Wochen nahezu konstant bleibt. Ein signifikanter Abfall der PolySia ereignet sich erst ab P9 und der dramatische postnatale Abfall des PolySia-Spiegels um etwa 70% erfolgt innerhalb einer Woche im Zeitfenster P9 bis P17.

Der Verlust von ST8SiaII führt zu ausgeprägten Veränderungen im Zeitverlauf des postnatalen PolySia-Abfalls. Hier fällt der PolySia-Spiegel direkt nach der Geburt ab und erreicht bereits an P9 einen Wert, der in Wildtyp-Hirnen erst an P17 erreicht wird. Dieser vorzeitige Abfall der PolySia-Menge korreliert mit einem vorzeitigen Wechsel von der polysialylierten zur nicht-polysialylierten Form des NCAMs. Dies hat zur Folge, dass in ST8SiaII-defizienten Tieren bereits in der ersten postnatalen Woche große Mengen nicht-polysialyliertes NCAM vorliegen, einem Zeitfenster in dem in Wildtyp-Hirnen noch nahezu alle NCAM-Moleküle polysialyliert sind. Die in ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachteten dramatischen Veränderungen sind jedoch temporärer Natur und bleiben auf die ersten zwei Wochen beschränkt. Damit fallen sie jedoch genau in ein wichtiges Zeitfenster der Hippocampus-Entwicklung, die in der ersten postnatalen Woche durch starke phänotypische Veränderungen charakterisiert ist (Mody *et al.*, 2001). Entsprechend führt das Fehlen von ST8SiaII zu Defekten in dieser Hirnregion (Angata *et al.*, 2004), wodurch verdeutlicht wird, wie wichtig die genaue zeitliche Regulierung des PolySia-Abfalls für die normale Gehirnentwicklung ist.

Im Gegensatz zum Verlust von ST8SiaII, hat das Ausschalten von ST8SiaIV innerhalb des Zeitraums P1 bis P21 keinen signifikanten Einfluss auf den PolySia-Spiegel und auch nicht

auf das Verhältnis von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM. Der Vergleich der NCAM-Polysialylierung in ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Tieren, die älter als 6 Monate waren, zeigte jedoch, dass im adulten Hirn ST8SiaIV einen größeren Beitrag zur PolySia-Biosynthese liefert. So konnte mit Hilfe der Western-Blot-Analyse eindrücklich gezeigt werden, dass im adulten Hirn von ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen die PolySia-Menge im Vergleich zu Wildtyp- und ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Mäusen drastisch reduziert ist. Im Vergleich zur Western-Blot-Analyse wurden mittels DMB-HPLC-Analyse nur geringe Unterschiede in der PolySia-Menge zwischen den drei Genotypen festgestellt. So wurden bezogen auf die P1-Wildtyp-Maus im adulten Hirn der Wildtyp-Maus 10%, der ST8SiaII<sup>-/-</sup>-Maus 5% und der ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Maus 2% der PolySia-Menge gemessen. Die Ursache für diese geringen Abweichungen ist wahrscheinlich darin begründet, dass mit den niedrigen PolySia-Mengen im adulten Maushirn das Detektionslimit der HPLC-Methode erreicht wird. Dennoch zeigte auch diese Methode, dass das Fehlen von ST8SiaIV im Hirn der adulten Maus zu einem geringeren PolySia-Gehalt führt als das Fehlen von ST8SiaII. Demnach kommt ST8SiaIV im adulten Organismus eine wichtige Funktion zu. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Befund überein, dass in ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen keine morphologischen Defekte während der postnatalen Gehirnentwicklung auftreten und eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität der hippocampalen CA1-Synapsen erst im adulten Organismus auftritt (Eckhardt *et al.*, 2000).

Wie in unterschiedlichen Studien gezeigt werden konnte, stellt polysialyliertes NCAM einen negativen Regulator der Myelinisierung dar (Charles *et al.*, 2000; Jakovcevski *et al.*, 2007). Während polysialyliertes NCAM zunächst auf allen wachsenden Nervenfasern exprimiert wird, setzt mit der Abnahme der PolySia-Expression die Myelinbildung auf PolySia-freien Axonen ein (Charles *et al.*, 2000; Jakovcevski *et al.*, 2007). In Übereinstimmung hiermit, korreliert das Zeitfenster des starken PolySia-Abfalls, P9 bis P17, mit dem Beginn der Myelinisierung (Uzman und Rumley, 1958). Spiegelbildlich zum Abfall der PolySia wurde in dieser Arbeit eine Hochregulierung von NCAM-120 beobachtet, der charakteristischen NCAM-Isoform der Oligodendrocyten und der Myelinscheide (Bhat und Silberberg, 1986; Bhat und Silberberg, 1988). Hierbei wurde der überwiegende Teil des NCAM-120 in der PolySia-freien Form gefunden, ein Befund der in Einklang mit der Beobachtung steht, dass nur migrierende Oligodendrocyten-Vorläuferzellen, nicht jedoch reife, Myelin-bildende Oligodendrocyten polysialyliertes NCAM tragen (Trotter *et al.*, 1989; Oumesmar *et al.*, 1995; Ben Hur *et al.*, 1998).

Der direkte Vergleich der NCAM-120 Expression in Wildtyp-, ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen ergab, dass der Verlust von ST8SiaII zu einem etwas früheren Auftreten von

NCAM-120 führt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der in diesen Tieren beobachtete vorzeitige Abfall der PolySia zu einer früheren Reifung der Oligodendrocyten führt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass das Entfernen von PolySia durch Behandlung mit Endosialidase die Differenzierung von Oligodendrocyten fördert (Decker *et al.*, 2002). Analog führt der vollständige Verlust von PolySia in ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Mäusen zu einer gesteigerten Differenzierung von Glia-Zellen (Angata *et al.*, 2007).

Mittels *in situ*-Hybridisierung und Northern-Blot-Analyse konnten verschiedene Studien zeigen, dass ST8SiaII und ST8SiaIV vor allem während der Entwicklung exprimiert werden. Hierbei beginnt die Expression in Maus und Ratte zwischen E8 und E9 und ist im Erwachsenenalter stark herunterreguliert (Kurosawa *et al.*, 1997; Hildebrandt *et al.*, 1998; Ong *et al.*, 1998). Abhängig von der verwendeten Methode wurden jedoch unterschiedliche Zeitverläufe der ST8SiaII- und ST8SiaIV-Expression beobachtet. Darüber hinaus erlaubte die Verwendung von Sonden mit stark abweichendem G/C-Gehalt keinen direkten Vergleich der Transkriptmengen von ST8SiaII und ST8SiaIV (s. Abschnitt 5.1.). Um ein genaues Bild der entwicklungsabhängigen Veränderungen in der Expression beider Polysialyltransferasen zu erhalten, wurde in dieser Studie eine Analyse mittels qRT-PCR durchgeführt. Der im ersten Teil dieser Arbeit bestimmte Faktor von 1,93 ( $\pm 0,58$ ), um den die ST8SiaII-Transkriptmenge den ST8SiaIV-mRNA-Spiegel an P1 übersteigt, wurde im Rahmen der Messgenauigkeit in einem zweiten unabhängigen Durchgang bestätigt ( $1,51 \pm 0,25$ ). Ausgehend von dieser 1,5- bis 1,9-fach höheren ST8SiaII Transkriptmenge an P1, fallen beide Polysialyltransferase mRNA-Spiegel postnatal ab. Dabei wird für ST8SiaII ein stärkerer Rückgang beobachtet, so dass an P9 beide Enzyme identische Transkriptspiegel erreichen. Nach P9 kehrt sich das Verhältnis der beiden Enzyme um, und an P21 wird ein 5-fach höherer ST8SiaIV-mRNA-Spiegel beobachtet. Wie zu erwarten, schreitet die Herunterregulierung der beiden Enzyme dem postnatalen PolySia-Abfall voran. Der Verlust einer der beiden Polysialyltransferasen führt im Zeitraum P1 bis P21 zu keiner Veränderung der Transkriptmenge des jeweils anderen Enzyms. Somit konnte gezeigt werden, dass die Transkription von ST8SiaII und ST8SiaIV über den gesamten Zeitraum der postnatalen Hirnentwicklung unabhängig voneinander reguliert wird und dass das Fehlen des einen Enzyms nicht durch Hochregulierung des zweiten kompensiert wird.

Sowohl in Wildtyp- als auch in ST8SiaII<sup>-/-</sup>- und ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der gebildeten PolySia-Menge und dem Polysialyltransferase-Transkriptspiegel festgestellt werden. In Wildtyp- und ST8SiaIV-defizienten Tieren ist dieser

jedoch auf niedrige mRNA-Spiegel, d.h. auf den Zeitraum P11 bis P21, begrenzt. Vor diesem Zeitraum sind die Enzym Spiegel so hoch, dass der Akzeptor NCAM zum limitierenden Faktor wird. Dies ist vermutlich entscheidend, um in der frühen postnatalen Phase zu garantieren, dass alle NCAM-Moleküle vollständig polysialyliert werden und somit zeitlich unpassende Wechselwirkungen von nicht-polysialyliertem NCAM mit anderen Zelloberflächenmolekülen zu verhindern.

### **5.3. Analyse der NCAM- und PolySia-Expression in homo- und heterozygoten NCAM-Knockout-Mäusen**

Die neuro-toxischen und letztlich fatalen Konsequenzen von unphysiologisch auftretendem „nacktem“, d.h. PolySia-freiem, NCAM werden durch die schweren phänotypischen Veränderungen der ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus veranschaulicht. Zusätzlich zu Defekten, die auch in der NCAM-Knockout-Maus auftreten (Cremer *et al.*, 1994), ist der Phänotyp der ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Maus durch Hydrozephalus, Defekten an verschiedenen Fasertrakten (vordere Kommissur, innere Kapsel, mammilothalamischer und corticospinaler Trakt) sowie durch postnatale Wachstumsretardierung und Letalität gekennzeichnet (Weinhold *et al.*, 2005). Diese zusätzlichen Defekte sind abhängig von der Anwesenheit des NCAMs, da sie durch ein zusätzliches Ausschalten des NCAM-Gens aufgehoben werden können (Weinhold *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass nicht der Verlust von PolySia *per se*, sondern das zeitlich unkoordinierte Auftreten von nicht-polysialyliertem NCAM die Ursache für die schwerwiegenden Schäden ist. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch vergleichende Analyse von homo- und heterozygoten NCAM-Knockout-Tieren, die unterschiedliche allelische Kombinationen der beiden Polysialyltransferase-Gene aufweisen, gezeigt werden, dass sich die Menge an PolySia-freiem NCAM sowohl über die Gendosis von ST8SiaII und ST8SiaIV als auch über die NCAM-Gendosis steuern lässt.

Obwohl der Verlust eines NCAM-Allels zu einer Halbierung der NCAM mRNA-Menge führte, konnte auf Proteinebene in heterozygoten NCAM-Knockout-Tieren nur eine Verringerung der NCAM-Menge um 30% beobachtet werden. Diese war jedoch unabhängig von der An- oder Abwesenheit einer oder beider Polysialyltransferasen, was zeigt, dass NCAM- und Polysialyltransferase-Spiegel unabhängig voneinander reguliert werden. Während durch schrittweise Reduktion der Anzahl funktioneller ST8SiaII- und ST8SiaIV-Allele die Menge an nicht-polysialyliertem NCAM in Stufen von 0% auf 100% erhöht werden kann, kann durch das zusätzliche Ausschalten eines NCAM-Allels diese Menge

wieder reduziert werden. So wurde im perinatalen Hirn von Mäusen mit einem Allel ST8SiaIV (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>NCAM<sup>+/+</sup>) 60% des NCAMs in der PolySia-freien Form gefunden, wohingegen diese Menge durch zusätzliches Ausschalten eines NCAM-Allels (ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>+/-</sup>NCAM<sup>+/-</sup>) auf 30% reduziert wurde. Die parallel zu dieser Arbeit durchgeführte phänotypische Charakterisierung der Mäuse mit unterschiedlichen allelischen Kombinationen der NCAM- und Polysialyltransferase-Gene ergab, dass die beobachtete Menge an unphysiologisch auftretendem PolySia-freiem NCAM direkt mit der Schwere der vorliegenden Fasertrakt-Defekte korreliert. Bislang wurden in der ST8SiaII-Knockout Maus als einzige morphologische Veränderung eine aberrante Organisation der Moosfasertrakte im Hippocampus beschrieben (Angata *et al.*, 2004). Die von Prof. Herbert Hildebrandt (Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführte Re-Analyse der Tiere deckte jedoch zusätzliche Fehlentwicklungen bei der Ausbildung der inneren Kapsel, des mammillothalamischen Trakts, der vorderen Kommissur und des Corticospinaltrakts auf (Hildebrandt *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Somit sind bereits in der ST8SiaII-Einzel-Knockout-Maus die Fasertrakte betroffen, für die in der ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus schwere Defekte gefunden wurden (Weinhold *et al.*, 2005). Eine Quantifizierung der Faserstärken ergab jedoch deutliche Unterschiede im Ausmaß der Schädigungen, die in der Doppel-Knockout-Maus am stärksten ausgeprägt sind. Die Analyse der Tiere mit unterschiedlichen allelischen Kombinationen von NCAM, ST8SiaII und ST8SiaIV zeigte, dass in allen Tieren der Grad der Fasertrakt-Defekte linear mit der vorliegenden Menge an PolySia-freiem NCAM zunimmt. Somit konnte in dieser vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die neuro-toxische Wirkung von unphysiologisch auftretendem PolySia-freiem NCAM mit steigender Konzentration zunimmt, und zwar unabhängig davon, ob zeitgleich auch polysialyliertes NCAM vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass aberrante Wechselwirkungen des PolySia-freien NCAMs durch die Gegenwart polysialylierter NCAM-Moleküle nicht verhindert werden können. Somit kommt der genauen entwicklungsabhängigen Regulation der Polysialyltransferase-Spiegel - insbesondere des ST8SiaII-Spiegels - eine enorme Bedeutung zu, da die präzise Steuerung des NCAM-Polysialylierungsstatus offensichtlich essentiell ist, um neurologische Fehlbildungen zu verhindern.

Um die biologische Funktion der beiden Polysialyltransferasen ST8SiaII und ST8SiaIV vollständig zu verstehen, muss berücksichtigt werden, dass neben NCAM, welches das Hauptträgermolekül für PolySia darstellt, noch weitere Proteine durch Polysialylierung modifiziert werden können. So wurde PolySia als Modifikation der  $\alpha$ -Untereinheit des

spannungsgesteuerten Natriumkanals im Rattenhirn (Zuber *et al.*, 1992), von CD36 der Muttermilch (Yabe *et al.*, 2003) sowie von Neuropilin-2 auf humanen dendritischen Zellen (Curreli *et al.*, 2007) beschrieben. Darüber hinaus konnte für beide Polysialyltransferasen gezeigt werden, dass sie sich selbst polysialylieren und somit ebenfalls PolySia-Akzeptoren darstellen (Mühlenhoff *et al.*, 1996a; Close und Colley, 1998). Entsprechend führt im neonatalen Hirn von NCAM<sup>-/-</sup>-Mäusen der Verlust von NCAM nur zu einer 85%igen Reduktion der PolySia-Menge (Cremer *et al.*, 1994). Dieser Befund konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Gegensatz zu polysialyliertem NCAM, das sich gut auf Nitrozellulose-Membran übertragen lässt, konnte die in NCAM<sup>-/-</sup>-Hirn vorliegende PolySia nur unter Verwendung einer deutlich hydrophoberen PVDF-Membran im Western-Blot dargestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich beim Trägermolekül möglicherweise um ein stark hydrophobes Molekül, wie z.B. die  $\alpha$ -Untereinheit eines spannungsgesteuerten Natriumkanals, handelt. Der Befund, dass in ST8SiaII<sup>-/-</sup>ST8SiaIV<sup>-/-</sup>-Mäusen keine PolySia mehr nachgewiesen wurde (Weinhold *et al.*, 2005; Galuska *et al.*, 2006), zeigt, dass ST8SiaII und ST8SiaIV die einzigen Polysialyltransferasen sind und somit auch für die Synthese der in NCAM<sup>-/-</sup>-Hirnen nachgewiesenen PolySia verantwortlich sind. Jedoch sind weitere Studien nötig, um das/die Trägermolekül(e) zu identifizieren und um die Bedeutung der einzelnen Polysialyltransferase für die Polysialylierung dieser Moleküle zu bestimmen.

#### **5.4. Expression und Aufreinigung minimal glykosylierter Polysialyltransferase-Varianten**

Beide eukaryontischen Polysialyltransferasen, ST8SiaII und ST8SiaIV, besitzen die Fähigkeit zur Autopolysialylierung (Mühlenhoff *et al.* 1996a; Close und Colley *et al.*, 1998). In einem autokatalytischen Prozess synthetisieren sie an ihren eigenen N-Glykanen PolySia, wobei ST8SiaII sechs und ST8SiaIV fünf N-Glykosylierungsstellen aufweist, die *in vivo* alle glykosyliert vorliegen (Mühlenhoff *et al.*, 2001). Unter Verwendung von Enzymen, die in Säugerzellen exprimiert wurden, konnten frühere Studien zeigen, dass bestimmte N-Glykosylierungsstellen essentiell für die katalytische Aktivität dieser Enzyme sind. Für die Aktivität der ST8SiaIV ist dies die 2. N-Glykosylierungsstelle und für ST8SiaII ist es die 3. und 5. N-Glykosylierungsstelle (Mühlenhoff *et al.* 1996a; Mühlenhoff *et al.* 2001). Minimal glykosylierte Formen, die nur noch N-Glykane an diesen Stellen tragen, bilden daher ideale Ausgangsbedingungen für die Strukturanalyse autopolysialylierter N-Glykane.

Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerardy-Schahn legten dar, dass die sekretorische Expression vollständig glykosylierter Formen von ST8SiaII und ST8SiaIV in Insektenzellen aus *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*) enzymatisch aktive, zur Autopolysialylierung befähigte Proteine liefert. Dass in Insektenzellen hergestellte Enzyme in Gegenwart von CMP-Neu5Ac autopolysialylieren können, ist allerdings überraschend, da frühere Arbeiten gezeigt hatten, dass das Vorliegen von terminalen Galaktoseresten eine Voraussetzung für die Autopolysialylierung ist (Mühlenhoff *et al.* 1996a). Für Glykoproteine, die in *Sf9*-Zellen exprimiert wurden, sowie für endogene Glykoproteine dieser Insektenzellen, konnten bislang jedoch keine galaktosylierten oder sialylierten Glykanformen nachgewiesen werden (Kuroda *et al.*, 1990; Kretzchmar *et al.* 1994; Wagner *et al.*, 1996; Altmann *et al.*, 1999; Marchal *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden neben vollständig glykosylierten auch erstmals minimal glykosylierte Formen der beiden Polysialyltransferasen in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert. N-terminal um 26 Aminosäuren verkürzte Varianten wurden mit einem C-terminalen Myc- und einem Hexa-Histidin-Epitop sekretorisch exprimiert und mittels Affinitätschromatografie unter Verwendung eines anti-Myc-Epitop-Antikörpers mit hoher Reinheit isoliert. Für die voll-glykosylierten Formen von ST8SiaII und ST8SiaIV konnten Ausbeuten von 720 bzw. 450 µg Protein je Liter Zellkulturüberstand erzielt werden. Für die minimal glykosylierten Formen wurde dagegen nur 12-35% dieser Ausbeuten erreicht, was hauptsächlich auf eine deutlich geringere sekretorische Expression dieser Formen zurückzuführen ist. Dies lässt vermuten, dass die vollständige Glykosylierung der Polysialyltransferasen einen starken Einfluss auf Faltung, Transport und/oder Stabilität der Enzyme hat. Allerdings zeigten alle isolierten Varianten enzymatische Aktivität. In einem ELISA-basierten Aktivitätstest, in dem die Enzyme über das C-terminale Myc-Epitop an eine Mikrotiterplatte gebunden wurden, konnte für beide minimal glykosylierten Formen der ST8SiaIV (+1,2 und +2) sowohl Auto- als auch NCAM-Polysialylierung nachgewiesen werden. Für die minimal glykosylierte Form der ST8SiaII, die nur noch die dritte und fünfte N-Glykosylierungsstelle besitzt (+3,5), konnte in diesem Testsystem keine Aktivität detektiert werden. Da in einem zweiten Testsystem, in dem das Enzym in löslicher Form zum Reaktionsgemisch zugegeben wurde, eindeutig NCAM-Polysialylierungsaktivität nachgewiesen werden konnte, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass die Fixierung der ST8SiaII über ein C-terminales Epitop die Aktivität behindert. Untersuchungen an ST8SiaIV konnten zeigen, dass die exakte Lage der viertletzten Aminosäure, Cys-356, essentiell für die Aktivität des Enzyms ist, da diese Aminosäure an der Ausbildung einer strukturell wichtigen Disulfidbrücke beteiligt ist (Angata *et al.*, 2001).

Jedoch beeinträchtigten weder C-terminale Verkürzungen, die bis an diese Aminosäure heranreichten, noch das Anhängen eines großen C-terminalen Fusionsproteins die Aktivität von ST8SiaIV (Angata *et al.*, 2001). Für ST8SiaII liegen ähnliche Studien bislang nicht vor, so dass hier weitere Arbeiten nötig sind, um Unterschiede in der Bedeutung des C-terminalen Bereichs von ST8SiaII und ST8SiaIV für die enzymatische Aktivität der beiden Enzyme aufzudecken. Für den Nachweis, dass in *Sf9*-Zellen exprimierte minimal glykosylierte Formen von ST8SiaII auch die Kompetenz zur Autopolysialylierung besitzen, ist vermutlich die Generierung von Enzymvarianten mit einem N-terminalen Epitop unumgänglich, um das Enzym über dieses Epitop an eine feste Phase zu koppeln. Durch eine solche Fixierung kann lokal eine hohe Enzymkonzentration erzielt werden, was Voraussetzung für einen effizienten Nachweis der Autopolysialylierung ist. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der Autopolysialylierung um keinen autokatalytischen Prozess im engeren Sinne handelt, sondern zwei Enzyme sich gegenseitig modifizieren.

Durch Herstellung und effiziente Aufreinigung minimal glykosylierter Polysialyltransferasen konnte in diesem Teil der Arbeit die Grundlage für eine spätere Strukturanalyse der an der Autopolysialylierung beteiligten N-Glykane von ST8SiaII und ST8SiaIV gelegt werden. Mittels dieser Glykananalysen gewonnene Strukturdaten können in der Zukunft genutzt werden, um spezifische Inhibitoren zu entwickeln, die die Autopolysialylierung blockieren und somit nur Polysialyltransferasen nicht jedoch die große Gruppe der Mono-Sialyltransferasen inhibieren. Solche selektiven Inhibitoren sind von großem Interesse für eine therapeutische Nutzung zur Bekämpfung PolySia-positiver Tumore.

## **5.5. Ausblick**

Die Aufklärung der Funktionen von ST8SiaII und ST8SiaIV bilden die Grundlage zu einem molekularen Verständnis, wie die Polysialylierung des NCAM und damit dessen Interaktionen gesteuert werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ST8SiaII während der frühen postnatalen Gehirnentwicklung entscheidend dazu beiträgt, das Verhältnis von polysialyliertem zu nicht-polysialyliertem NCAM zu bestimmen. Die Ursache neurologischer Defekte ST8SiaII-defizienter Mäuse konnte auf eine Störung dieses Verhältnisses und dem darin begründeten unphysiologischen Auftreten von nicht-polysialyliertem NCAM zurückgeführt werden. ST8SiaII kommt damit eine essentielle Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems zu. Störungen, die während der Entwicklung des Gehirns auftreten, können zu einer Reihe von Erkrankungen im Jugend- und

Erwachsenenalter führen. In diesem Zusammenhang sind Studien von Bedeutung, die eine Verbindung zwischen veränderter ST8SiaII-Expression und Schizophrenie aufzeigen. Im humanen Genom ist das ST8SiaII-Gen (*SIAT8B*) auf Chromosom 15q26 lokalisiert, einer Region, die eine Rolle für die genetische Prädisposition für Schizophrenie und bipolaren Erkrankungen spielt (Maziade *et al.*, 2005). In zwei unabhängigen Studien wurde eine Beziehung zwischen bestimmten Polymorphismen in der *SIAT8B*-Promotor-Region und dem Auftreten von Schizophrenie beobachtet (Arai *et al.*, 2006; Tao *et al.*, 2007). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte die postmortem Untersuchung von Gehirnen von Schizophrenie-Patienten, dass die Zahl der PolySia-positiven Hilus-Zellen im Hippocampus reduziert ist (Barbeau *et al.*, 1995). Störungen der anatomischen Organisation und der Funktion des Hippocampus wurden seit langem als Krankheitsursache der Schizophrenie vermutet (Harrison, 2004; Ni Dhuill *et al.*, 1999), und auch die Expression des polysialylierten NCAM in der Entwicklung wurde in Bezug auf diese Krankheit diskutiert (Ni Dhuill *et al.*, 1999). Somit werden die in dieser Arbeit gewonnenen Kenntnisse über die Bedeutung der beiden Polysialyltransferasen in der Gehirnentwicklung auch zu einem besseren Verständnis der molekularen Pathologie neurologischer Erkrankungen beitragen.

---

## Literatur

- Altmann,F., Staudacher,E., Wilson,I.B., und Marz,L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj. J.* 16, 109-123.
- Angata,K., Suzuki,M., und Fukuda,M. (1998). Differential und cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST und STX. *J. Biol. Chem.* 273, 28524-28532.
- Angata,K., Suzuki,M., McAuliffe,J., Ding,Y., Hindsgaul,O., und Fukuda,M. (2000). Differential biosynthesis of polysialic acid on neural cell adhesion molecule (NCAM) and oligosaccharide acceptors by three distinct alpha2,8-sialyltransferases, ST8Sia IV (PST), ST8Sia II (STX), and ST8Sia III. *J. Biol. Chem.* 275, 18594-18601.
- Angata,K., Yen,T.Y., El Battari,A., Macher,B.A., und Fukuda,M. (2001). Unique disulfide bond structures found in ST8Sia IV polysialyltransferase are required for its activity. *J. Biol. Chem.* 276, 15369-15377.
- Angata,K., Suzuki,M., und Fukuda,M. (2002). ST8Sia II and ST8Sia IV polysialyltransferases exhibit marked differences in utilizing various acceptors containing oligosialic acid and short polysialic acid. The basis for cooperative polysialylation by two enzymes. *J. Biol. Chem.* 277, 36808-36817.
- Angata,K. und Fukuda,M. (2003). Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie* 85, 195-206.
- Angata,K., Long,J.M., Bukalo,O., Lee,W., Dityatev,A., Wynshaw-Boris,A., Schachner,M., Fukuda,M., und Marth,J.D. (2004). Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior. *J. Biol. Chem.* 279, 32603-32613.
- Angata,K., Huckaby,V., Ranscht,B., Terskikh,A., Marth,J.D., und Fukuda,M. (2007). Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development. *Mol. Cell Biol.* 27, 6659-6668.
- Arai,M., Yamada,K., Toyota,T., Obata,N., Haga,S., Yoshida,Y., Nakamura,K., Minabe,Y., Ujike,H., Sora,I., Ikeda,K., Mori,N., Yoshikawa,T., und Itokawa,M. (2006). Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 59, 652-659.
- Barbeau,D., Liang,J.J., Robitalille,Y., Quirion,R., und Srivastava,L.K. (1995). Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 2785-2789.
- Barthels,D., Vopper,G., Boned,A., Cremer,H., und Wille,W. (1992). High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle. *Eur. J. Neurosci.* 4, 327-337.
- Becker,C.G., Artola,A., Gerardy-Schahn,R., Becker,T., Welzl,H., und Schachner,M. (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* 45, 143-152.

- Ben Hur, T., Rogister, B., Murray, K., Rougon, G., und Dubois-Dalcq, M. (1998). Growth and fate of PSA-NCAM<sup>+</sup> precursors of the postnatal brain. *J. Neurosci.* *18*, 5777-5788.
- Benjamins, J.A., und McKhann, G.M. (1972). Neurochemistry of development. In Albers, R.W., Siegel, G.J., Katzman, R., und Agranoff, B.W., editors. *Basic Neurochemistry*.
- Bhat, S. und Silberberg, D.H. (1986). Oligodendrocyte cell adhesion molecules are related to neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J. Neurosci.* *6*, 3348-3354.
- Bhat, S. und Silberberg, D.H. (1988). Developmental expression of neural cell adhesion molecules of oligodendrocytes in vivo and in culture. *J. Neurochem.* *50*, 1830-1838.
- Cavallaro, U., Niedermeyer, J., Fuxa, M., und Christofori, G. (2001). N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat. Cell Biol.* *3*, 650-657.
- Charles, P., Hernandez, M.P., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B., und Lubetzki, C. (2000). Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 7585-7590.
- Close, B.E. und Colley, K.J. (1998). In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *J. Biol. Chem.* *273*, 34586-34593.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., Barthels, D., Rajewski, K., und Wille, W. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* *367*, 455-459.
- Cremer, H., Chazal, G., Carleton, A., Goridis, C., Vincent, J.D., und Lledo, P.M. (1998). Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 13242-13247.
- Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., und Edelman, G.M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* *236*, 799-806.
- Curreli, S., Arany, Z., Gerardy-Schahn, R., Mann, D., und Stamatou, N.M. (2007). Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J. Biol. Chem.* *282*, 30346-30356.
- D'Eustachio, P., Owens, G.C., Edelman, G.M., und Cunningham, B.A. (1985). Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 7631-7635.
- Datta, A.K. und Paulson, J.C. (1995). The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J. Biol. Chem.* *270*, 1497-1500.
- Datta, A.K., Sinha, A., und Paulson, J.C. (1998). Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates. *J. Biol. Chem.* *273*, 9608-9614.
- Decker, L., Durbec, P., Rougon, G., und Evercooren, A.B. (2002). Loss of polysialic residues accelerates CNS neural precursor differentiation in pathological conditions. *Mol. Cell Neurosci.* *19*, 225-238.

- Dityatev,A., Dityateva,G., und Schachner,M. (2000). Synaptic strength as a function of post-versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 26, 207-217.
- Dityatev,A., Dityateva,G., Sytnyk,V., Delling,M., Toni,N., Nikonenko,I., Muller,D., und Schachner,M. (2004). Polysialylated neural cell adhesion molecule promotes remodeling and formation of hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 24, 9372-9382.
- Dubois,C., Figarella-Branger,D., Pastoret,C., Rampini,C., Karpati,G., und Rougon,G. (1994). Expression of NCAM and its polysialylated isoforms during mdx mouse muscle regeneration and in vitro myogenesis. *Neuromuscul. Disord.* 4, 171-182.
- Durbec,P. und Cremer,H. (2001). Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* 24, 53-64.
- Eckhardt,M., Bukalo,O., Chazal,G., Wang,L., Goridis,C., Schachner,M., Gerardy-Schahn,R., Cremer,H., und Dityatev,A. (2000). Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 20, 5234-5244.
- Edelman,G.M. und Chuong,C.M. (1982). Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 7036-7040.
- Finne,J. (1982). Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J. Biol. Chem.* 257, 11966-11970.
- Finne,J., Bitter-Suermann,D., Goridis,C., und Finne,U. (1987). An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J. Immunol.* 138, 4402-4407.
- Frosch,M., Gorgen,I., Boulnois,G.J., Timmis,K.N., und Bitter-Suermann,D. (1985). NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 1194-1198.
- Fujimoto,I., Bruses,J.L., und Rutishauser,U. (2001). Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J. Biol. Chem.* 276, 31745-31751.
- Galuska,S.P., Oltmann-Norden,I., Geyer,H., Weinhold,B., Kuchelmeister,K., Hildebrandt,H., Gerardy-Schahn,R., Geyer,R., und Mühlenhoff,M. (2006). Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SialII and ST8SialIV. *J. Biol. Chem.* 281, 31605-31615.
- Galuska,S.P., Geyer,R., Gerardy-Schahn,R., Mühlenhoff,M., und Geyer,H. (2007). Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule NCAM in vivo. *J. Biol. Chem.*
- Gerardy-Schahn,R. und Eckhardt,M. (1994). Hot spots of antigenicity in the neural cell adhesion molecule NCAM. *Int. J. Cancer Suppl* 8, 38-42.

- Geyer,H., Bahr,U., Liedtke,S., Schachner,M., und Geyer,R. (2001). Core structures of polysialylated glycans present in neural cell adhesion molecule from newborn mouse brain. *Eur. J. Biochem.* *268*, 6587-6599.
- Glüer,S., Schelp,C., Gerardy-Schahn,R., und von Schweinitz,D. (1998). Polysialylated neural cell adhesion molecule as a marker for differential diagnosis in pediatric tumors. *J. Pediatr. Surg.* *33*, 1516-1520.
- Harrison,P.J. (2004). The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)* *174*, 151-162.
- Hatten,M.E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* *22*, 511-539.
- Hayrinen,J., Bitter-Suermann,D., und Finne,J. (1989). Interaction of meningococcal group B monoclonal antibody and its Fab fragment with alpha 2-8-linked sialic acid polymers: requirement of a long oligosaccharide segment for binding. *Mol. Immunol.* *26*, 523-529.
- He,H.T., Finne,J., und Goridis,C. (1987). Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* *105*, 2489-2500.
- Hildebrandt,H., Becker,C., Murau,M., Gerardy-Schahn,R., und Rahmann,H. (1998). Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J. Neurochem.* *71*, 2339-2348.
- Hildebrandt,H., Mühlhoff,M., Weinhold,B., und Gerardy-Schahn,R. (2007). Dissecting polysialic acid and NCAM functions in brain development. *J. Neurochem.* *103 Suppl 1*, 56-64.
- Hinsby,A.M., Berezin,V., und Bock,E. (2004). Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci.* *9*, 2227-2244.
- Horstkorte,R., Schachner,M., Magyar,J.P., Vorherr,T., und Schmitz,B. (1993). The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* *121*, 1409-1421.
- Hirn,M., Ghandour,M.S., Deagostini-Bazin,H., und Goridis,C. (1983). Molecular heterogeneity and structural evolution during cerebellar ontogeny detected by monoclonal antibody of the mouse cell surface antigen BSP-2. *Brain Res.* *265*, 87-100.
- Inoue,S., Lin,S.L., und Inoue,Y. (2000). Chemical analysis of the developmental pattern of polysialylation in chicken brain. Expression of only an extended form of polysialyl chains during embryogenesis and the presence of disialyl residues in both embryonic and adult chicken brains. *J. Biol. Chem.* *275*, 29968-29979.
- Inoue,S. und Inoue,Y. (2001a). A challenge to the ultrasensitive chemical method for the analysis of oligo- and polysialic acids at a nanogram level of colominic acid and a milligram level of brain tissues. *Biochimie* *83*, 605-613.

- Inoue,S. und Inoue,Y. (2001b). Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains. *J. Biol. Chem.* *276*, 31863-31870.
- Inoue,S. und Inoue,Y. (2003). Ultrasensitive analysis of sialic acids and oligo/polysialic acids by fluorometric high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* *362*, 543-560.
- Jaeken,J. und Matthijs,G. (2001). Congenital disorders of glycosylation. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *2*, 129-151.
- Jaeken,J. und Matthijs,G. (2007). Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *8*, 261-278.
- Jakovcevski,I., Mo,Z., und Zecevic,N. (2007). Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain. *Neuroscience* *149*, 328-337.
- Johnson,C.P., Fujimoto,I., Perrin-Tricaud,C., Rutishauser,U., und Leckband,D. (2004). Mechanism of homophilic adhesion by the neural cell adhesion molecule: use of multiple domains and flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 6963-6968.
- Johnson,C.P., Fujimoto,I., Rutishauser,U., und Leckband,D.E. (2005). Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J. Biol. Chem.* *280*, 137-145.
- Kadmon,G., Kowitz,A., Altevogt,P., und Schachner,M. (1990). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* *110*, 193-208.
- Kasper,C., Rasmussen,H., Kastrup,J.S., Ikemizu,S., Jones,E.Y., Berezin,V., Bock,E., und Larsen,I.K. (2000). Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 389-393.
- Kibbelaar,R.E., Moolenaar,C.E., Michalides,R.J., Bitter-Suermann,D., Addis,B.J., und Mooi,W.J. (1989). Expression of the embryonal neural cell adhesion molecule N-CAM in lung carcinoma. Diagnostic usefulness of monoclonal antibody 735 for the distinction between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer. *J. Pathol.* *159*, 23-28.
- Kiselyov,V.V., Berezin,V., Maar,T.E., Soroka,V., Edvardsen,K., Schousboe,A., und Bock,E. (1997). The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *J. Biol. Chem.* *272*, 10125-10134.
- Kiselyov,V.V., Soroka,V., Berezin,V., und Bock,E. (2005). Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J. Neurochem.* *94*, 1169-1179.
- Kitazume-Kawaguchi,S., Kabata,S., und Arita,M. (2001). Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid Structure by ST8Sia II and ST8Sia IV. *J. Biol. Chem.* *276*, 15696-15703.
- Kojima,N., Tachida,Y., Yoshida,Y., und Tsuji,S. (1996). Characterization of mouse ST8Sia II (STX) as a neural cell adhesion molecule-specific polysialic acid synthase. Requirement of core alpha1,6-linked fucose and a polypeptide chain for polysialylation. *J. Biol. Chem.* *271*, 19457-19463.

- Kono, M., Yoshida, Y., Kojima, N., und Tsuji, S. (1996). Molecular cloning and expression of a fifth type of alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia V). Its substrate specificity is similar to that of SAT-V/III, which synthesize GD1c, GT1a, GQ1b and GT3. *J. Biol. Chem.* *271*, 29366-29371.
- Kretzchmar, E., Geyer, R., und Klenk, H.D. (1994). Baculovirus infection does not alter N-glycosylation in *Spodoptera frugiperda* cells. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* *375*, 23-27.
- Kudo, M., Kitajima, K., Inoue, S., Shiokawa, K., Morris, H.R., Dell, A., und Inoue, Y. (1996). Characterization of the major core structures of the alpha2-->8-linked polysialic acid-containing glycan chains present in neural cell adhesion molecule in embryonic chick brains. *J. Biol. Chem.* *271*, 32667-32677.
- Kuroda, K., Geyer, H., Geyer, R., Doerfler, W., und Klenk, H.D. (1990). The oligosaccharides of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells by a baculovirus vector. *Virology* *174*, 418-429.
- Kurosawa, N., Yoshida, Y., Kojima, N., und Tsuji, S. (1997). Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system. *J. Neurochem.* *69*, 494-503.
- Lackie, P.M., Zuber, C., und Roth, J. (1994). Polysialic acid of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is widely expressed during organogenesis in mesodermal and endodermal derivatives. *Differentiation* *57*, 119-131.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Liedtke, S., Geyer, H., Wührer, M., Geyer, R., Frank, G., Gerardy-Schahn, R., Zähringer, U., und Schachner, M. (2001). Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* *11*, 373-384.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* *25*, 402-408.
- Marchal, I., Jarvis, D.L., Cacan, R., und Verbert, A. (2001). Glycoproteins from insect cells: sialylated or not? *Biol. Chem.* *382*, 151-159.
- Maziade, M., Roy, M.A., Chagnon, Y.C., Cliche, D., Fournier, J.P., Montgrain, N., Dion, C., Lavalley, J.C., Garneau, Y., Gingras, N., Nicole, L., Pires, A., Ponton, A.M., Potvin, A., Wallot, H., und Merette, C. (2005). Shared and specific susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a dense genome scan in Eastern Quebec families. *Mol. Psychiatry* *10*, 486-499.
- Miyahara, R., Tanaka, F., Nakagawa, T., Matsuoka, K., Isii, K., und Wada, H. (2001). Expression of neural cell adhesion molecules (polysialylated form of neural cell adhesion molecule and L1-cell adhesion molecule) on resected small cell lung cancer specimens: in relation to proliferation state. *J. Surg. Oncol.* *77*, 49-54.
- Mody, M., Cao, Y., Cui, Z., Tay, K.Y., Shyong, A., Shimizu, E., Pham, K., Schultz, P., Welsh, D., und Tsien, J.Z. (2001). Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 8862-8867.

- Moolenaar,C.E., Muller,E.J., Schol,D.J., Figdor,C.G., Bock,E., Bitter-Suermann,D., und Michalides,R.J. (1990). Expression of neural cell adhesion molecule-related sialoglycoprotein in small cell lung cancer and neuroblastoma cell lines H69 and CHP-212. *Cancer Res.* *50*, 1102-1106.
- Morrison,T.B., Weis,J.J., und Wittwer,C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* *24*, 954-8, 960, 962.
- Mühlenhoff,M., Eckhardt,M., Bethe,A., Frosch,M., und Gerardy-Schahn,R. (1996a). Autocatalytic polysialylation of polysialyltransferase-1. *EMBO J.* *15*, 6943-6950.
- Mühlenhoff,M., Eckhardt,M., Bethe,A., Frosch,M., und Gerardy-Schahn,R. (1996b). Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Curr. Biol.* *6*, 1188-1191.
- Mühlenhoff,M., Manegold,A., Windfuhr,M., Gotza,B., und Gerardy-Schahn,R. (2001). The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases. *J. Biol. Chem.* *276*, 34066-34073.
- Muller,D., Wang,C., Skibo,G., Toni,N., Cremer,H., Calaora,V., Rougon,G., und Kiss,J.Z. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* *17*, 413-422.
- Muller,D., Djebbara-Hannas,Z., Jourdain,P., Vutskits,L., Durbec,P., Rougon,G., und Kiss,J.Z. (2000). Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 4315-4320.
- Nelson,R.W., Bates,P.A., und Rutishauser,U. (1995). Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* *270*, 17171-17179.
- Nguyen,C., Mattei,M.G., Mattei,J.F., Santoni,M.J., Goridis,C., und Jordan,B.R. (1986). Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J. Cell Biol.* *102*, 711-715.
- Ni Dhuill,C.M., Fox,G.B., Pittock,S.J., O'Connell,A.W., Murphy,K.J., und Regan,C.M. (1999). Polysialylated neural cell adhesion molecule expression in the dentate gyrus of the human hippocampal formation from infancy to old age. *J. Neurosci. Res.* *55*, 99-106.
- Nilsson,O. (1992). Carbohydrate antigens in human lung carcinomas. *APMIS Suppl* *27*, 149-161.
- Ong,E., Nakayama,J., Angata,K., Reyes,L., Katsuyama,T., Arai,Y., und Fukuda,M. (1998). Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology* *8*, 415-424.
- Oumesmar,B.N., Vignais,L., Duhamel-Clerin,E., Avellana-Adalid,V., Rougon,G., und Baron-Van Evercooren,A. (1995). Expression of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule during postnatal myelination and following chemically induced demyelination of the adult mouse spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* *7*, 480-491.
- Paratcha,G., Ledda,F., und Ibanez,C.F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* *113*, 867-879.

- Phillips,G.R., Krushel,L.A., und Crossin,K.L. (1997). Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *102*, 143-155.
- Ranheim,T.S., Edelman,G.M., und Cunningham,B.A. (1996). Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 4071-4075.
- Roth,J., Taatjes,D.J., Bitter-Suermann,D., und Finne,J. (1987). Polysialic acid units are spatially and temporally expressed in developing postnatal rat kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 1969-1973.
- Roth,J., Zuber,C., Wagner,P., Taatjes,D.J., Weisgerber,C., Heitz,P.U., Goridis,C., und Bitter-Suermann,D. (1988). Reexpression of poly(sialic acid) units of the neural cell adhesion molecule in Wilms tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *85*, 2999-3003.
- Rothbard,J.B., Brackenbury,R., Cunningham,B.A., und Edelman,G.M. (1982). Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J. Biol. Chem.* *257*, 11064-11069.
- Saffell,J.L., Williams,E.J., Mason,I.J., Walsh,F.S., und Doherty,P. (1997). Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* *18*, 231-242.
- Sato,C., Inoue,S., Matsuda,T., und Kitajima,K. (1999). Fluorescent-assisted detection of oligosialyl units in glycoconjugates. *Anal. Biochem.* *266*, 102-109.
- Seidenfaden,R., Krauter,A., Schertzinger,F., Gerardy-Schahn,R., und Hildebrandt,H. (2003). Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol. Cell Biol.* *23*, 5908-5918.
- Seki,T. und Arai,Y. (1993). Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci. Res.* *17*, 265-290.
- Shen,H., Watanabe,M., Tomaszewicz,H., Rutishauser,U., Magnuson,T., und Glass,J.D. (1997). Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J. Neurosci.* *17*, 5221-5229.
- Soroka,V., Kolkova,K., Kastrop,J.S., Diederichs,K., Breed,J., Kiselyov,V.V., Poulsen,F.M., Larsen,I.K., Welte,W., Berezin,V., Bock,E., und Kasper,C. (2003). Structure and interactions of NCAM Ig1-2-3 suggest a novel zipper mechanism for homophilic adhesion. *Structure.* *11*, 1291-1301.
- Storms,S.D. und Rutishauser,U. (1998). A role for polysialic acid in neural cell adhesion molecule heterophilic binding to proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *273*, 27124-27129.
- Stummeyer,K., Dickmanns,A., Mühlenhoff,M., Gerardy-Schahn,R., und Ficner,R. (2005). Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 90-96.

- Tao,R., Li,C., Zheng,Y., Qin,W., Zhang,J., Li,X., Xu,Y., Shi,Y.Y., Feng,G., und He,L. (2007). Positive association between SIAT8B and schizophrenia in the Chinese Han population. *Schizophr. Res.* *90*, 108-114.
- Theodosis,D.T., Rougon,G., und Poulain,D.A. (1991). Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 5494-5498.
- Theodosis,D.T., Bonhomme,R., Vitiello,S., Rougon,G., und Poulain,D.A. (1999). Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J. Neurosci.* *19*, 10228-10236.
- Trotter,J., Bitter-Suermann,D., und Schachner,M. (1989). Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin. *J. Neurosci. Res.* *22*, 369-383.
- Uzman,L.L. und Rumley,M.K. (1958). Changes in the composition of the developing mouse brain during early myelination. *J. Neurochem.* *3*, 170-184.
- Vaithianathan,T., Matthias,K., Bahr,B., Schachner,M., Suppiramaniam,V., Dityatev,A., und Steinhauser,C. (2004). Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents. *J. Biol. Chem.* *279*, 47975-47984.
- von der Ohe,M., Wheeler,S.F., Wuhrer,M., Harvey,D.J., Liedtke,S., Mühlenhoff,M., Gerardy-Schahn,R., Geyer,H., Dwek,R.A., Geyer,R., Wing,D.R., und Schachner,M. (2002). Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology* *12*, 47-63.
- Vutskits,L., Djebbara-Hannas,Z., Zhang,H., Paccaud,J.P., Durbec,P., Rougon,G., Muller,D., und Kiss,J.Z. (2001). PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* *13*, 1391-1402.
- Wagner,R., Geyer,H., Geyer,R., und Klenk,H.D. (1996). N-acetyl-beta-glucosaminidase accounts for differences in glycosylation of influenza virus hemagglutinin expressed in insect cells from a baculovirus vector. *J. Virol.* *70*, 4103-4109.
- Walmod,P.S., Kolkova,K., Berezin,V., und Bock,E. (2004). Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem. Res.* *29*, 2015-2035.
- Watanabe,M., Timm,M., und Fallah-Najmabadi,H. (1992). Cardiac expression of polysialylated NCAM in the chicken embryo: correlation with the ventricular conduction system. *Dev. Dyn.* *194*, 128-141.
- Weinhold,B., Seidenfaden,R., Rockle,I., Mühlenhoff,M., Schertzinger,F., Conzelmann,S., Marth,J.D., Gerardy-Schahn,R., und Hildebrandt,H. (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* *280*, 42971-42977.
- Windfuhr,M., Manegold,A., Mühlenhoff,M., Eckhardt,M., und Gerardy-Schahn,R. (2000). Molecular defects that cause loss of polysialic acid in the complementation group 2A10. *J. Biol. Chem.* *275*, 32861-32870.

Yabe,U., Sato,C., Matsuda,T., und Kitajima,K. (2003). Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 13875-13880.

Yamamoto,N., Inui,K., Matsuyama,Y., Harada,A., Hanamura,K., Murakami,F., Ruthazer,E.S., Rutishauser,U., und Seki,T. (2000). Inhibitory mechanism by polysialic acid for lamina-specific branch formation of thalamocortical axons. *J. Neurosci.* 20, 9145-9151.

Yang,P., Major,D., und Rutishauser,U. (1994). Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 23039-23044.

Zuber,C., Lackie,P.M., Catterall,W.A., und Roth,J. (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J. Biol. Chem.* 267, 9965-9971.

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIP	Alkalische Phosphatase
CMP	Cytidinmonophosphat
Ct	threshold cycle
C-terminal	Carboxy-terminal
CTP	Cytosintriphosphat
D	Dalton
dd H <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Effizienz
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
EndoN	Endoneuraminidase
Fab	Antigen-bindendes Fragment

---

---

FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor
FNIII	Fibronectin Typ III-ähnliche Domäne
FPLC	fast protein liquid chromatography
GFR $\alpha$	glial-derived neurotrophic factor family receptor $\alpha$
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HBM	honey bee melittin
His	Histidin
HPRT	Hypoxanthine-Guanin-Phosphoribosyltransferase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRD	infrared dye
kb	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
lacZ	Gen für das Enzym $\beta$ -Galactosidase
LB	Luria, Bertani
LPA	linear polyacrylamide
LTP	long term potentiation
mAk	monoklonaler Antikörper
MES	Morpholino-Ethan-Sulfonsäure
min	Minute
NBT	Nitrotetrazoliumblauschlorid
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NEB	New England Biolabs
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
P	Phosphat
P1	postnataler Tag 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pdN6	random-hexameric primer
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PolySia	Polysialinsäure

---

POX	Peroxidase
pPol	Polyhedrin-Promotor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RMS	rostraler Migrationsweg
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf9	Spodoptera frugiperda
ST	Sialyltransferase
SVZ	subventrikuläre Zone
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TCA	Trichloressigsäure
TE	10 mM Tris-HCl-Puffer, 1mM EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Einheiten
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Imke Oltmann-Norden  
 Anschrift Hedwigstraße 7  
 30159 Hannover  
 E-Mail imke.oltmann-norden@gmx.de  
 Geburtsdaten 20.12.1978, Oldenburg  
 Nationalität deutsch  
 Familienstand verheiratet

### Schule

1985 -1989 Grundschule Nadorst, Oldenburg  
 1989-1991 Orientierungsstufe im Schulzentrum am Flötenteich, Oldenburg  
 1991-1994 Gymnasium im Schulzentrum am Flötenteich, Oldenburg  
 1994-1998 Cäcilien-schule, Gymnasium, Oldenburg, Abschluss: Abitur

### Hochschulstudium

1998-2004 Biochemiestudium an der Universität Hannover, Abschluss: Diplom  
 14.07. 2003 bis Diplomarbeit  
 21.01. 2004 Thema: „Vergleichende Charakterisierung von Polysialyltransferasen“  
 Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn,  
 Abteilung Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

### Promotion

01.03.2004 bis Thema: „Bedeutung der Polysialyltransferasen ST8SiaII und  
 ST8SiaIV in der postnatalen Gehirnentwicklung der Maus“  
 28.03.2008 bei Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn,  
 Abteilung Zelluläre Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

### Fortbildungen

17.09. – 12.10.2001 Kurs zur Fachkunde gem.§30 Str.SchV, Fachkundegruppe 4.2,  
 Aktualisierung am 12.06.2006  
 Oktober 2002 Fortbildungslehrgang nach §15 Abs 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV  
 („gentechnische Sicherheit“)  
 März 2006 Seminar über die Grundlagen der Versuchstierkunde und der  
 Perioperativen Betreuung von Versuchstieren  
 24.-25.10.2006 Basic Real-Time PCR Training/7500 FAST, Applied Biosystems

## Eigene Publikationen

### Wissenschaftliche Publikationen

Galuska, S. P., Oltmann-Norden, I., Geyer, H., Weinhold, B., Kuchelmeister, K., Hildebrandt, H., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., and Mühlenhoff, M. (2006) Polysialic acid profiles of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. *Journal of Biological Chemistry* 281, 31605-31615.

Freiberger, F., Claus, H., Günzel, A., Oltmann-Norden, I., Vionnet, J., Mühlenhoff, M., Vogel, U., Vann, W., V, Gerardy-Schahn, R., Stummeyer, K. (2007). Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases. *Molecular Microbiology* 65(5), 1258-75.

Oltmann-Norden, I., Galuska, P., Hildebrandt, H., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Mühlenhoff, M.; Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. *Journal of Biological Chemistry* (in Druck).

### Wissenschaftliche Vorträge

Oltmann-Norden, I., Galuska, S., Geyer, H., Weinhold, B., Hildebrandt, H., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., and Mühlenhoff, M.. Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV in polysialylation of the neural cell adhesion molecule “; *Basic Biological Questions (BBQ)*, Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Hannover, Deutschland, 26. Januar 2007.

Oltmann, I., Galuska, S., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., Geyer, H. and Mühlenhoff, M. (2004). Comparison of the polysialylation status in ST8SiaII and ST8SiaIV knock-out mice during postnatal brain development. 29. November 2004 auf dem 15<sup>th</sup> Joint Meeting 2004 of the *Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Netherlands Society for Glycobiology* and the *Groupe Lillois de Glycobiologie*, Wageningen, Niederlande 28. – 30. November 2004.

### Posterbeiträge

Galuska, S., Oltmann, I., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., and Mühlenhoff, M. (2004). *In vivo* comparison of the polysialylation competence of ST8SiaII and ST8SiaIV. 4<sup>th</sup> International Conference “Sialobiology 2004”, St. Andrews, UK, 27.-30. July 2004

Mühlenhoff, M., Oltmann, I., Galuska, S., Weinhold, B., Geyer, R., Geyer, H., and Gerardy-Schahn, R., (2004). NCAM polysialylation by ST8SiaII and ST8SiaIV. “Glyco 2004”, Honolulu, USA, 17.-20. November 2004.

Galuska, S., Oltmann, I., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., Mühlenhoff, M., and Geyer, H. (2004). Changes in NCAM polysialylation during postnatal brain development of the mouse. 15<sup>th</sup> Joint Meeting of the *Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie* und the *Groupe Lillois de Glycobiologie*, Wageningen, The Netherlands, 28.-30. November 2004.

Oltmann, I., Galuska, S., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., Geyer, H., and Mühlenhoff, M., (2004). Comparison of the polysialylation status in ST8SiaII and ST8SiaIV knock-out mice during postnatal development. 15<sup>th</sup> Joint Meeting of the *Studiengruppe Glykobiologie der*

---

*Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie und the Groupe Lillois de Glycobiologie*, Wageningen, The Netherlands, 28.-30. November 2004.

Galuska, S. P., Oltmann-Norden, I., Kuchelmeister, K., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., Mühlhoff, M., Geyer, H. (2005). The NCAM polysialylation capacity of the two polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV *in vivo*. XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Florence, Italy, 4. -9- September 2005.

Oltmann-Norden, I., Galuska, S. P., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Mühlhoff, M. (2005). *In vivo* comparison of the NCAM polysialylation competence of the two polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Florence, Italy, 4. -9- September 2005.

Galuska, S., Oltmann-Norden, I., Kuchelmeister, K., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Mühlhoff, M., and Geyer, R. (2005). The complex *in vivo* polysialylation pattern generated by the interplay of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. 16<sup>th</sup> Joint Meeting of the *Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie und the Groupe Lillois de Glycobiologie*, Hannover, Germany, 27.-29. October 2005.

Oltmann-Norden, I., Galuska, S., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., and Mühlhoff, M. (2005). *In vivo* characterisation of the NCAM polysialylation competence of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV. 16<sup>th</sup> Joint Meeting of the *Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie und the Groupe Lillois de Glycobiologie*, Hannover, Germany, 27.-29. October 2005.

Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Weinhold, B., Galuska, S. P., Oltmann-Norden, I., Geyer, R., Röckle, I., Hildebrandt, H., and Mühlhoff, M. (2006). Phenotypic characteristics of mice expressing variant allelic combinations of the polysialyltransferase genes *St8siaII* and *St8siaIV*. Sialoglycoscience, 5<sup>th</sup> International Conference, Mishima, Japan, 27.-30. August 2006.

Galuska, S. P., Oltmann-Norden, I., Kuchelmeister, K., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., Mühlhoff, M., Geyer, H. (2006). *In vivo* comparison of the polysialylation properties of ST8SiaII and ST8SiaIV, 17<sup>th</sup> Joint Meeting 2006 of the *Studiengruppe Glykobiologie der (GBM), the Netherlands Society for Glycobiology, the Groupe Lillois de Glycobiologie und the Belgian Working Group for Glycosciences*, Brügge, Belgien, 5. – 7. November 2006.

Oltmann-Norden, I., Galuska, S. P., Geyer, H., Gerardy-Schahn, R., Geyer, R., Mühlhoff, M. (2006). Polysialylation of the neural cell adhesion molecule in mutant mice with variable numbers of functional polysialyltransferase alleles, *Glycobiology 2006; Annual Conference of the Society for Glycobiology*, Los Angeles, Kalifornien, USA, 15. – 18. November 2006.

Oltmann-Norden, I., Galuska, S. P., Geyer, R., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Mühlhoff, M. (2007). The polysialylation status of NCAM in ST8SiaII and ST8SiaIV knock-out mice during postnatal brain development, 3rd International meeting: Polysialic acid – Chemistry, Biology, Translational Aspects, Bad Lauterberg, Deutschland, 10. -13. März 2007.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Zelluläre Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Mein ganz besonderer Dank gilt der Abteilungsleiterin Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte. Durch die jederzeit konstruktive und faire Zusammenarbeit mit ihr konnte ich mich fachlich und persönlich weiterentwickeln.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Walter Müller für die Übernahme des Korreferats.

Ganz besonders und herzlich möchte ich mich bei Dr. Martina Mühlenhoff für die herausragende Betreuung danken. Ihre wertvollen fachlichen Anregungen und ihr Engagement sowie die sehr gute persönliche Zusammenarbeit haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Unseren Kooperationspartnern in Gießen, Prof. Dr. Rudolf Geyer, Dr. Hildegard Geyer und Sebastian Galuska danke ich für die gute Zusammenarbeit und den regen Austausch wissenschaftlicher Erkenntnisse.

Dr. Birgit Weinhold und ihrem Team, Ulrike Bernard, Brigitte Philippons und Daniela Wittenberg, danke ich für die Herstellung der unterschiedlichen Mauslinien und der guten Unterstützung in der Arbeit mit den Mäusen.

Prof. Dr. Herbert Hildebrandt möchte ich für die Durchführung der phänotypischen Charakterisierung unterschiedlicher Knockout-Mauslinien und die gute Zusammenarbeit danken.

PD Dr. Ulrich Lehmann und Britta Hasemeier danke ich für die Einführung in die qRT-PCR.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen für die freundschaftliche Atmosphäre und die organisatorische Unterstützung während der Laborarbeit bedanken. Ein besonderer Dank geht dabei an David Schwarzer, Katinka Eggers und Almut Günzel.

Ganz besonders danke ich meinem Mann, Mirko Norden, für die stetige Unterstützung und das mir entgegengebrachte Verständnis. Durch ihn habe ich besonders in den letzten Monaten die notwendigen Freiräume und die nötige Kraft bis zur Fertigstellung dieser Arbeit erhalten.

An dieser Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mir während meiner Promotionszeit jederzeit zur Seite standen und mich so in meiner Motivation bestärkt haben.

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Außerdem erkläre ich an Eides statt, dass die der vorliegenden Dissertation zugrunde liegenden Ergebnisse nicht für eine andere Prüfungsarbeit verwendet worden sind.

Hannover, den 7. Januar 2008

(Imke Oltmann-Norden)