

**Untersuchungen zur Bedeutung der Serin-Phosphorylierung des  
Zelladhäsionsmoleküls L1 für das Neuritenwachstum**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft  
(Dr. oec. troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 15.04.04

von Martina Schultheis

aus Bonn

Referent:

Frau Prof. Dr. B. Schmitz

Korreferent:

Herr Prof. Dr. K. Schellander

Tag der mündlichen Prüfung:

8. Juni 2004

**Meinen Eltern**

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Brigitte Schmitz. Durch Ihre fachliche Beratung, intensive Unterstützung und motivierenden Diskussionen hat Sie diese Arbeit ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. Karl Schellander danke ich für die Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Für die freundliche Laboratmosphäre und die ständige Diskussionsbereitschaft möchte ich mich bei Julia Kellersmann, Simone Diestel, Angela Käberich, Bernd Gehrig, Reinhild Quade, Marie-Therese Fergen und Claudia Müller bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Ursula Munzel für die tatkräftige Unterstützung bei allen organisatorischen Fragen bedanken.

Für die freundliche Erlaubnis das konfokale Mikroskop zu nutzen möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Hoch und Prof. Dr. Karl Schilling bedanken, außerdem danke ich deren Mitarbeitern Frank Josten, PD Dr. Stephan Baader und Jakob Jankowski für die Einführung und Unterstützung bei der Anwendung der konfokalen Mikroskopie.

Für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Migrations-Versuche möchte ich mich bei Dr. Joachim Kappler bedanken.

Für die Nutzung des Sequencers möchte ich mich bei Dr. Christoph Völker bedanken.

Bei meinem Freund Alexander Hein möchte ich mich dafür bedanken, dass er mich in frustrierenden Zeiten stets motiviert und unterstützt hat und ich die erfolgreichen Phasen immer mit ihm teilen konnte.

Meinen Freundinnen Sabine Klingelhöfer, Heide Ebrahimzadeh, Julia Kellersmann und Nina Viebig danke ich für ihre Unterstützung und Ihr stets offenes Ohr.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin meinen Eltern, die mir mein Studium und meine Promotion ermöglicht und mich immer unterstützt haben, sowie meinem Bruder und meiner Schwester, die mich während dieser Zeit begleitet haben.

**Kurzfassung:** Untersuchungen zur Bedeutung der Serin-Phosphorylierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 für das Neuritenwachstum

Das Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie und ist an Zelladhäsion und -migration sowie an Neuritenwachstum und -faszikulierung beteiligt. Die cytoplasmatische Domäne von L1 ist zwischen verschiedenen Spezies hochkonserviert und wird von spezifischen Kinasen sowohl an Tyrosin- als auch an Serinresten phosphoryliert. Bis heute konnten vier Serine als phosphoryliert nachgewiesen werden: Ser-1152 wird von der Kinase p90<sup>rsk</sup>, Ser-1181 von der Casein Kinase 2 und Ser-1204 und Ser-1248 werden von der Kinase erk2 phosphoryliert. Um die Bedeutung der Serin-Phosphorylierung von L1 für das basale (= unstimuliertes, zellautonomes) Neuritenwachstum zu untersuchen, wurden verschiedene L1-Mutanten hergestellt, bei denen die nachweislich phosphorylierbaren Serine gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren ausgetauscht wurden. Anschließend wurden B35-Neuroblastomzellen stabil mit den cDNAs der L1-Mutanten transfiziert. Positive Klone, die vergleichbare Mengen an L1 exprimierten, wurden mittels Immunfluoreszenz und Western Blot-Analyse identifiziert. Die Untersuchung des basalen Neuritenwachstums erfolgte an nicht ausdifferenzierten oder durch dbcAMP ausdifferenzierte B35-Neuroblastomzellen auf poly-L-Lysin als Substrat. Es konnte gezeigt werden, dass bei L1-S1152L und L1-S1181L exprimierenden Zellen das basale Neuritenwachstum ohne Ausdifferenzierung signifikant erhöht ist. Im Gegensatz dazu führten die Mutationen der Serine, die durch erk2 phosphoryliert werden können (L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L), nach Behandlung mit dbcAMP zu einer signifikanten Reduktion des basalen Neuritenwachstums. Gleichzeitig konnte bei diesen L1-Mutanten eine Zunahme in der durchschnittlichen Anzahl an Neuriten festgestellt werden. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Mutation einzelner phosphorylierbarer Serine der cytoplasmatischen Domäne von L1 das basale Neuritenwachstum entweder hemmen oder stimulieren kann. Daraus ist zu schließen, dass die Serin-Phosphorylierung das basale Neuritenwachstum durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst. Außerdem ergaben Untersuchungen der Antikörper-induzierten Endocytose von L1 und der Mutante L1-S1181L, die mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie durchgeführt wurden, dass die Endocytose von L1-S1181L im Vergleich zu L1 sowohl in nicht ausdifferenzierten als auch in ausdifferenzierten B35-Zellen signifikant erhöht ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung des Ser-1181 durch Casein Kinase 2 die Endocytose von L1 hemmt und damit eine wichtige Funktion bei der Regulation der Endocytose von L1 hat.

**Abstract:** Serine-Phosphorylation of cell adhesion molecule L1 and its role in neurite outgrowth

The cell adhesion molecule L1, a member of the immunoglobulin superfamily is involved in adhesion and migration of cells as well as neurite outgrowth and fasciculation of neurites. The cytoplasmic domain of neuronal L1 is highly conserved between species and known to be phosphorylated at serine and tyrosine residues by a few specific kinases. Presently it is known that only four serines of L1 are phosphorylated: Ser-1152 by p90<sup>rsk</sup>, Ser-1181 by Casein kinase 2, Ser-1204 and Ser-1248 by erk2. To investigate the significance of L1 serine phosphorylation for basal (= unstimulated, cellautonomous) neurite outgrowth, mutants of L1 were generated in which these four serine residues were converted into non phosphorylatable amino acids. Neuronal B35 rat cells were stably transfected with the L1-cDNA constructs and positive clones with similar levels of wild type or mutated L1 were identified by indirect immunofluorescence and western blot analysis. Basal neurite outgrowth of B35 cells on poly-l-lysine was determined either with or without differentiation with dbcAMP. It could be shown that in L1-S1152L and L1-S1181L expressing cells basal neurite outgrowth is significantly enhanced when compared to L1 expressing cells without dbcAMP treatment. In contrast, mutagenesis of the serines phosphorylated by erk2 (L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L) caused significantly reduced basal neurite outgrowth only after differentiation with dbcAMP. Simultaneously, the average neurite number of these L1-mutants increases significantly. In summary it could be shown that mutations of single serines of the cytoplasmic domain of L1 result in decreased or increased basal neurite outgrowth indicating that serine phosphorylation of L1 influences basal neurite outgrowth through different mechanisms. In addition, antibody induced endocytosis of L1 and L1-S1181L visualized by confocal laser microscopy revealed that endocytosis of L1-S1181L is significantly enhanced compared to wild-type L1 in B35 cells with and without dbcAMP treatment. From this observation it could be concluded that phosphorylation of Ser-1181 inhibits endocytosis of L1, indicating the involvement of Casein kinase 2 in the regulation of L1 endocytosis.



2.4.11	Lösungen für den Nachweis von Endocytose-Vesikeln .....	33
2.5	Oligonukleotide .....	33
2.5.1	Oligonukleotide zur zielgerichteten Mutagenese.....	34
2.5.2	Oligonukleotide zur Sequenzierung .....	34
2.6	Klonierungsvektoren .....	35
2.7	Größenstandards .....	35
2.7.1	Nukleinsäureanalytik.....	35
2.7.2	Proteinanalytik .....	35
2.8	Bakterienstamm.....	35
2.9	Verwendete Zelllinien .....	36
2.10	Antikörper .....	36

### **3 Methoden.....37**

3.1	Molekularbiologische Methoden .....	37
3.1.1	Herstellung von kompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien und Transformation 37	
3.1.1.1	Transformationskompetente, einfrierbare Bakterien .....	37
3.1.1.2	Transformation.....	38
3.1.2	Gezielte Mutagenese der humanen L1-cDNA (hL1-cDNA).....	38
3.1.2.1	Primer-Design.....	39
3.1.2.2	Zusammensetzung der PCR-Ansätze und PCR-Programm ....	39
3.1.2.3	Dpn I-Verdau des PCR-Produktes .....	40
3.1.3	DNA-Präparation.....	40
3.1.3.1	Analytische Plasmid-Isolierung (Minipräparation) .....	41
3.1.3.2	Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation) .....	41
3.1.3.3	Isolierung von DNA aus einem Agarosegel .....	41
3.1.3.4	Phenol-Chlorophorm-Extraktion.....	42
3.1.3.5	Natriumacetat-Fällung .....	42
3.1.3.5.1	<i>Natriumacetat-Fällung I</i> .....	42
3.1.3.5.2	<i>Natriumacetat-Fällung II</i> .....	42
3.1.4	Enzymatische Spaltung und Ligation von DNA.....	43
3.1.4.1	Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten.....	43
3.1.4.2	Ligation überhängender, kohäsiver Enden .....	43
3.1.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	43
3.1.6	Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren .....	44
3.1.7	Sequenzierung von cDNA.....	44
3.2	Zellkultur und Transfektion von adhärenen Zellen .....	46
3.2.1	Kultivierung von adhärenen Zellen.....	46
3.2.2	Auftauen von Kulturzellen .....	46
3.2.3	Einfrieren von Kulturzellen .....	47
3.2.4	Stabile Transfektion von Kulturzellen.....	47
3.2.5	Selektion transfizierter Zellen.....	47
3.2.6	Ausdifferenzieren von B35-Zellen mit dbcAMP .....	48
3.3	Proteinchemische Methoden .....	48
3.3.1	Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse .....	48
3.3.2	Nachweis von L1 auf der Zelloberfläche und in Endocytose-Vesikeln durch indirekte Immunfluoreszenz .....	49
3.3.3	Markierung von Proteinen .....	50

3.3.3.1	Nachweis von membranständigem L1 durch Zelloberflächen-Biotinylierung .....	50
3.3.3.2	Markierung von L1 mit <sup>32</sup> P-ortho-Phosphat.....	50
3.3.4	Herstellung von Zellhomogenaten .....	51
3.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Lowry) .....	51
3.3.6	Immunpräzipitation (IP).....	51
3.3.7	Deglykosylierung von Proteinen mit Endoglykosidase H (EndoH)..	52
3.3.8	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	53
3.3.9	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen .....	54
3.3.10	Autoradiographie von SDS-Polyacrylamidgelen .....	54
3.3.11	Western-Blot (Semi-Dry-Verfahren).....	55
3.3.12	Ponceau S Färbung von Nitrocellulosemembranen.....	55
3.3.13	Detektion von Proteinen im Western Blot .....	55
3.3.14	„Strippen“ von Nitrocellulosemembranen .....	56
3.4	Messung der Neuritenlänge und Neuritenanzahl von B35-Zellen	57
3.5	Untersuchung der Migration von B35-Zellen .....	57
3.6	Statistische Auswertung .....	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
4.1	Untersuchungen zur Funktion der Serin-Phosphorylierung des humanen Zelladhäsions-moleküls L1 .....	59
4.1.1	Mutagenese der humanen L1 cDNA.....	59
4.1.2	Transfektion von B35-Neuroblastomzellen mit den cDNAs der verschiedenen L1-Mutanten .....	64
4.1.3	Western Blot der B35-Transfektanten.....	66
4.1.4	Nachweis von Zelloberflächen-assoziiertem L1 .....	67
4.1.5	Untersuchung der Glykosylierung von L1-wt und L1-Mutanten mit Endoglykosidase H .....	69
4.1.6	Untersuchung der Phosphorylierung der mutierten L1-Proteine .....	70
4.1.7	Untersuchung des basalen Neuritenwachstums.....	73
4.1.8	Untersuchung der Migration von L1 und L1-Mutanten exprimierenden B35-Zellen auf PLL.....	85
4.1.9	Endocytose von L1-wt und L1-S1181L in stabil transfizierten B35-Zellen .....	87
4.1.10	Untersuchung von erk1/2 und p-erk1/2 in L1-wt und den L1-erk2-Mutanten exprimierenden B35-Zellen .....	91
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>93</b>
5.1	Bedingungen des basalen und stimulierten Neuritenwachstums .	93
5.2	Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L1 .....	95
5.4	Bedeutung der Ser-1152 Phosphorylierung durch die Kinase p90 <sup>rsk</sup> für die Funktion von L1 .....	99
5.5	Bedeutung der Ser-1181 Phosphorylierung durch Casein Kinase 2 für die Funktion von L1 .....	101
5.6	Bedeutung der Phosphorylierung von Ser-1204 und Ser-1248 durch erk2 für die Funktion von L1 .....	104

---

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Anlage .....</b>	<b>A1</b>
A)	m-RNA von humanem L1 .....	A1
B)	Aminosäuresequenz von humanem L1 .....	A3
C)	Karten der verwendeten eukaryotischen Expressionsvektoren....	A4

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Schematische Darstellung von einigen Mitgliedern der Ig-Superfamilie	2
Abb. 2:	Schematische Darstellung von L1 und seinen proteolytischen Spaltprodukten	11
Abb. 3:	Schematische Darstellung der CAM-vermittelten FGFR Signalweiterleitung	13
Abb. 4:	Beispiel für einen L1-vermittelten Signalweg	15
Abb. 5:	Interaktionen der cytoplasmatischen Domäne von L1	17
Abb. 6:	Modell für einen L1-Wiederverwertungsmechanismus bei der Migration von Wachstumskegeln auf einem L1-Substrat	19
Abb. 7:	Aminosäure-Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von humanem L1	59
Abb. 8:	PCR des Plasmids pcDNA3-L1-wt als Beispiel mit dem komplementären Primer-Paar hL1-S1248L-hin und hL1-S1248L-rück sowie der Verdau von methylierter Eltern-cDNA durch das Enzym DPN I	61
Abb. 9:	Umklonierungsstrategie	62
Abb. 10:	Beispiel für L1-transfizierte B35-Zellen	64
Abb. 11:	Darstellung des Plasmids pcDNA3-L1-IRES-eGFP	65
Abb. 12:	Vergleich des Expressionsniveaus der verschiedenen B35-L1-Transfektanten mit dem L1 spezifischen Antikörper Neuro4	66
Abb. 13:	Nachweis von biotinyliertem zelloberflächenassoziiertem L1 und Gesamt-L1 in den verschiedenen B35-Transfektanten	68
Abb. 14:	Western Blot von Zellhomogenaten mit und ohne Endoglykosidase H-Behandlung (EndoH -/+)	70
Abb. 15:	Analyse der Phosphorylierung der L1-Mutanten im Vergleich zu L1-wt	71
Abb. 16:	Densitometrische Auswertung des Phosphorylierungsgrades der mutierten L1-Proteine in Relation zu L1-wt	72
Abb. 17:	Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen B35-Transfektanten ohne und mit Ausdifferenzierung der Zellen durch dbcAMP	75
Abb. 18:	Statistische Auswertung der Neuritenlänge und Neuritenanzahl von L1-wt und L1-S1152L exprimierenden B35-Zellen mit und ohne Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP	77
Abb. 19:	Statistische Auswertung der Neuritenlänge und Neuritenanzahl von L1-wt und L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen mit und ohne Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP	79
Abb. 20:	Statistische Auswertung der Neuritenlänge von L1-wt und L1-S1204L sowie L1-S1248L exprimierenden B35-Zellen mit und ohne Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP	81
Abb. 21:	Statistische Auswertung der Neuritenlänge von B35-L1-wt und B35-L1-S1204L/S1248L exprimierenden Zellen ohne und nach der Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP	82
Abb. 22:	Statistische Auswertung der durchschnittlichen Neuritenanzahl der L1-S1204L, L1-S1248L und L1-S1204L/S1248L exprimierenden B35-Zellen im Vergleich zu B35-L1-wt	84
Abb. 23:	Migration von mit L1 oder den verschiedenen L1-Mutanten transient transfizierten parental B35-Zellen	86

Abb. 24: Nachweis der Endocytose von humanem L1 in L1-wt exprimierenden B35-Zellen vor und nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.....	88
Abb. 25: Nachweis der Endocytose von humanem L1 in L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen vor und nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.....	89
Abb. 26: Statistische Auswertung der durchschnittlich endocytosierten Vesikel in nicht ausdifferenzierten (Kontrolle) und ausdifferenzierten (dbcAMP) L1-wt und L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen.....	90
Abb. 27: Western Blots zum Nachweis von aktiviertem erk1/2 (perk1/2) und der Expression von erk1/2 in Homogenaten von L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204/LS1248L und L1-wt exprimierenden B35-Zellen.....	92

## Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Verwendete Materialien und deren Bezugsquelle.....	22
Tab. 2:	Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle.....	23
Tab. 3:	Verwendete Geräte und deren Bezugsquelle.....	24
Tab. 4:	Oligonukleotide zur zielgerichteten Mutagenese.....	34
Tab. 5:	Oligonukleotide für Sequenzierungen.....	34
Tab. 6:	Klonierungsvektoren.....	35
Tab. 7:	Größenstandards für die Agarosegel-Elektrophorese.....	35
Tab. 8:	Proteinstandards für den Western-Blot.....	35
Tab. 9:	Verwendete Zelllinien.....	36
Tab. 10:	Verwendete primäre Antikörper.....	36
Tab. 11:	Verwendete Sekundäre Antikörper.....	36
Tab. 12:	Verwendete Antikörper und deren eingesetzte Konzentration bei der indirekten Immunfluoreszenz.....	49
Tab. 13:	Verwendete Antikörper-Konzentrationen im Western Blot.....	56
Tab. 14:	Zielkonstrukte und in der „QuickChange™ Site-directed Mutagenesis“ eingesetzte Primer.....	60
Tab. 15:	Sequenzausschnitte der fünf Zielkonstrukte zur Überprüfung der eingeführten Mutation.....	63

## Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin	OD	Optische Dichte
Abb.	Abbildung	p	Plasmid
APS	Ammoniumpersulfat	p.a.	In Analysequalität
bp	Basenpaare	PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
BSA	Rinderserumalbumin	PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
bzw.	beziehungsweise	PCR	Polymerasekettenreaktion
C	Cytosin	pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
°C	Grad Celsius		
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen		
dbcAMP	Dibutyryl-cyklisches Adenosinmonophosphat		
Ci	Curie		
CK2	Casein Kinase 2	PLL	Poly-L-Lysin
DMEM	Dulbecco's Modified Medium	RT	Raumtemperatur
DNase	Desoxyribonuklease	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	Sek.	Sekunden
dNTP	2'-desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
E.coli	Escherichia coli	Ser	Serin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	s.o.	Siehe oben
eGFP	Enhanced green fluorescent protein	SV40	Simian Virus 40
et al.	und andere	T	Thymin
evtl.	eventuell	Tab.	Tabelle
FCS	Fötale Kälberserum	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
G	Guanin	TE	Tris-EDTA-Puffer
g	Gramm	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
h	Stunde	U	Enzymeinheit (Unit)
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	Demineralisiertes Wasser	ü. N.	über Nacht
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat	UpM	Umdrehungen pro Minute
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle	UV	Ultraviolett
kb	Kilobasenpaare	V	Volt
kDa	Kilodalton	Vgl.	vergleiche
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium	Vol.	Volumen
L	Liter	v/v	Volumen pro Volumen
M	Molar	wt	Wildtyp
mA	Miliampere	w/v	Gewicht pro Volumen
MCS	Vielfachklonierungsstelle	z. B.	Zum Beispiel
MG	Molekulargewicht		
Min.	Minute		
mM	Milimolar		
µg	Mikrogramm		
µl	Mikroliter		
µm	Mikrometer		
nm	Nanometer		

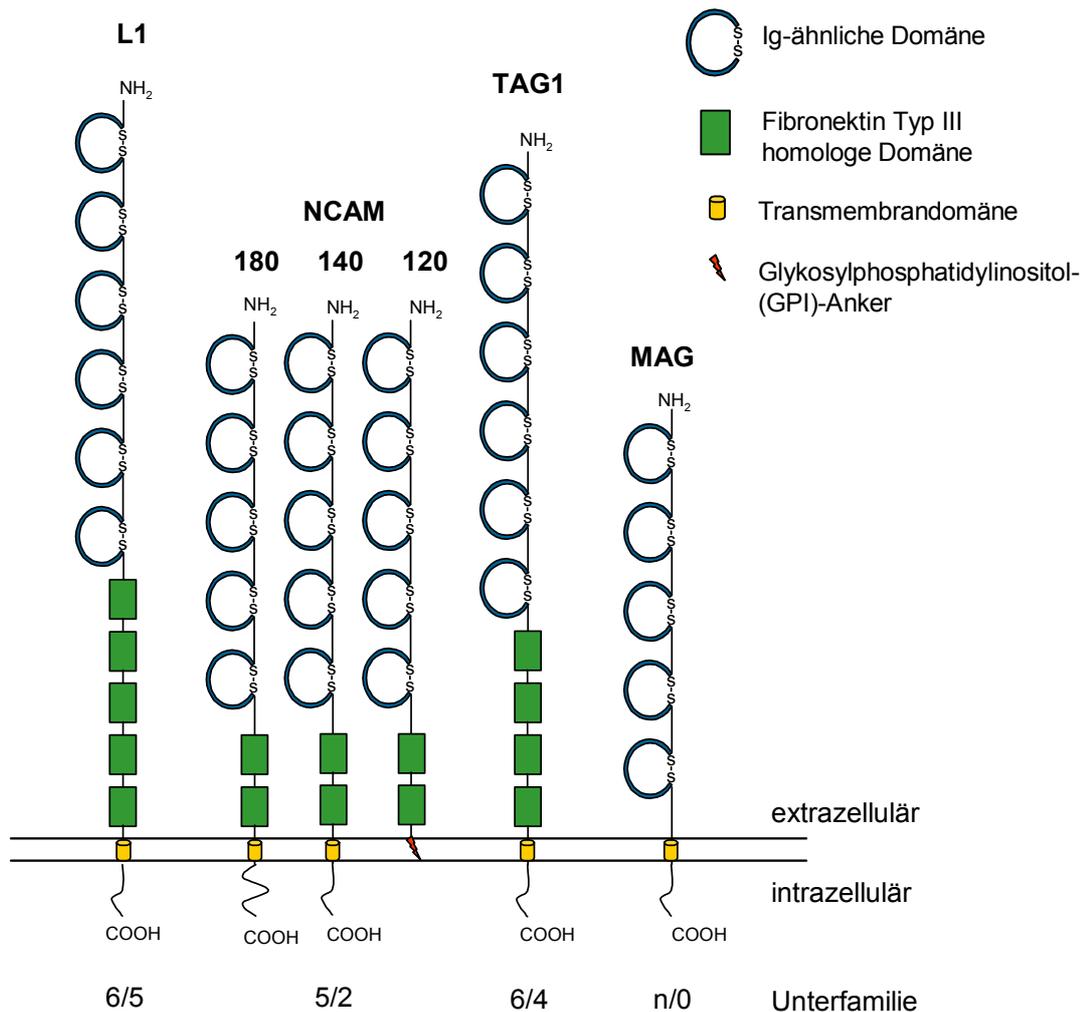
## Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

# 1 Einleitung

## 1.1 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind Transmembran-Glykoproteine, die besonders bei Zell-Zell und Zell-Extrazellulärmatrixinteraktionen eine Rolle spielen. Adhäsionsmoleküle des Nervensystems lassen sich aufgrund von Strukturhomologien in drei Hauptfamilien einteilen. Die erste wird als Immunglobulin (Ig)-Superfamilie bezeichnet, da Vertreter dieser Familie mindestens eine Ig-ähnliche Domäne besitzen. Diese Zelladhäsionsmoleküle vermitteln  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Zell-Zell-Adhäsion. In der Regel bestehen die Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kürzeren cytoplasmatischen Domäne. Einige Mitglieder wie z. B. TAG-1 oder NCAM120 sind über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker in die Zellmembran integriert. Außerdem enthalten viele Mitglieder wie z.B. L1 und NCAM zusätzlich noch Fibronectin Typ III homologe Domänen in ihrer extrazellulären Domäne (Walsh et al., 1997). In Abhängigkeit von der Anzahl der Ig-Domänen und der Fibronectin Typ III homologen Domänen lassen sich die Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie in verschiedene Unterklassen aufteilen (siehe Abb. 1). Viele Proteine der Ig-Superfamilie weisen homophile und heterophile Bindungseigenschaften auf. Diese können entweder zwischen zwei verschiedenen Zellen stattfinden wie z.B. L1-L1- oder NCAM-NCAM-Interaktionen (trans-Interaktion) oder innerhalb der Membran einer Zelle vorkommen, wie beispielsweise die Interaktion zwischen dem FGF-Rezeptor (FGFR) und NCAM oder L1 (cis-Interaktion). Die Bindung erfolgt meistens über die Ig-ähnlichen Domänen.



**Abb. 1: Schematische Darstellung von einigen Mitgliedern der Ig-Superfamilie.**

Die im Nervensystem vorkommenden Zelladhäsionsmoleküle werden entsprechend ihrer Anzahl von Ig-ähnlichen Domänen und Fibronektin Typ III homologen Domänen in verschiedene Unterfamilien eingeteilt. So befindet sich in der 6/5 Unterfamilie z.B. L1CAM, welches aus sechs Ig-ähnlichen Domänen und 5 Fibronektin Typ III homologen Domänen besteht. Zur n/0-Unterfamilie werden Adhäsionsmoleküle gezählt, die eine unterschiedliche Anzahl von Ig-ähnlichen Domänen und keine Fibronektin Typ III homologe Domänen besitzen (modifiziert nach Crossin et al., 2000).

Als zweite Hauptfamilie sind die Cadherine zu nennen, wobei N-Cadherin eine wichtige Funktion im Nervensystem hat. Die meisten Cadherine haben wie die Mitglieder der Ig-Superfamilie nur eine Transmembrandomäne, und der extrazelluläre Teil besteht in der Regel aus fünf ähnlichen Domänen, von denen drei Bindungsstellen für Calcium enthalten. Cadherine bilden Dimere aus und vermitteln die Zell-Zell-Adhäsion durch einen homophilen Mechanismus.

Intrazellulär sind sie über Adaptermoleküle (Catenine, Vinculin) mit Aktin-Filamenten verbunden (Ivanov et al., 2001).

Bei der dritten Hauptfamilie, die der Integrine, handelt es sich um heterodimere Transmembranproteine, die sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammensetzen. Die Integrine vermitteln Interaktionen zwischen Zellen und Molekülen der extrazellulären Matrix wie Laminin und Fibronectin. Je nach Integrin-Typ hängt die Bindung zwischen Integrinen und ihren Liganden von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  ab, denn der extrazelluläre Teil der  $\alpha$ -Kette enthält Bindungsstellen für zweiwertige Kationen. Durch die Kombination von insgesamt 18  $\alpha$ -Untereinheiten mit acht verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten umfasst die Integrin-Familie bisher 24 Mitglieder mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften (van der Flier et al., 2001). Integrine können auch cis-Interaktionen z. B. mit L1 eingehen (siehe 1.2.4).

## 1.2 Das Zelladhäsionsmolekül L1

Das humane Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein Glykoprotein mit 1257 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 200 bis 220 kDa. L1 setzt sich aus sechs Ig-ähnlichen Domänen und fünf Fibronectin Typ III homologen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Domäne zusammen. Es ist ein zwischen Spezies hoch konserviertes Molekül. Die Aminosäuresequenz des extrazellulären Teils ist in Säugern zu 80-95% homolog, während die Aminosäuresequenz der cytoplasmatischen Domäne in Mensch, Maus und Ratte sogar zu 100% übereinstimmt. Neben NrCAM und Neurofascin in Säugern konnten zu L1 homologe Moleküle auch in anderen Spezies gefunden werden, wie z.B. das NgCAM (neuron-glia CAM) im Huhn, das E587 Molekül im Goldfisch, das L1.1 und L1.2 im Zebrafisch oder Neuroglian in Drosophila (zusammengefasst in Hortsch, 1996).

### 1.2.1 Expression und Funktion des Zelladhäsionsmoleküls L1

L1 hat während der Entwicklung des Nervensystems sowie im adulten Gehirn vielfältige Funktionen. Während der frühen Entwicklung des Zentralnervensystems wird L1 von postmitotischen Neuronen und unreifen Astrozyten exprimiert (Fushiki und Schachner, 1986; Persohn und Schachner 1987; Saad et al., 1991). Es wird während der Migration von Neuronen zu ihrer Zielposition im sich entwickelnden Gehirn exprimiert und nach der Migration in auswachsenden Axonen und in sich zu Faszikeln bündelnden Nervenfasern. Im peripheren Nervensystem wird L1 auch von Schwannzellen synthetisiert. L1 ist im adulten Gehirn bei der Induktion der Langzeitpotenzierung sowie Vorgängen im Zusammenhang mit Erinnerungs- und Lernprozessen beteiligt.

### 1.2.2 Spleißvarianten von L1

L1 wird von einem singulären Gen codiert und ist beim Menschen auf dem X-Chromosom (Xq28) lokalisiert. Es besteht aus 29 Exons, von denen 28 Exons das Protein kodieren, während Exon 1a eine 5' untranslatierte Sequenz enthält (Kallunki et al., 1997). Aufgrund alternativer Spleißvorgänge entstehen zwei Isoformen von L1, die zell- und gewebespezifisch exprimiert werden. In Neuronen wird hauptsächlich die 28 Exons umfassende L1-Form synthetisiert (Takeda et al., 1996), während in nicht-neuronalen Zellen Exon 2 und Exon 27 fehlen. Diese verkürzte L1-Form findet man in nicht-neuronalen Zellen wie z.B. in Schwannzellen, auf Epithelzellen des Dünndarms oder auf Leukozyten des Immunsystems.

In menschlichen neuronalen Zellen kodiert das Exon 2 eine Sequenz von sechs Aminosäuren (YEGHHV), welche im N-Terminus in unmittelbarer Nähe der ersten Ig-Domäne lokalisiert ist. Die Bedeutung dieser L1-Sequenz für die normale Entwicklung des Gehirns wird dadurch deutlich, dass Mutationen in diesem Bereich zu neurologischen Störungen beim Menschen führen (Jouet et al., 1995; Finckh et al., 2000). Jacob et al. (2002) konnten in Bindungsstudien eine verminderte homophile Bindung von L1 an ein L1-Konstrukt ( $\Delta 2L1$ ), bei dem die

von Exon 2 kodierenden Aminosäuren deletiert worden waren, zeigen. Gleichzeitig wurde eine starke Reduktion des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen nachgewiesen.

Exon 27 kodiert für die vier Aminosäuren RSLE, die etwa in der Mitte des C-Terminus von L1 inseriert werden (Miura et al., 1991; siehe Abb. 5). Die Bedeutung dieser Sequenz wird dadurch deutlich, dass sie über eine evolutionäre Spanne von  $430 \times 10^6$  Jahre hinweg konserviert ist, denn sie wurde bereits beim Kugelfisch Fugu nachgewiesen (Coutelle et al., 1998). Zusammen mit einem vorgeschalteten Tyrosin (Tyr-1176) entsteht eine Konsensussequenz für Rezeptortyrosinkinasen (YRSL-Sequenz), deren phosphorylierte Funktion noch nicht genau bekannt ist. Peptidanalysen von Schaefer et al. (2002) konnten zeigen, dass Tyr-1176 *in vitro* von der Kinase pp60<sup>c-src</sup> phosphoryliert werden kann. In nicht phosphorylierter Form stellt die YRSL-Sequenz ein Endocytosesignal dar, das für die Clathrin vermittelte Endocytose von L1 von Bedeutung ist (Kamiguchi et al., 1998; Long et al., 2001; Schaefer et al., 2002). Die YRSL-Sequenz ist außerdem ein axonales Sortierungssignal und so für den direkten Transport von L1 in den Wachstumskegel von Nervenzellen verantwortlich (Vogt et al., 1996; Kamiguchi und Lemmon, 1998).

### **1.2.3 Mutationen im L1 Gen führen zu schweren neurologischen Störungen**

Mutationen im humanen L1 Gen führen zu einem breiten Spektrum an neurologischen Störungen. Das HSAS-Syndrom (Hydrocephalus due to Stenosis of the Aqueduct of Sylvius; Bickers und Adams, 1949) konnte zuerst mit Mutationen im L1 Gen in Zusammenhang gebracht werden (Rosenthal et al., 1992). Etwas später konnten auch die Krankheitsbilder des MASA-Syndroms (Mental retardation, Aphasia, Shuffling gait, Adducted thumbs; Biachine und Lewis, 1974), von SP1 (Spastic Paraplegia; Jouet et al., 1994) und von ACC/DCC (Corpus Callosum Agenesis/Dysgenesis; Vits et al., 1994) auf Mutationen im L1 Gen zurückgeführt werden. Das klinische Spektrum der neurologischen Störungen

von HSAS, MASA, SP1 und ACC/DCC wurde aufgrund ihrer am häufigsten vorkommenden Symptome als CRASH-Syndrom (Corpus callosum agenesis, Retardation, Adducted thumbs, Shuffling gait, Hydrocephalus) zusammengefasst (Fransen et al., 1996).

Die Inzidenz für das Auftreten von Neugeborenen mit Mutationen im L1 Gen liegt bei etwa 1:30000 männlichen Geburten (Halliday et al., 1986). In der Regel zeigen die Patienten ein breites klinisches Spektrum an neurologischen Störungen. Der Schweregrad dieser Störungen kann bei Patienten mit unterschiedlichen L1-Mutationen sehr stark variieren. Außerdem können Patienten mit der gleichen L1-Mutation unterschiedlich starke neurologische Störungen aufweisen (Serville et al., 1992).

Bisher wurden über 140 verschiedene pathogene L1-Mutationen in allen Bereichen des L1-Gens identifiziert. Die meisten Mutationen sind auf einzelne Familien beschränkt, eine regelmäßig aktualisierte Liste der L1-Mutationen findet man auf der folgenden Web-Seite: <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/l1/> (Van Camp et al., 1996). Die Analyse der L1-Mutationen zeigte, dass die Mutationen auf Punkt-, Deletions- oder Insertions-Mutationen zurückgeführt werden können. Diese Mutationen können zum Aminosäure-Austausch, -Verlust, oder -Einschub führen, gleichzeitig eine Veränderung des Leserasters bewirken oder den Spleißmechanismus beeinflussen.

Der Schweregrad der vielfältigen neurologischen Störungen kann sich aufgrund des Typs und der Lokalisation der Mutation auf dem L1-Gen erheblich unterscheiden (Weller und Gartner, 2001; Yamasaki et al., 1997; Fransen et al., 1998 b). Mutationen, die verkürzte extrazelluläre L1-Domänen bewirken, gehen in der Regel mit einem Verlust der Proteinfunktion einher und führen zu den schwersten neurologischen Störungen (Yamasaki et al., 1997). Der Austausch von Aminosäuren in der extrazellulären Domäne kann entweder Konformationsänderungen von L1 und damit sehr schwere neurologische Störungen verursachen oder aber die Proteinstruktur weniger beeinflussen und so zu mildereren Krankheitsausprägungen führen. Mutationen in der cytoplasmatischen Domäne können Störungen von intrazellulären Signalwegen bewirken, verhindern aber nicht homo- oder heterophile extrazelluläre Interaktionen und führen deshalb in der Regel zu mildereren Krankheitssymptomen (Wong et al., 1995; Hortsch et al., 1995).

Unabhängig voneinander wurden in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen L1 knock-out Mäuse hergestellt (Dahme et al., 1997; Cohen et al., 1997). Beide Maus-Linien zeigen einen ähnlichen Phänotyp, wie er auch bei Menschen mit Mutationen im L1 Gen gefunden wurde. Die Analyse dieser Mäuse ermöglicht daher *in vivo* einen wichtigen Einblick in die Funktionen von L1 (Dahme et al., 1997; Cohen et al., 1997; Fransen et al., 1998; Demyaneko et al., 1999).

### 1.2.4 Bindungseigenschaften von L1

Die Beteiligung von L1 an einer Vielfalt von Prozessen im zentralen und peripheren Nervensystem ist möglicherweise mit der großen Anzahl an möglichen Bindungspartnern, den mit L1 assoziierten Signalwegen und den möglichen posttranslationalen Modifikationen von L1 zu erklären. Die homophile trans-Interaktion von L1-Molekülen auf zwei benachbarten Zelloberflächen wird als die hauptsächliche L1-Funktion angesehen, die vor allem für die Stimulierung des Wachstums von Nervenfasern (in Zellkultur: Neuriten) eine wichtige Rolle spielt (Lemmon et al., 1989; Miura et al., 1992). Zhao und Siu (1995) zeigten, dass die 2. Ig-Domäne für den homophilen Bindungsmechanismus essentiell ist. In anderen Studien hingegen konnten mehrere Domänen identifiziert werden, die für homophile Interaktionen von Bedeutung sind (Appel et al., 1993; Holm et al., 1995).

Es konnten außerdem viele Liganden identifiziert werden, die heterophile Bindungen mit L1 eingehen. Hierzu zählen F3/F11/Contactin (Brümmendorf et al., 1993), TAG-1/Axonin-1 (Kuhn et al., 1991; Kunz et al., 1996 und 2002), DM-GRASP (DeBernado und Chang, 1996), die Proteoglykane Neurocan und Phosphacan (Milev et al., 1994; Friedlander et al., 1994), NCAM (Horstkorte et al., 1993), CD24 (Kadmon et al., 1995) und Laminin (Grumet et al., 1993). Außerdem befindet sich in der 6. Ig-Domäne von L1 eine RGD (Arg-Gly-Asp)-Sequenz, die mit einigen Integrinen wie z.B. dem Fibronectin Rezeptor ( $\alpha_5\beta_1$ ) und dem Vitronectin Rezeptor ( $\alpha_v\beta_3$ ) Bindungen eingehen kann (Ruppert et al., 1995; Ebeling et al., 1996; Montgomery et al., 1996; Felding-Habermann et al., 1997). Silletti et al. (2000) identifizierten für das Integrin  $\alpha_9\beta_1$  eine RGD-unabhängige Bindungsstelle in der 3. Fibronectin Typ III homologen Domäne. Die Funktionen

der heterophilen Bindungen von L1 sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass einige heterophile Bindungspartner die Wirkung der L1-L1-Interaktion verstärken können. So scheint die heterophile cis-Bindung von L1 und TAG-1/Axonin-1 eine Rolle bei dem L1-abhängigen Neuritenwachstum zu spielen (Buchstaller et al., 1996; Rader et al., 1996). Andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die cis-Interaktion von L1 und NCAM die L1 trans-Interaktion und damit die L1 stimulierte Zellaggregation und das Neuritenwachstum verstärkt, gleichzeitig scheint eine NCAM-L1-cis-Interaktion auch für das basale Neuritenwachstum von Bedeutung zu sein (Kadmon et al., 1990 a; Simon et al. 1991; Horstkorte et al., 1993; Heiland et al., 1998).

Außerdem wurde gezeigt, dass L1 mit Neuropilin-1 interagiert und für die Bildung des Sema3A-Komplexes benötigt wird (Castellani et al., 2000; Castellani et al. 2002). Intrazellulär interagiert L1 mit Ankyrin und Aktin (Davis et al., 1993; Davis und Bennett, 1994; Dahlin-Huppe et al., 1997).

### 1.2.5 Glykosylierung von L1

Die extrazelluläre Domäne von L1 enthält 22 potentielle N-Glykosylierungsstellen. Welche der Glykosylierungsstellen genutzt werden ist allerdings noch unbekannt. Bisher konnten auf L1 drei verschiedene Kohlenhydratstrukturen nachgewiesen werden. Das L2/HNK-1 Epitop wird außer auf L1 (Faissner, 1987) auch auf anderen Zelladhäsionsmolekülen wie z.B. NCAM, MAG, P0 und Integrinen exprimiert (Kruse et al., 1984; Poltorak et al., 1987; Bollensen und Schachner, 1987; Pesheva et al., 1987). Es enthält eine sulfatierte Glucuronsäure und ist im Nervensystemen in Zellerkennungs- und Adhäsionsvorgänge, wie z.B. an der homophilen Bindung von P0, involviert (Chou et al., 1986; Griffith et al., 1992; Schmitz et al., 1994). Außerdem konnte ein N-glykosidisch gebundenes oligomannosidisches Glykan (L3-Epitop) sowohl auf L1, als auch auf MAG und AMOG nachgewiesen werden (Fahrig et al., 1990; Schmitz et al., 1993). Interessanterweise wird die cis-Interaktion von L1 und NCAM durch Kohlenhydrate vermittelt (Kadmon et al., 1990 b). Hierbei scheinen die von L1 exprimierten oligomannosidischen Kohlenhydrate mit der 4. Ig-ähnlichen Domäne von NCAM zu interagieren (Horstkorte et al., 1993). Für das basale, also unstimulierte d. h.

zellautonome Neuritenwachstum spielt die L1-NCAM-Interaktion *in vitro*, d.h. In Zellkultur eine wichtige Rolle, da die Inkubation von auf poly-L-Lysin kultivierten Kleinhirnneuronen mit oligomannosidischen Kohlenhydraten oder einem synthetischen Peptid aus der vierten Ig-ähnlichen Domäne von NCAM zu einer starken Inhibierung des Neuritenwachstums führte (Horstkorte et al., 1993). Dies war gleichzeitig mit einer reduzierten Phosphorylierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 verbunden (Heiland et al., 1998). Die cis-Interaktion zwischen L1 und NCAM ist auch bei der Langzeitpotenzierung von Bedeutung (Luthl et al., 1994). Als weitere Kohlenhydratstruktur wurde das L5-Epitop identifiziert, welches bisher außer auf L1 auch auf Thy-1 und Astrochondrin detektiert werden konnte (Streit et al., 1990). L5 hat eine Lewis<sup>x</sup>-ähnliche Struktur (Trisaccharid aus Fukose, Galaktose und N-Acetylglukosamin) und scheint insbesondere bei der Neuralinduktion eine Rolle zu spielen (Roberts et al., 1991; Streit et al., 1996).

Die an L1 gebundenen Glykane machen etwa 20 bis 35 % seines Molekulargewichtes aus. Eine Deglykosylierung führt zu einer Reduktion des Molekulargewichts von 200 kDa auf etwa 150 kDa (Lindner et al., 1983).

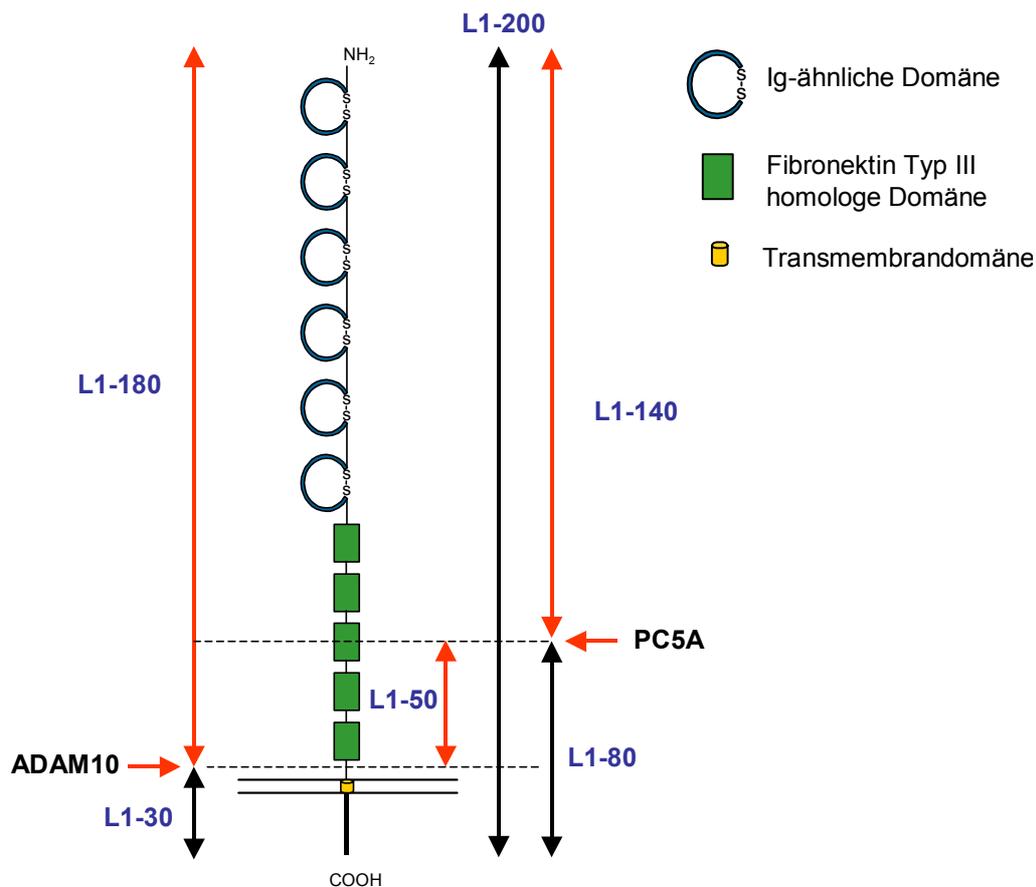
### 1.2.6 Spaltprodukte von L1 und deren Funktion

L1, dessen Molekulargewicht je nach Zelltyp-spezifischer Glykosylierung zwischen 200 und 220 kDa variiert, kann in Fragmente unterschiedlicher Größe gespalten werden. Neben einer Bande von 180 kDa (L1-180) konnte aus adultem Maushirn eine dominante Bande von 140 kDa (L1-140) und schwächere Banden von 80 und 50 kDa detektiert werden (Faissner et al., 1984 und 1985; Rathjen und Schachner et al., 1984). *In vitro* Experimente zeigten, dass die Spaltung in der 3. Fibronectin Typ III homologen Domäne von L1 durch Trypsinbehandlung oder die Behandlung mit Plasmin zu den 140 und 80 kDa Fragmenten führte, während L1 durch Phospholipase C abhängige Proteolyse in Fragmente von 180, 50 und 30 kDa gespalten wird (Sadoul et al., 1988; Silletti et al., 2000). Weitere Arbeitsgruppen konnten die Bildung von L1 Fragmenten (L1-200, L1-150, L1-85, L1-32) in unterschiedlichen Zelllinien nachweisen. Die Sekretion von L-200 konnte auf die Spaltung der membranständigen 220 kDa Form von L1 durch die ADAM10 (a

disintegrin and metalloprotease) zurückgeführt werden (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000 und 2003; Mechtersheimer et al., 2001). Kalus et al. (2003) identifizierten ebenfalls in der dritten Fibronektin Typ III homologen Domäne von L1 eine Konsensus-Sequenz für Protein Convertasen und wiesen nach, dass die Protein Convertase 5A (PC5A) L1 an der Aminosäure 845 (Arg<sup>845</sup>, Maus) spaltet und so die Sekretion von L1-140 bewirkt.

Die möglichen biologischen Funktionen von sezernierten L1 Spaltprodukten sind noch nicht vollständig geklärt. Neben der Beteiligung von L1 am Neuritenwachstum und der Migration von Neuronen wurde die Expression von L1 und die Bildung von L1 Spaltprodukten auch in verschiedenen Tumorzelllinien (z.B. in Neuroblastom-Zellen, Melanom-Zellen, Lungentumor-Zellen) nachgewiesen, was auf eine mögliche Rolle von L1 für Adhäsion und Migration von Tumorzellen während der Krebsentstehung und Metastasierung hinweist (Linnemann et al., 1988; Patel et al., 1990; Reid und Hemperly, 1992; Montgomery et al., 1996; Katayama et al., 1997; Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000; Deichmann, 2003).

*In vitro* Experimente zeigten, dass die durch die ADAM10 gebildete lösliche Form von L1 für die Migration essentiell ist (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000; 2003). Die Stimulation der Migration von mit L1-transfizierten und auf Fibronektin oder Laminin kultivierten CHO-Zellen konnte auf die Interaktion von löslichem L1 mit  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  Integrinen zurückgeführt werden (Mechtersheimer et al., 2001). Gleichzeitig gibt es Hinweise, dass die Spaltung von L1 durch Metalloproteasen für das L1-stimulierte Neuritenwachstum von Bedeutung ist (Kalus et al., 2003). Das Schneiden von L1 in der dritten Fibronektin Typ III homologen Domäne durch PC5A oder Plasmin führt zu einer Reduktion der RGD-unabhängigen Integrinbindung (Silletti et al., 2000). Interessanterweise scheint L1-140 sehr stark mit dem vollständigen L1 (L1-200) assoziiert vorzuliegen. Kalus et al. (2003) zeigten, dass die Sekretion von L1-140 sowie von L1-180 und L1-50 erst nach der Spaltung von L1-200 und L1-80 durch eine Metalloprotease (ADAM10) stattfindet.



**Abb. 2: Schematische Darstellung von L1 und seinen proteolytischen Spaltprodukten.**

Die Spaltung von L1 (L1-200) in der dritten Fibronektin Typ III homologen Domäne durch Protein Convertase 5A (PC5A) führt zu Sezernierung von L1-140 und zur Bildung des membranständigen L1-80. Das Schneiden von L1-200 und L1-80 in der Nähe der Membran durch ADAM10 führt zur Bildung von L1-180 und L1-50, außerdem bleibt ein kurzes L1-Fragment (L1-30) in der Membran zurück (modifiziert nach Gutwein et al., 2003 und Kalus et al., 2003).

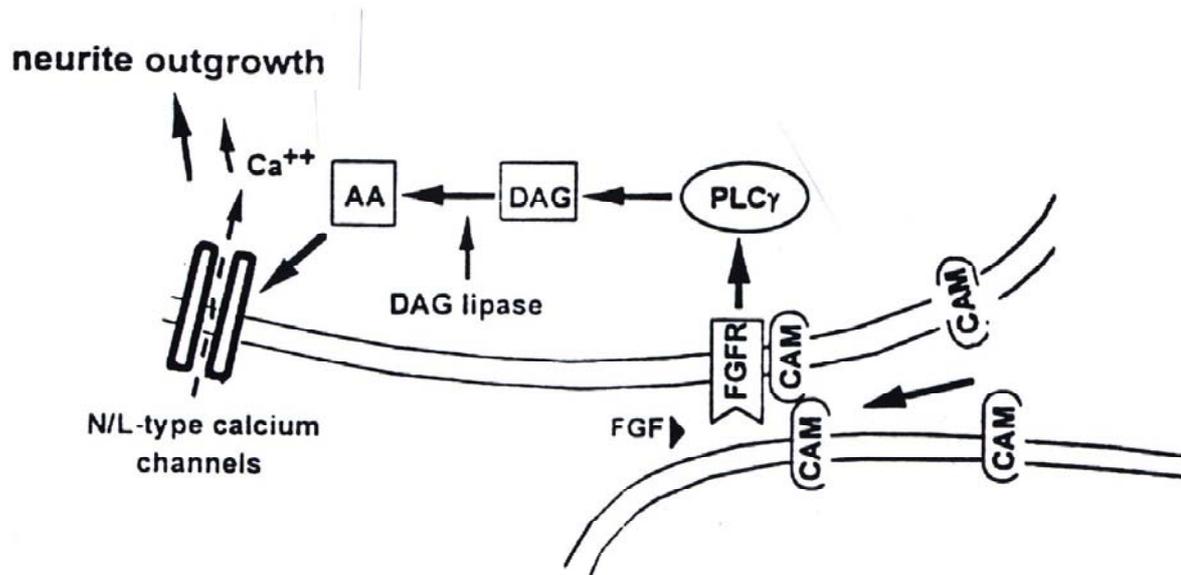
## 1.2.7 L1 vermittelte intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen

### 1.2.7.1 L1 vermittelte FGFR Signalweiterleitung

Adhäsionsmoleküle üben ihre Funktion nicht nur über ihre adhäsiven Eigenschaften aus. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass insbesondere das Neuritenwachstum auf unterschiedlichen Substraten wie Fibronektin, Laminin

oder L1 vielmehr auf die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen zurückzuführen ist (Gundersen 1987; Skubitz et al., 1991; Lemmon et al., 1992; Kuhn et al., 1995). Doherty et al. (1995) wiesen nach, dass ein rekombinant hergestelltes lösliches L1-Konstrukt, das an die konstante Domäne eines Antikörpers gebunden war (L1-Fc), das Neuritenwachstum von Neuronen in Kultur genauso stimuliert wie immunaffinitätsaufgereinigtes L1, das als Substrat für die Neuronen angeboten wurde (siehe auch Williams et al., 1995). Auch bei der Zugabe von Laminin in Lösung zeigte sich eine Zunahme der Neuritenlänge (Rivas et al., 1992). Dies deutet auf die Aktivierung von second messenger Systemen als Folge von Protein-Protein Wechselwirkungen hin.

Ein Interaktionspartner für L1 ist der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR). Untersuchungen zeigten, dass für L1 stimuliertes Neuritenwachstum ein intakter FGFR benötigt wird. Außerdem konnte der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) das Neuritenwachstum genauso stimulieren, wie L1-L1-trans-Interaktionen, woraus geschlossen werden konnte, dass L1 den FGFR aktiviert, d. h. eine FGFR abhängige Signalkaskade auslöst (Doherty et al., 1995; Doherty und Walsh, 1996; Brittis et al., 1996; Saffel et al., 1997). Es wird postuliert, dass eine L1-L1-trans-Interaktion zu einer cis-Bindung des FGFR und damit zur Aktivierung der Tyrosinkinase-Domäne des FGFR führt (Doherty und Walsh, 1996; Saffel et al., 1997). Nach der Autophosphorylierung der Tyrosinreste der cytoplasmatischen Domäne des FGFR verläuft die Signalkaskade über die Aktivierung von Phospholipase  $C\gamma$  ( $PLC\gamma$ ), welche Phosphatidylinositolbisphosphat zu Inositoltrisphosphat und Diacylglycerol hydrolysiert. Darauf folgt die Freisetzung von Arachidonsäure aus Diacylglycerol durch eine Diacylglycerol-Lipase. Arachidonsäure bindet an spannungsgesteuerte Calciumkanäle und bewirkt deren Öffnung. Dadurch wird ein Calciumeinstrom ausgelöst, der letztendlich das Neuritenwachstum durch bisher noch unbekannte Mechanismen stimuliert (Hall et al., 1996; Doherty und Walsh, 1996; Brittis et al., 1996; Saffel et al., 1997; Walsh and Doherty, 1997). Während eine direkte Interaktion von NCAM und dem FGFR gezeigt wurde (Kiselyov et al., 2003), ist bis heute noch keine unmittelbare Bindung von L1 an den FGFR nachgewiesen worden.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der CAM-vermittelten FGFR Signalweiterleitung.**

Die homophile trans-Interaktion zwischen CAMs kann zu einer cis-Interaktion dieser CAMs mit dem FGFR führen, wodurch dieser aktiviert wird. Die dadurch ausgelöste Signalkaskade führt schließlich zum Einstrom von Calcium durch spannungsgesteuerte Calciumkanäle und stimuliert das Neuritenwachstum durch einen noch unbekanntem Mechanismus. AA, Arachidonsäure; DAG, Diacylglycerol; FGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor; FGFR, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor; PLC $\gamma$ , Phospholipase C $\gamma$  (modifiziert nach Viollet und Doherty, 1997).

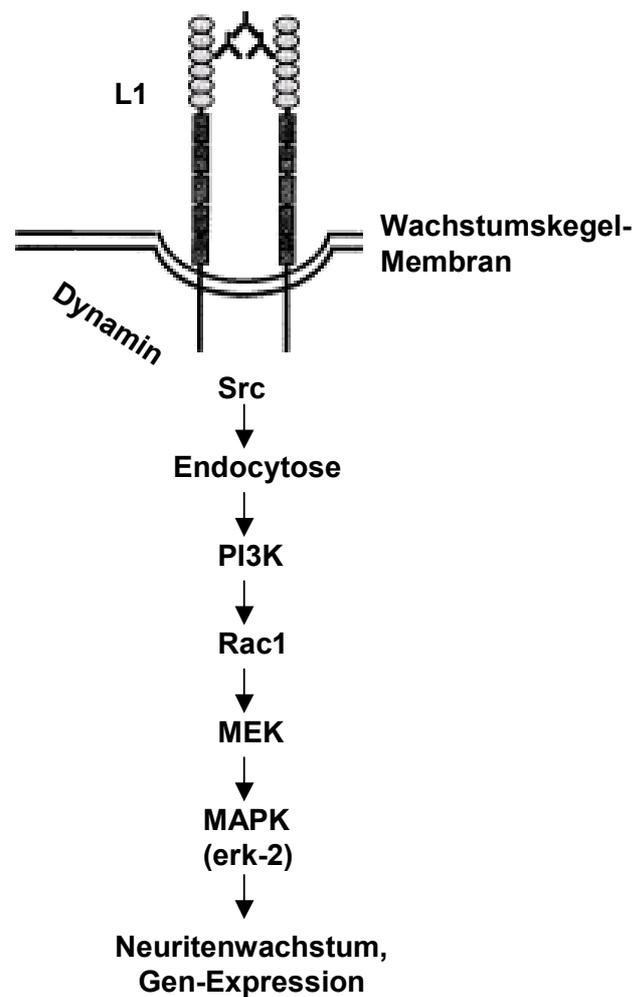
### 1.2.7.2 Signalweiterleitung durch die cytoplasmatische Domäne von L1

Der durch L1 aktivierte FGFR Signalweg wird – so wird zumindest bisher vermutet – ausschließlich durch die cytoplasmatische Domäne des FGFRs weitergeleitet. Es ist allerdings auch bekannt, dass die cytoplasmatische Domäne von L1 direkt an Signaltransduktionsmechanismen beteiligt sein kann. Der aus 114 Aminosäuren bestehende C-Terminus von L1 ist die am stärksten konservierte Domäne zwischen L1-ähnlichen Molekülen aller Spezies und ist in Maus, Ratte und Mensch sogar völlig identisch. Seine funktionelle Bedeutung wird dadurch hervorgehoben, dass schon der Austausch oder der Verlust von nur einer Aminosäure beim Menschen zu neurologischen Störungen führen kann. Mehrere Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne von L1 wurden als phosphoryliert

nachgewiesen. Ser-1152 wird von der Kinase p90<sup>rsk</sup>, Ser-1181 von der Casein Kinase 2 (CK2) und die Ser-1204 und Ser-1248 von der MAPKinase erk2 (extracellular signal-regulated kinase) phosphoryliert (Wong et al., 1995; Wong et al., 1996 b; Schmid et al., 1999 und 2000; siehe 1.2.8). Obwohl die cytoplasmatische Domäne von L1 noch weitere Serine enthält, kann aufgrund der Untersuchungen von Wong et al. (1996 a, b) davon ausgegangen werden, dass keine weiteren Serinreste von L1 phosphoryliert werden. Die Bedeutung der Phosphorylierung dieser Aminosäuren speziell für das Neuritenwachstum ist noch weitgehend unbekannt. Außerdem kann L1 an Tyrosin phosphoryliert werden, wie erstmals Heiland et al. (1996) nachweisen konnten.

Im Huhn konnte gezeigt werden, dass L1 von der Rezeptortyrosin-Kinase Cek5 (chicken embryo kinase 5) phosphoryliert wird, die zur Ephrin (Eph) Kinase-Familie gehört, im Gehirn weit verbreitet ist und insbesondere bei der Faszikulation von Neuriten eine Rolle zu spielen scheint (Zisch et al., 1997; Zisch und Pasquale, 1997; Holland et al., 1998).

Ignelzi et al. (1994) identifizierten einen L1 abhängigen Signalweg, in welchen die nicht-Rezeptortyrosin-Kinase pp60<sup>c-src</sup> involviert ist. Experimente zeigten, dass das Neuritenwachstum von src-defizienten Mausneuronen auf einem L1-Substrat im Vergleich zu einem NCAM-Substrat deutlich vermindert ist (Ignelzi et al., 1994; Beggs et al., 1994). Mehrere Arbeitsgruppen wiesen in verschiedenen Zellkultursystemen nach, dass die Dynamin-abhängige Endocytose von L1 von der Kinase pp60<sup>c-src</sup> abhängig ist und L1 über die PI3-Kinase und die GTPase Rac den MAP-Kinaseweg aktivieren kann (Schaefer et al., 1999; Schmid et al., 2000, siehe Abb. 4). Etwas später zeigten *in vitro* Experimente, dass der C-Terminus von L1 durch pp60<sup>c-src</sup> am Tyr-1176 phosphoryliert werden kann (Schaefer et al., 2002).



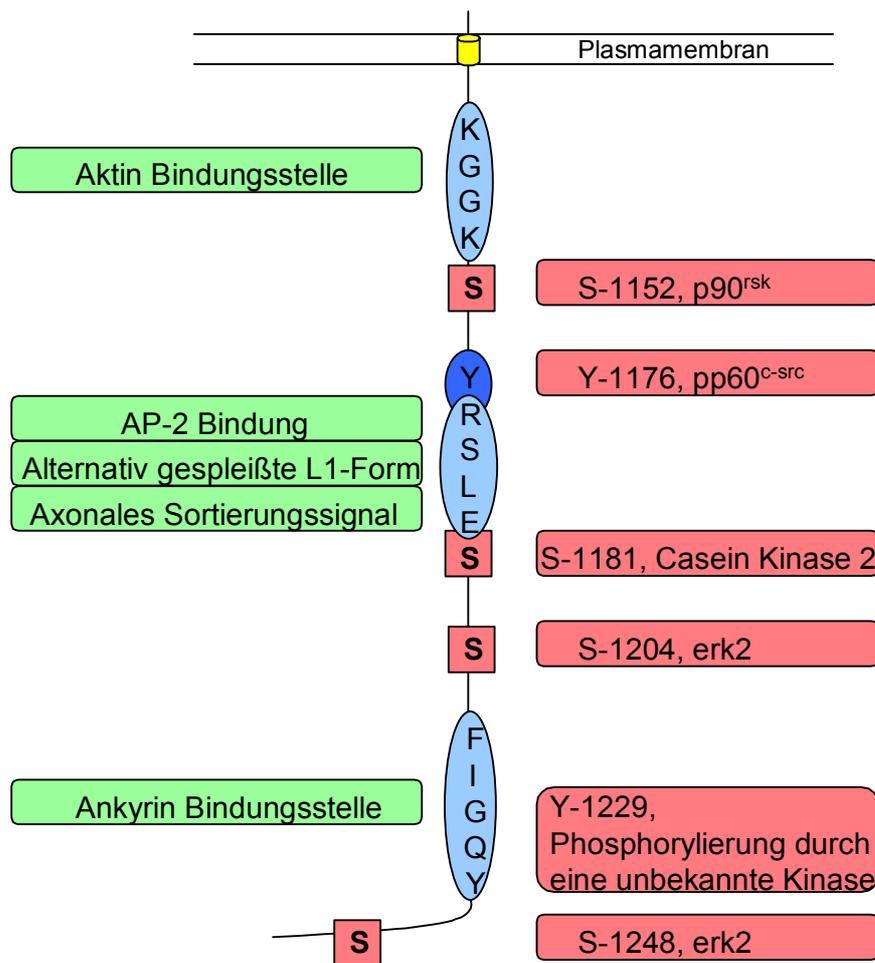
**Abb. 4: Beispiel für einen L1 vermittelten Signalweg.**

Die Dynamin vermittelte, durch Antikörper ausgelöste Endocytose von L1 wird durch die Aktivität der Kinase pp60<sup>c-src</sup> reguliert und kann über die PI3-Kinase, Rac, MEK schließlich den MAPK-Signalweg aktivieren (modifiziert nach Schmid et al., 2000).

Eine direkte Interaktion mit Ankyrin konnte für L1 sowie für alle Mitglieder der L1 Familie (L1, Neurofascin, NrCAM, Neuroglian) gezeigt werden (Davis et al., 1993; Davis und Bennett 1994; Kamiguchi und Lemmon, 1997). Die Ankyrin Familie besteht aus drei Mitgliedern (Ankyrin<sub>A</sub>, Ankyrin<sub>G</sub> und Ankyrin<sub>B</sub>), von denen im Nervensystem hauptsächlich Ankyrin<sub>G</sub> und Ankyrin<sub>B</sub> exprimiert werden (Kunimoto et al., 1998; Bennett und Chen, 2001). In der cytoplasmatischen Domäne von humanem L1 wurde die in allen Spezies hochkonservierte Aminosäuresequenz FIGQY<sup>1229</sup> als Bindestelle für Ankyrin identifiziert (siehe Abb. 5). Da Ankyrin mit dem Spektrin-Aktin-Netzwerk assoziiert, stellt es eine Verbindung von L1 mit dem Aktin-Cytoskelett her. Die Phosphorylierung von Tyr-1229 verhindert die Bindung

von Ankyrin an L1 und scheint so deren Interaktion zu regulieren (Garver et al., 1997; Hortsch et al., 1998). Interessanterweise entwickeln Ankyrin<sub>B</sub> knock-out Mäuse einen ähnlichen Phänotyp wie L1 knock-out Mäuse und weisen vergleichbare neurologische Störungen wie Patienten mit L1-Mutationen auf (Scotland et al., 1998). Auch die Mutation Tyr-1229 in der Ankyrin-Bindungsdomäne von L1, durch die phosphoryliertes Tyrosin nachgeahmt wird (Y1229H), führt beim Menschen zu den typischen Krankheitssymptomen (Van Camp et al., 1996). Es wird diskutiert, dass die Interaktion von L1 mit Ankyrin die L1 abhängige Adhäsion stabilisiert und daher eine wichtige Rolle bei der Regulation der L1 abhängigen Adhäsion und Migration spielt (Gil et al., 2003).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass L1 in Wachstumskegeln von DRG (dorsal root ganglion) Neuronen mit Aktin-Filamenten kolokalisiert (Letourneau und Shattuck, 1989). Zudem gibt es Hinweise, dass L1 durch einen indirekten Mechanismus an Aktin bindet und dass die Bindung von Zelladhäsionsmolekülen an immobile extrazelluläre Liganden sowie die Dynamik der Aktin-Filamente bei der Migration des Wachstumskegels eine entscheidende Rolle spielt (Gumbiner, 1993; Davis und Benett, 1994; Lin et al., 1994; Suter et al., 1998). Da eine verkürzte L1-Form mit einer cytoplasmatischen Domäne von nur sieben Aminosäuren fähig ist, mit Aktin zu interagieren, konnte die Aktin-Bindungsdomäne diesem Bereich zugeordnet werden (Dahlin-Huppe et al., 1997). Interessanterweise wird Ser-1152, welches sich in unmittelbarer Nähe der Aktin-Bindungsdomäne befindet, *in vivo* von der Kinase p90<sup>rsk</sup> phosphoryliert (siehe Abb. 5). Außerdem wurde an DRG Neuronen auf L1 als Substrat gezeigt, dass die Inhibition der Phosphorylierung des Ser-1152 zu einer Hemmung des Neuritenwachstums führt (Wong et al., 1996 b).



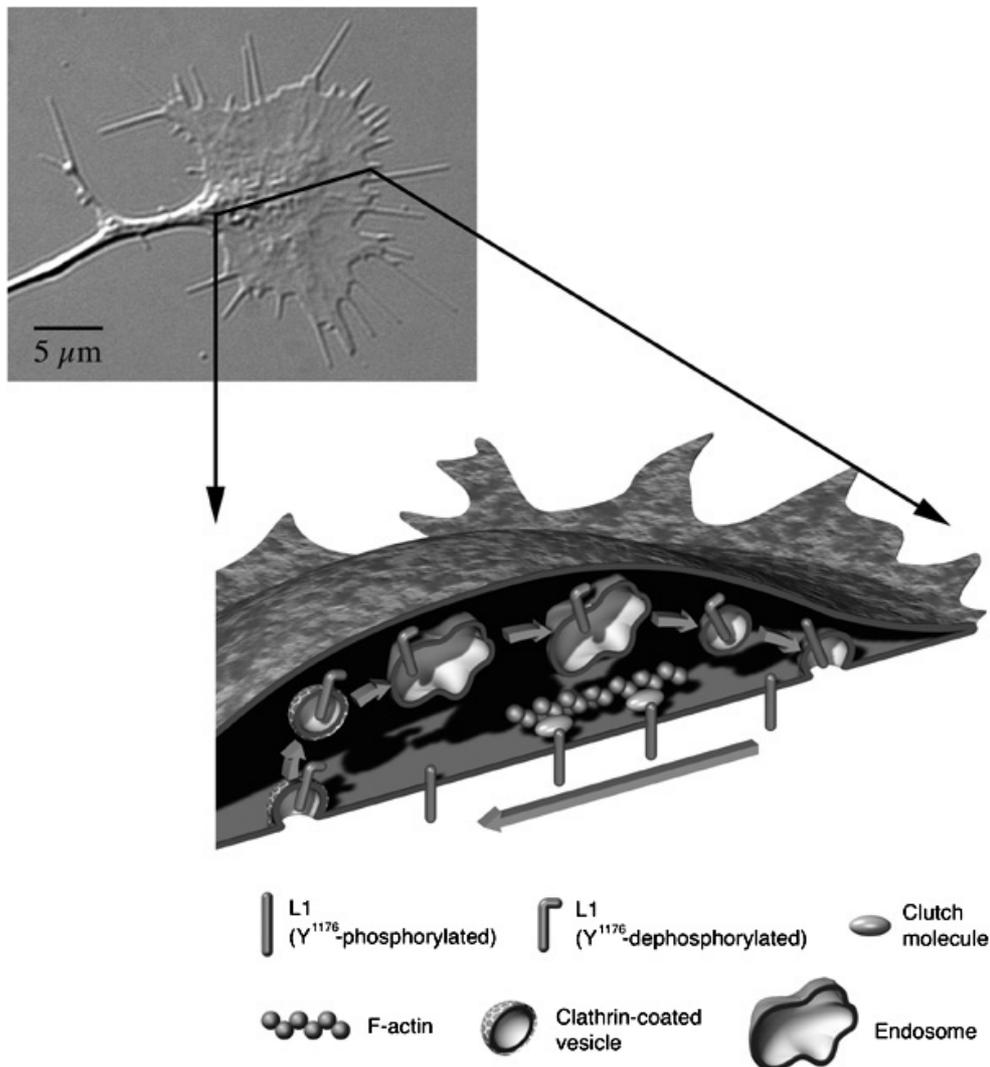
**Abb. 5: Interaktionen der cytoplasmatischen Domäne von L1.**

Die cytoplasmatische Domäne des Zelladhäsionsmoleküls L1 ist zwischen den L1-ähnlichen Molekülen aller Spezies hochkonserviert. Sie enthält verschiedene Bindungsdomänen (grüne Boxen) und kann von verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden (rote Boxen). Durch alternatives Spleißen von Exon 27 und der damit verbundenen Insertion der RSLE-Sequenz in die cytoplasmatische Domäne von L1 entsteht das YRSL-Motiv, welches ein axonales Sortierungssignal darstellt und durch die Bindung an AP-2 die Endocytose von L1 ermöglicht. Durch die Bindungsdomänen KGGK und FIGQY kann L1 mit den cytoskeletalen Proteinen Aktin bzw. Ankyrin interagieren. Es werden vier Serine phosphoryliert: Ser-1152 von p90<sup>rsk</sup>, Ser-1181 von Casein Kinase 2, Ser-1204 und Ser-1248 von erk2. Außerdem kann Tyr-1176 von pp60<sup>c-src</sup> und Tyr-1229 von einer noch unbekanntem Kinase phosphoryliert werden (modifiziert nach Kenwick et al., 2000).

Wie schon in 1.2.2 erwähnt, entsteht durch alternatives Spleißen in der cytoplasmatischen Domäne von L1 ein Tyrosin-abhängiges Sortierungssignal YRSL. Allgemeiner wird dieses Signal mit der Formel YXXΦ ausgedrückt, wobei Φ eine Aminosäure mit einem hydrophoben Hauptteil und X eine beliebige Aminosäure darstellt. Das Motiv ist als Signal für die Clathrin vermittelte

Endocytose von Transmembranproteinen bekannt. So besitzt beispielsweise der Transferrin-Rezeptor (TfR) ein typisches YXX $\Phi$ -Motiv (YTRF), welches mit der  $\mu$ 2-Untereinheit des AP-2 Heterotetramers (bestehend aus:  $\alpha$ -Adaptin,  $\beta$ 1-Adaptin oder  $\beta$ 2-Adaptin,  $\mu$ 2,  $\sigma$ 2) interagiert (Ohno et al., 1995). Der AP-2 Komplex bindet an Clathrin und ist so ein entscheidender Faktor für die Bildung der Clathrinhülle an der Plasmamembran (zusammengefasst in Traub, 2003). Kamiguchi et al. (1998) zeigten, dass auch neuronales L1 *in vitro* und *in vivo* mit der  $\mu$ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes interagiert und dabei das YRSL-Motiv für die Clathrin abhängige Endocytose von L1 verantwortlich ist (siehe Abb. 5). Interessanterweise findet die L1 vermittelte, Clathrin abhängige Endocytose von L1 hauptsächlich in der zentralen Domäne der Wachstumskegel von Neuronen statt. Von dort wird internalisiertes L1 wiederverwertet, indem es anterograd in die periphere Region des Wachstumskegels transportiert und dort wieder in die Plasmamembran integriert wird (Kamiguchi et al., 1998; Kamiguchi und Lemmon, 2000; Kamiguchi und Yoshihara, 2001; Schaefer et al., 2002; Kamiguchi 2003; siehe Abb. 6). Diese dynamische Regulation der L1 Expression an der Zelloberfläche sowie die dadurch asymmetrisch verteilte L1 abhängige Adhäsion im Wachstumskegel scheint für dessen Beweglichkeit und Migration von großer Bedeutung zu sein. Schaefer et al. (2002) wiesen nach, dass Tyr-1176 des YRSL-Motivs *in vivo* phosphoryliert wird. Als mögliche Kinase wurde *in vitro* pp60<sup>c-src</sup> identifiziert. In Peptidbindungsanalysen wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Tyr-1176 die Bindung der  $\mu$ 2-Untereinheit verhindert und für die Regulation der Endocytose von L1 eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Direkt im Anschluss an die YRSLE-Sequenz folgt bei L1 ein von der Casein Kinase 2 phosphorylierbares Serin (Wong et al., 1996 a). Die Bedeutung der Casein Kinase 2 für die Entwicklung des Nervensystems geht aus der Tatsache hervor, dass die ubiquitär vorkommende Casein Kinase 2 besonders stark im sich entwickelnden Gehirn exprimiert wird (Girault et al., 1990). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Casein Kinase 2 durch Antisense-Oligodesoxyribonukleotide die Neuritogenese *in vitro* verhindert (Ulloa et al., 1993). Auch die Phosphorylierung von Ser-1204 und Ser-1248 in der cytoplasmatischen Domäne von L1 durch die Kinase erk2 scheint für die Regulation der Funktionen von L1 eine wichtige Rolle zu spielen; diese Phosphorylierungsstellen wurden auch in Neurofascin und NrCAM nachgewiesen (Schaefer et al., 1999). Die Endocytose

von L1 geht mit der Aktivierung des MAPK-Signalweges einher und ist für das L1 stimulierte Neuritenwachstum essentiell. Zudem wird aktiviertes erk2 in Assoziation mit endocytosierten L1-Vesikeln gefunden (Schaefer et al., 1999; Schmid et al., 2000). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen eine wichtige Rolle für die Funktion von L1 vor allem beim L1 stimulierten Neuritenwachstum spielt.



**Abb. 6: Modell für einen L1-Wiederverwertungsmechanismus bei der Migration von Wachstumskegeln auf einem L1-Substrat.**

Es wird postuliert, dass L1 mit phosphoryliertem Tyr-1176 in der zentralen Domäne des Wachstumskegels Clathrin vermittelt endocytosiert, von dort in die periphere Domäne transportiert und in Tyr-1176 nicht phosphorylierter Form in die Plasmamembran eingebaut wird. Das so wiederverwertete L1 könnte so seine Adhäsionsfunktion ausüben und würde dann wahrscheinlich gekoppelt an den retrograden Transport von Aktin-Filamenten wieder in die zentrale Domäne des Wachstumskegels gelangen (Kamiguchi und Lemmon, 2000; Kamiguchi, 2003).

Aktuelle Untersuchungen an Neuronen des Hippocampus zeigten, dass L1 mit Numb, einem Protein welches nachweislich mit  $\alpha$ -Adaptin interagiert und in die Clathrin vermittelte Endocytose involviert ist, assoziiert vorliegt. Außerdem konnte durch *in vivo* und *in vitro* Experimente nachgewiesen werden, dass Numb mit CRMP-2 (collapsin response mediator protein-2) kolokalisiert und deshalb eine Rolle bei der Numb abhängigen Endocytose von L1 zu spielen scheint (Nishimura et al., 2003). Zudem wird TI-VAMP (vesicle associated membrane protein) eine wichtige Funktion beim intrazellulären Transport von L1 sowie bei der L1 abhängigen Adhäsion zugeschrieben (Alberts et al., 2003).

### 1.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Frage zu beantworten, ob die Serin-Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne des Zelladhäsionsmoleküls L1 an der Regulation der zellautonomen Ausbildung von Neuriten (bei Neuronen: Axonen und Dendriten) beteiligt ist. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass eine Verminderung dieses zellautonomen, sogenannten basalen Neuritenwachstums mit einer Reduktion der Phosphorylierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 einhergeht. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Phosphorylierung von L1 prinzipiell für das basale Neuritenwachstum von Bedeutung ist (Heiland et al., 1998). Um die Bedeutung der einzelnen phosphorylierbaren Serine des Zelladhäsionsmoleküls L1 für das basale Neuritenwachstum zu analysieren, sollten L1-Mutanten hergestellt werden, bei denen die durch Wong et al. (1996 a, b) und Schäfer et al. (1999) identifizierten Serin-Phosphorylierungsstellen (Ser-1152, Ser-1181, Ser-1204, Ser-1248) der cytoplasmatischen Domäne von L1 gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Leucin ausgetauscht sind. Nach stabiler Transfektion von B35-Neuroblastomzellen, die selbst nur eine sehr geringe Menge an L1 exprimieren, mit verschiedenen mutierten L1-cDNAs, sollten die Neuritenlängen der verschiedenen B35-Transfektanten vermessen und mit L1-wt exprimierenden B35-Neuroblastomzellen verglichen werden. Weiterhin sollte speziell die Bedeutung der Phosphorylierung des Ser-1181 für die Endocytose von L1 untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Sterile Plastikmaterialien, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen Biozym, Eppendorf, Falcon, Nunc und Sarstedt bezogen.

An dieser Stelle nicht genannten Materialien sind mit der entsprechenden Arbeitsmethode aufgeführt.

Material	Bezugsquelle
Deckgläser rund, 12 mm	Menzel, Braunschweig
Einweg-Spritzen	AMEA, Küffel
Einweg-Zellschaber	Becton-Dickinson, Heidelberg
Filterpapier, 3MM	Whatmann, Göttingen
Flexible Falcon 3912 Mikrotiterplatten	Becton-Dickinson, Heidelberg
Nitrocellulose-Membran	Sartorius, Göttingen
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
X-OMAT AR Röntgenfilme	Sigma, Taufkirchen

**Tab. 1: Verwendete Materialien und deren Bezugsquelle.**

### 2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in Analyse-Qualität (p.a.) von den Firmen Invitrogen, Merck, Roche Diagnostics, Serva und Sigma bezogen. Enzyme und Nukleotide wurden von den Firmen New England Biolabs, Promega und Roche Diagnostics geliefert. Radiochemikalien stammten von Amersham Pharmacia Biotech.

Chemikalie	Bezugsquelle	Chemikalie	Bezugsquelle
ABI-PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt	Methanol	Merck, Darmstadt
ABTS	Fluka, Buchs	MOPS, Morpholinopropan-sulfonsäure	Serva, Heidelberg
Aceton	Merck, Darmstadt	Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Roth, Karlsruhe	Natriumhydrogen-carbonat	Merck, Darmstadt
Agar-Agar	Merck, Darmstadt	Natriumhydrogen-phosphat	Merck, Darmstadt
Agarose	Roche, Grenzach-Wyhlen	Natronlauge	Merck, Darmstadt
Ampizillin	Sigma, Taufkirchen	Natriumselenit	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt	Penicillin/Streptomycin (1000 U/mg / 1000 mg/mL)	PAA, Cölbe
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen	Pepton	Invitrogen, Karlsruhe
BME-Medium	Invitrogen, Karlsruhe	Permafluor	Beckmann-Coulter, Krefeld
Borsäure	Merck, Darmstadt	Phenolrot	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen	Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma, Taufkirchen
Calciumdichlorid	Merck, Darmstadt	Ponceau S	ICN, Neuss
Chloroform	Roth, Karlsruhe	Protease-Inhibitoren	Sigma, Taufkirchen
Comassie Brillant Blue R250	ICN, Neuss	Protein-G-Sepharose	Amersham Bioscience, Braunschweig
D-Glucose	Merck, Darmstadt	Ready-mix-Zellkulturmedium	PAA, Cölbe
dbcAMP	Sigma, Taufkirchen	Röntgenfilm-Entwickler	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen	Röntgenfilm-Fixierer	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium; 4,5 g/mL Glukose (DMEM-H)	Invitrogen, Karlsruhe	Roti-Block	Roth, Karlsruhe
DMEM-H ohne Phosphat	CC-Pro, Neustadt	Rinderserumalbumin (BSA)	Roche, Grenzach-Wyhlen
EDTA	Merck, Darmstadt	Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
EGTA	Sigma, Taufkirchen	Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt	Super Signal Substrate Dura	Pierce, Bonn
Ethanol	Merck, Darmstadt	Super Signal Substrate Pico	Pierce, Bonn
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen	SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum, FCS-Gold	PAA, Cölbe	TEMED; N,N,N',N',-Tetramethyldiamin	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt	Thyroxin II	Serva, Heidelberg
G418	PAA, Cölbe	Transferrin	Roche Grenzach-Wyhlen
Glutaraldehyd	Sigma, Taufkirchen	Tris	Serva, Heidelberg
Glycerin	Sigma, Taufkirchen	Triton X-100	Serva, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt	Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt	Template Supression Reagent	Applied Biosystems, Darmstadt
Hefe-Extrakt	Invitrogen, Karlsruhe	Tween20	Sigma, Taufkirchen
HEPES	Serva, Heidelberg	Zinkchlorid	Sigma, Taufkirchen
Insulin	Roche, Grenzach-Wyhlen		
Isopropanol	Merck, Darmstad		
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt		
Kaliumdihydrogen-phosphat	Merck, Darmstadt		
L-Glutamin	Sigma, Taufkirchen		
Lipofectamin-Plus-Reagenzien	Invitrogen, Karlsruhe		
Magnesiumdichlorid	Merck, Darmstadt		
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt		

**Tab. 2: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsquelle.**

## 2.3 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Biofuge 13	Heraeus Instruments, Hanau
Biofuge 15R	Heraeus Instruments, Hanau
Bio-Photometer	Eppendorf, Köln
ELISA-Reader Titertek PLUS MS2	ICN, Neuss
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf, Köln
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Köln
Mikroskop DMIL	Leica, Solms
PCR-Maschine	Biozym, Hamburg
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Zentrifuge 202 MK	Sigma, Taufkirchen
Zentrifuge Labofuge 200, Rotortyp 3760	Heraeus Instruments, Hanau

**Tab. 3: Verwendete Geräte und deren Bezugsquelle.**

## 2.4 Lösungen und Puffer

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen mit demineralisiertem Wasser ( $H_2O_{\text{demin.}}$ ) angesetzt, welches mit der Barnstedt E-pure Anlage (Werner, Leverkusen) gewonnen wird.

### 2.4.1 Allgemeine Stammlösungen und Puffer

PBS (pH 7,2)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	$Na_2HPO_4$
	1,5 mM	$KH_2PO_4$
TBS (pH 7,4)	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl

### 2.4.2 Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

DNS-Probenpuffer (6x)	0,2 %	Bromphenolblau
(Loading Dye Solution MBI, Fermentas)	0,2 %	Xylencyanol
	60 %	Glycerin
	60 mM	EDTA
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/mL)	1 % (w/v)	Ethidiumbromid, lichtgeschützte Lagerung
Sequenzierungs-Sample- Puffer (2,5x)	200 mM	Tris, pH 9,0
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
TBE (10x)	1 M	Tris
	0,83 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
TE (pH 8,0)	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA

### 2.4.3 Lösungen für die Bakterienkultur

Soweit nicht anders vermerkt, wurden hitzestabile Lösungen und Puffer 20 Min. bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden sterilfiltriert (Rotrandfilter 0,2 µm, Schleicher und Schüll) und den Medien gegebenenfalls nach Abkühlung auf 55°C zugegeben.

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/mL	in H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> lösen, Lagerung bei -20°C
LB-Agarplatten	1,5 % (w/v)	Agar-Agar, in LB-Medium

TFB I (pH 5,8)	30 mM	Kaliumacetat
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v)	Glycerin
TFB II (pH 7,0)	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	RbCl
	15 %	Glycerin
YT <sup>++</sup> (pH 7,5)	0,8 %	Trypton
	0,5 %	Hefe-Extrakt
	0,5 %	NaCl
	20 Min. autoklavieren, anschließend Zugabe von	
	20 mM	MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert)
	10 mM	KCl (sterilfiltriert)

## 2.4.4 Lösungen für die Zellkultur

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle angegebenen Lösungen sterilfiltriert. Medien für die Zellkultur werden vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT) erwärmt.

Aprotinin	2 mg/mL,	Lagerung bei -20°C
dbcAMP-Stammlösung	250 mM	in DMSO, Lagerung bei -20°C
Einfrier-Medium	DMEM-H	
	20 %	FCS-Gold
	10 %	DMSO

G418-Stammlösung	100 mg/mL	in HBSS <sup>-</sup> , Lagerung bei -20°C
Glutamin-Stammlösung	200 mM	L-Glutamin, Lagerung bei -20°C
Medium für B35- Neuroblastomzellen	DMEM-H (4,5 g/mL Glukose) 10 % 1 %	10% FCS-Gold Penicillin/Streptomycin
Selektionsmedium von B35-Neuroblastomzellen	DMEM-H (4,5 g/mL Glukose) 10 % 1 % 250/500 µg/mL	FCS-Gold Penizillin/Streptomycin G418
Poly-L-Lysin (PLL)- Stammlösung (10x)	0,1 %	PLL
HBSS <sup>-</sup> (pH 7,2)	5,4 mM 0,44 mM 136,9 mM 4,62 mM 5,5 mM 0,03 mM	KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> D-Glucose Phenolrot, Lagerung bei 4°C
Trypsin-EDTA (Invirogen)	0,5 g/L 0,2 g/L	Trypsin (1:250) EDTA

X1-Medium nach Fischer et al. (1986)	ad 500 mL	BME-Medium
	12,5 mL	Hepes (1M)
	1,25 g	D-Glukose
	5 mL	Penicillin/Streptomycin
	0,5 g	Albumin (BSA)
	250 µl	Insulin (20 mg/mL)
	1,65 mL	Transferrin (30 mg/mL)
	500 µl	Aprotinin (2 mg/mL)
	500 µl	Thyroxin II (4 µM)
	50 µl	Na-Selenit (300 nM)
	2 mM	Glutamin, frisch zugeben

#### 2.4.5 Lösungen für die Herstellung von Zellhomogenaten

DPBS (pH 7,5)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,7 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
Homogenisierungspuffer (pH 7,8)	20 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	EGTA
	1 %	Triton-X 100,
		vor Gebrauch Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren

Endoglykosidase H-Puffer (10x), 500 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
mit NaOH auf pH 5,5 einstellen

Protease-Inhibitoren-Stammlösungen:

Aprotinin	10 mM	in PBS
Leupeptin	10 mM	in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$
NaF	1 M	in $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$
Pepstatin	1 mM	in Methanol/Essigsäure (10:1)
PMSF	200 mM	in Isopropanol

Phosphatase-Inhibitoren-Stammlösungen:

Natrium-ortho-Vanadate	1 M	in Natriumphosphatpuffer
Caliculin A	10 $\mu\text{M}$	in Methanol
Ocadasäure	10 $\mu\text{M}$	in Methanol

## 2.4.6 Lösungen für die Immunpräzipitation

DPBS siehe 2.4.5

Natriumphosphatpuffer je 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
(pH 7,2)

Ripa-Lysis-Puffer (pH 7,2)	10 mM	Natriumphosphatpuffer
	0,1 %	SDS
	40 mM	NaF
	2 mM	EDTA
	1 %	Triton X-100
	1 %	Deoxycholsäure
	1 mM	PMSF
	20 nM	CaliculinA
	10 mM	Natrium-ortho-Vanadat
	1 µg/mL	Aprotinin
	1 µg/mL	Leupeptin
	1 µg/mL	Pepstatin
	Ripa-Waschpuffer (pH 7,2)	10 mM
1 mM		NaCl
10 mM		EDTA
40 mM		NaF
10 mM		Natriumorthovanadate
0,2 %		Triton X-100

#### 2.4.7 Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamid-Lösung	30 % (w/v)	Acrylamid
	0,8 % (w/v)	N,N'-Methylenbisacrylamid, Lagerung bei 4°C
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	10 % (w/v)	APS
Laufpuffer (10 x)	0,25 M	Tris
	1,92 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS

Probenpuffer (4 x) (reduzierend)	200 mM 24 % (v/v) 6 % (w/v) 0,8 % (v/v) 0,04 % (w/v)	Tris, pH 6,8 Glycerol SDS $\beta$ -Mercaptoethanol Bromphenolblau
Probenpuffer (4 x) (nicht reduzierend)	200 mM 24 % (v/v) 6 % (w/v) 0,04 % (w/v)	Tris, pH 6,8 Glycerol SDS Bromphenolblau
Roti <sup>®</sup> -Block (Roth)	1:10	mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> verdünnen
SDS-Lösung	10 % (w/v)	SDS
Tris-HCl (pH 6,8)	1 M	Tris
Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M	Tris

#### 2.4.8 Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Entwickler-Lösung	217 mM 0,07 % (v/v) 0,04 mM	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> Formaldehyd Natriumthiosulfat
Fixierer-Lösung	30 % (v/v) 10 % (v/v)	Methanol Essigsäure
Sensitivierungs-Lösung	0,8 mM	Natriumthiosulfat
Silber-Lösung	11,7 mM	AgNO <sub>3</sub>

Stopp-Lösung	0,4 M	Tris
	2,5 %	Essigsäure
Waschlösung	20 %	Ethanol

### 2.4.9 Lösungen für den Western-Blot

Blotpuffer I (pH 10,4)	300 mM	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
Blotpuffer II (pH 10,4)	25 mM	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
Blotpuffer III (pH 9,4)	25 mM	Tris
	40 mM	Amino-n-capronsäure
	20 % (v/v)	Methanol
Ponceau S-Färbelösung	0,2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (v/v)	Essigsäure
Roti®-Block (Roth)	1:10 mit H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub> verdünnen	
"Stripping"-Puffer	62,5 mM	Tris, pH 6,8
	2 %	SDS
	100 mM	2-Mercaptoethanol

### 2.4.10 Lösungen für die indirekte Immunfluoreszenz

Blockierlösung	1 %	Pferdeserum
	0,25 % (w/v)	BSA in PBS
Fixierlösung	4 % (v/v)	Formaldehyd in PBS
Eindeckelmedium		Permafluor (Beckmann-Coulter, Krefeld)

### 2.4.11 Lösungen für den Nachweis von Endocytose-Vesikeln

Blockierungs-Puffer	1 %	BSA in PBS
Fixierlösungs-Puffer (pH 7,4)	8 % (w/v) 200 mM	Formaldehyd Hepes, immer frisch ansetzen
Permeabilisierungs-Puffer	3 % 0,5 %	3 % BSA 0,5 % Triton X-100 in PBS

## 2.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) in HPSF- (high purity salt free) Qualität synthetisiert. Die lyophilisiert gelieferten Oligonukleotide wurden in TE-Puffer gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.5.1 Oligonukleotide zur zielgerichteten Mutagenese

Name	Sequenz 5' → 3'	Mutation 5' → 3'
hL1-S1152L-hin	G GGC GGC AAA TAC <u>TTA</u> GTG AAG GAT AA	TCA → <u>TTA</u>
hL1-S1152L-rück	TT ATC CTT CAC <u>TAA</u> GTA TTT GCC GCC C	TGA → <u>TAA</u>
hL1-S1181L-hin	G TAC AGG TCC CTG GAG <u>CTT</u> GAC AAC GAG GAG AAG G	AGT → <u>CTT</u>
hL1-S1181L-rück	C TTT CTC CTC GTT GTC <u>AAG</u> CTC CAG GGA CCT GTA C	ACT → <u>AAG</u>
hL1-S1204L-hin	G CCC CTG GGC <u>CTT</u> GAC GAC AGC CTG GC	AGT → <u>CTT</u>
hL1-S1204L-rück	GC CAG GCT GTC GTC <u>AAG</u> GCC CAG GGG C	ACT → <u>AAG</u>
hL1-S1248L-hin	C TCA GGG GCC ACT <u>TTA</u> CCC ATC AAC CC	TCC → <u>TTA</u>
hL1-S1248L-rück	GG GTT GAT GGG <u>TAA</u> AGT GGC CCC TGA G	GGA → <u>TAA</u>

**Tab. 4: Oligonukleotide zur zielgerichteten Mutagenese.**

Basenaustausche sind unterstrichen, die jeweiligen Primerpaare sind zueinander komplementär.

## 2.5.2 Oligonukleotide zur Sequenzierung

Name	Sequenz 5' → 3'	Schmelztemperatur T <sub>m</sub>
C-Terminus-hin	CTC CTC GTC CTG CTC ATC CT	61,4 °C
C-Terminus-rück	GCC AGT GTG ATG GAT ATC TGC	59,8 °C
R1-hL1-rück	CGG GCT TCA CTG TCT CCT TTG	61,8 °C
R2-hL1-rück	CGG CGA TGC ACT CCA GGA C	63,1 °C
R3-hL1-rück	GGG CAC AGG CGC TCC GAA GG	67,6 °C
R4-hL1-rück	TGC CTT GGT CGC TGT AGT CC	63,5 °C
R5-hL1-rück	GCC ACT GCA CGC GGT ACT G	63,1 °C
R6-hL1-rück	TGG GGT GCT GAA GGT GAA CT	59,4 °C
R7-hL1-rück	GCC CCA CCC TTC TCT TCT CC	63,5 °C
R8-hL1-rück	TCG GGC CTC AGA GTC CAC CT	63,5 °C
S1-pcDNA3-hin	CAA GCT TGG TAC CGA GCT CG	61,4 °C
S2-hL1-hin	GTT CCA GGG CAT CTA CCG CT	61,4 °C
S3-hL1-hin	AGG CCA CCA ACA GCA TGA TT	57,3 °C
S4-hL1-hin	CGC AAC CGG CAC GGG CTC TT	65,5 °C
S5-hL1-hin	GGA GCT TGG GGA CAG TGA CA	61,4 °C
S6-hL1-hin	AGG GGG AAG GAA ATG AGA CCA	59,8 °C
S7-hL1-hin	GGG CAG TCA GAG GAA GCA CA	61,4 °C
S8-hL1-hin	TGG CCT TGT CTG GGA TCT CA	59,4 °C

**Tab. 5: Oligonukleotide für Sequenzierungen.**

## 2.6 Klonierungsvektoren

Vektor	Referenz
pcDNA3	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3-L1wt	Needham et al., 2001
pcDNA3-eGFP	Diestel, 2002
pcDNA3-IRES-eGFP	Diestel, 2002

Tab. 6: Klonierungsvektoren.

## 2.7 Größenstandards

### 2.7.1 Nukleinsäureanalytik

Standard	Fragmentgröße in bp	Quelle
DNA Molecular Weight Marker III in kbp, DIG gekoppelt, 10 µg/mL 0,12 bis 21,2 kbp	21220, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125	Roche, Grenzach-Wyhlen
100 bp-Leiter	3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Tab. 7: Größenstandards für die Agarosegel-Elektrophorese.

### 2.7.2 Proteinanalytik

Standard	Größe in kDa	Quelle
Peq Gold Protein Marker II Konzentration: 0,02 bis 0,05 mg/mL	200, 150, 120, 100, 90, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10	PeqLab, Erlangen
SeeBlue® Plus 2	250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6, 4	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 8: Proteinstandards für den Western-Blot.

## 2.8 Bakterienstamm

*E. coli* XL1-blue Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ(mcr)A183, Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1, lac[F`proABlacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup> 12,5 µg/mL)]

## 2.9 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Parentale B35-Zellen	Neuroblastomzellen aus der Ratte mit neuronalen Eigenschaften	Schubert et al., 1974
B35-L1wt-Zellen	Mit der humanen L1 cDNA stabil transfizierte B35-Zellen	Needham et al., 2001

Tab. 9: Verwendete Zelllinien.

## 2.10 Antikörper

Primäre Antikörper	Beschreibung	Quelle
Neuro4.1.1.3.3 p56 958282-05	Monoklonaler Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von humanem L1 (Ascites aus der Maus)	Dr. J. Hemperly
p-erk1/2	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204)	New England Biolabs, Frankfurt
erk1/2	Polyklonaler gegen Maus IgG gerichteter Antikörper, erkennt erk1/2	Bd Biosciences, Heidelberg
hL1 UJ127.11	Gegen die extrazelluläre Domäne von humanem L1 gerichteter Antikörper	Elbing et al., 1996

Tab. 10: Verwendete primäre Antikörper.

Sekundäre Antikörper	Beschreibung	Quelle
Goat- $\alpha$ -Maus-POD (0,4 mg/mL)	Polyklonale Ziegen-Antikörper, gerichtet gegen Maus-Antikörper der Subklasse IgG und IgM, konjugiert an Meerrettich-Peroxidase (POD)	Dianova, Hamburg
Goat- $\alpha$ -Maus-Cy3 (0,7 mg/mL)	Polyklonale Ziegen-Antikörper, gerichtet gegen Maus-Antikörper der Subklasse IgG, konjugiert an Indocarbocyanin (Cy3)	Dianova, Hamburg
Goat- $\alpha$ -Maus-DTAF (0,7 mg/mL)	Polyklonale Ziegen-Antikörper, gerichtet gegen Maus-Antikörper der Subklasse IgG und IgM, konjugiert an Dichlorotriaminylazinyllamino-Fluorescein (DTAF)	Dianova, Hamburg
Rabbit- $\alpha$ -Maus-IgG (2,7 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Antikörper reagieren mit IgG (IgG1, 2a, 2b, 3) und Maus IgA und IgM, aufgereinigte Immunglobulin Fraktion von Hasen-Antiserum	Dako-Cytomation, DK

Tab. 11: Verwendete Sekundäre Antikörper.

## 3 Methoden

Prinzipiell wurden die Regeln für genaues und sauberes Arbeiten im Labor beachtet. Es wurden die Anweisungen für Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen befolgt. Sterilarbeiten erfolgten unter einem geeigneten Abzug. Gesundheitsschädliche, umweltgefährdende oder radioaktive Stoffe wurden den Sicherheitsbestimmungen gemäß verwendet und entsorgt.

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Herstellung von kompetenten *E.coli*-Bakterien und Transformation

Die Aufnahme freier Fremd-DNA durch Bakterien wird als Transformation bezeichnet, der genaue Mechanismus dieses Vorgangs ist noch ungeklärt. Durch eine besondere Behandlung nach Hanahan (1983) kann die Transformationseffizienz von *E.coli*-Bakterien um ein Vielfaches gesteigert werden. Auf diese Weise ist es möglich, Plasmid-DNA beliebig zu vermehren. Die behandelten Bakterien werden als transformationskompetent bezeichnet.

##### 3.1.1.1 Transformationskompetente, einfrierbare Bakterien

Eine XL1-blue Einzelkolonie wird ü. N. in 2,5 mL YT<sup>++</sup>-Medium bei 37°C und 250 UpM kultiviert. Am nächsten Tag wird die stationäre Kultur 1:100 in YT<sup>++</sup>-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 geschüttelt (250 UpM). Von dieser Vorkultur werden anschließend 5 mL in 100 mL vorgewärmtes YT<sup>++</sup>-Medium gegeben und so lange bei 37°C und 250 UpM kultiviert, bis ein OD<sub>600</sub> von etwa 0,45 bis 0,55 erreicht ist. Nach schnellem Abkühlen auf Eis (5 Min.) werden die Bakterien sedimentiert (3000×g, 5 Min., 4°C) und der Überstand verworfen. Die Bakterien werden vorsichtig in 20 mL TFB I (4°C) resuspendiert und 10 Min.

auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) und Verwerfen des Überstandes werden die Bakterien in 4 mL TFB II (4°C) aufgenommen und in Aliquots zu jeweils 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so hergestellten kompetenten Bakterien können bei –80°C etwa ein Jahr gelagert werden.

### **3.1.1.2 Transformation**

Für die Transformation wird der gesamte Ligationsansatz (siehe 3.1.4.2) oder 10 bis 25 ng Plasmid-DNA mit 50 µl kompetenten Bakterien versetzt und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Ansätze für 70 Sek. in einem Wasserbad auf 42°C erwärmt und danach sofort auf Eis abgekühlt. Nach 2 Min. werden 450 µl vorgewärmtes LB-Medium zu den Bakterien gegeben und diese für 30 bis 60 Min. bei 37°C bei 250 UpM zur Ausprägung der Resistenz geschüttelt. Abschließend werden 100 µl und 400 µl der Bakteriensuspension auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und ü. N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### **3.1.2 Gezielte Mutagenese der humanen L1-cDNA (hL1-cDNA)**

Um eine Mutation gezielt in cDNA einzufügen wird die „QuickChange™ Site-directed Mutagenesis“ angewendet. Zunächst wird ein Plasmid, welches die zu mutierende DNA enthält, vollständig mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Reaktion wird mit der DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (PfuTurbo™-DNA-Polymerase II, Stratagene) durchgeführt, da diese eine hohe 3'→5'-fehlerkorrigierende Aktivität besitzt. Die dabei benutzten zueinander komplementären Primer (siehe Tab. 4) enthalten die gewünschte einzuführende Mutation. Das für die PCR eingesetzte unmutierte Plasmid liegt im Gegensatz zum amplifizierten PCR-Plasmid methyliert vor und wird durch einen anschließenden Verdau mit dem Enzym Dpn I, welches spezifisch methylierte DNA spaltet, abgebaut. Das nicht methylierte PCR-Plasmid wird dann durch Transformation in kompetenten Bakterien vermehrt.

### 3.1.2.1 Primer-Design

Bei der Ableitung der Primer wird berücksichtigt, dass jedes Primer-Paar dieselbe Mutation enthält und zueinander komplementär ist. Dabei wird die gewünschte Mutation in der Mitte des Primers eingeführt, so dass sich rechts und links von der Mutation 10 bis 15 Basen korrekt paaren können. Die Gesamtlänge der Primer sollte zwischen 25 und 40 Basen liegen und einen GC-Gehalt von mindestens 40% aufweisen. Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - \frac{675}{\text{Primerlänge} - \%mismatch}$$

### 3.1.2.2 Zusammensetzung der PCR-Ansätze und PCR-Programm

*Die PCR-Ansätze haben folgende Zusammensetzung:*

5 µl	10x Pfu-Puffer
5 ng – 50 ng	Plasmid-DNA
125 ng	Hin-Primer
125 ng	Rück-Primer
1 µl (25mM)	dNTPs
1 µl (2,5 U)	Pfu-Polymerase
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>

Die PCR-Reaktion erfolgt nach folgendem Protokoll:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit	Funktion	
1	1	95°C	1 Min.	Denaturierung der DNA	
2	16	95°C	30 Sek.	Denaturierung der DNA	] 15x
3		68°C	1 Min.	Anlagerung der Primer	
4		72°C	18 Min.	Elongation	
5		72°C	20 Min.	Endsynthese	
6	1	4°C	∞	Lagerung	

### 3.1.2.3 Dpn I-Verdau des PCR-Produktes

Ansatz für den Abbau des unmutierten, methylierten Plasmids durch das Enzym Dpn I erfolgte nach folgendem Schema:

5 µl	PCR-Produkt
5 U	Dpn I
5 µl	10 x Dpn I-Puffer
39,5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>

Nach einer Inkubation von 60 Min. bei 37°C werden je 10 und 40 µl des PCR-Produktes aufgeteilt und anschließend direkt für je eine Transformation (siehe 3.1.1.2) verwendet.

### 3.1.3 DNA-Präparation

Je nach gewünschter Menge und Reinheit der DNA wird eine analytische oder präparative Plasmid-Isolierung durchgeführt.

### **3.1.3.1 Analytische Plasmid-Isolierung (Minipräparation)**

Die analytische Plasmidpräparation wird zur schnellen Durchmusterung rekombinanter Klone verwendet. Das Verfahren liefert ca. 2 bis 5 µg DNA mit einem Reinheitsgrad, der z. B. für Restriktionsanalysen und Sequenzreaktionen ausreichend ist. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Plasmid-DNA mit dem Mini-Präparations-Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) aus 2 bis 3 mL einer Übernachtskultur nach Herstellerangaben isoliert.

### **3.1.3.2 Präparative Plasmid-Isolierung (Midi-Präparation)**

Größere Mengen Plasmid-DNA (100 bis 200 µg) mit hohem Reinheitsgrad, der beispielsweise für Transfektionen und auch für einige Sequenzierungsreaktionen notwendig ist, werden durch Ionenaustausch-Chromatographie isoliert. Sämtliche Materialien hierfür werden von der Firma Qiagen als Reagenziensatz (Qiagen Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden) bezogen. Die Präparation erfolgt nach Angaben des Herstellers.

### **3.1.3.3 Isolierung von DNA aus einem Agarosegel**

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten wird die DNA zunächst mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.1.5). Die gewünschte DNA-Bande wird unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Isolierung des DNA-Fragments aus dem Agaroseblock wird ein Reagenziensatz der Firma Qiagen (QIAquick-Gel-Extraktion-Kit, Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

### **3.1.3.4 Phenol-Chlorophorm-Extraktion**

Zur Aufreinigung wird die DNA mit dem gleichen Volumen Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol (50:49:1) versetzt, gründlich gemischt und zentrifugiert (20000×g, 2 Min., 4°C). Die obere Phase wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit Natriumacetat-Fällung (siehe 3.1.3.5.1) gefällt.

### **3.1.3.5 Natriumacetat-Fällung**

Die Fällung von DNA dient der Konzentrierung oder Umpufferung z. B. bei Ligationen.

#### **3.1.3.5.1 Natriumacetat-Fällung I**

Zur DNA-Lösung wird ein Zehntel Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol absolut (-20°C) gegeben. Der gut durchmischte Ansatz wird dann zur Präzipitation 10 Min. bei -80°C inkubiert. Das Präzipitat wird sedimentiert (18000×g, 4°C, 30 Min.), mit 2,5-fachem Volumen 70% (v/v) Ethanol gewaschen (18000×g, 4°C, 10 Min.) und im Wasserbad bei 50°C getrocknet. Danach findet die Lösung der DNA im gewünschten Volumen TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> statt.

#### **3.1.3.5.2 Natriumacetat-Fällung II**

Nach der PCR für die Sequenzierung mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (siehe auch 3.2.7) werden die nicht eingebauten Fluoreszenz markierten Nukleotide durch ein Zehntel Volumen Natriumacetat (2 M, pH 4,0) und 2,5-fache Menge Ethanol absolut gefällt und anschließend bei 18000×g für 30 Min. bei RT zentrifugiert. Nach dem Waschen mit 2,5-fachem Volumen 70% (v/v) Ethanol wird das Pellet bei 50°C im Wasserbad getrocknet, in 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> angelöst und mit weiteren 20 µl TSR (Template Supression Reagent) gut gemischt.

### **3.1.4 Enzymatische Spaltung und Ligation von DNA**

#### **3.1.4.1 Enzymatische Spaltung von DNA-Fragmenten**

Die Spaltung der DNA erfolgte durch den Einsatz ausgewählter Restriktionsendonukleasen. Der Reaktionspuffer und die Reaktionstemperatur wurden entsprechend der Angaben der Hersteller gewählt.

#### **3.1.4.2 Ligation überhängender, kohäsiver Enden**

Durch die Ligation von DNA-Fragmenten besteht die Möglichkeit Plamid-Vektoren zu erzeugen, die neben ihren Grundeigenschaften, wie Replikationsursprung und Antibiotikaresistenz, zusätzliche Sequenzinformationen in Form eines inklonierten DNA-Fragments (Inserts) enthalten. Beide zu ligierenden DNA-Fragmente werden zunächst durch Restriktion erzeugt und aufgereinigt.

Es werden 25-50 ng Vektor-DNA und eine entsprechende Menge Insert-DNA im Verhältnis 1:2, 1:3 und 1:4 eingesetzt. Je nach Gesamtvolumen (10-15 µl) wird der Ansatz mit 10 x Ligase-Puffer (1,0 –1,5 µl) und 1,0 bis 1,5 U T4-DNA-Ligase (Roche) versetzt, ü. N. bei 16°C im Wasserbad inkubiert und im Anschluss für die Transformation eingesetzt (siehe 3.1.1.1).

### **3.1.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente. Zur Herstellung der Trennmatrix werden je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäurefragmente 0,6 bis 1% Agarose in TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger gegossen. Das erkaltete Gel wird in der Gelkammer vollständig mit TBE-Puffer bedeckt. Die DNA-Proben werden vor dem Einfüllen in die Beladetaschen mit 1/5 Vol. 6 x DNA-Laufpuffer versetzt,

außerdem wird zur Größenbestimmung der zu trennenden Fragmente ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Je nach Gelgröße erfolgt die Auftrennung bei einer Spannung von 80 oder 100 Volt. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelixstruktur der DNA, die daher durch UV-Licht-Anregung sichtbar gemacht werden kann.

### **3.1.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren**

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren können anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Das Absorptionsmaximum von heterozyklischen Nukleotidbasen liegt bei 260 nm ( $A_{260}$ ). Eine Absorptionseinheit entspricht bei einem Strahlengang von einem cm einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/mL}$  DNA und 40  $\mu\text{g/mL}$  RNA. Da Proteine eine Absorption bei 280 nm aufweisen und es zu einer Überlagerung der Spektren kommen kann, wird mit dem Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren bestimmt. Bei DNA sollte der Reinheitsgrad zwischen 1,8 und 2,0 liegen, niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch UV-absorbierende Stoffe (z.B. Phenole, Proteine) hin.

Die Nukleinsäuren werden in TE-Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  1:100 verdünnt. Die Extinktion kann anschließend im Eppendorf Photometer mit Quarzküvetten bei 260 und 280 nm gegen TE-Puffer oder  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  vermessen werden.

### **3.1.7 Sequenzierung von cDNA**

Die Sequenzierung von cDNA wird am Institut für physiologische Chemie an der Universität Bonn mit Hilfe vom ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit durchgeführt und liefert gut lesbare Sequenzen bis ca. 400 bp.

*Pipettierschema:*

1000 ng	Plasmid (Midi)
5 pmol	Primer
4 µl	BigDye-Mix
4 µl	2,5x-Sample-Puffer
1 µl	DMSO
<hr/>	
20 µl	ad H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>

Die PCR wird in 0,5 µl Eppendorfgefäßen (safe-lock) durchgeführt, da diese auch als Probengefäße im Sequenzer benutzt werden können.

*PCR-Programm:*

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit	Funktion	
1	1	96°C	2 Min.	Denaturierung der DNA	
2	30	95°C	10 Sek.	Denaturierung der DNA	} 30x
3		50-60°C	5 Sek.	Anlagerung des Primers	
4		60°C	4 Min.	Elongation	
5	1	4°C	∞	Lagerung	

Zur Entfernung der nicht eingebauten fluoreszierenden NTPs wird eine Natriumacetatfällung bei RT (siehe 3.1.3.5.2) durchgeführt.

*Probenaufnahme:*

Nach der Natriumacetat-Fällung II wird das DNA-Pellet in 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> angelöst und mit weiteren 20 µl Template Supression Reagent (TSR) gut durchmischt. Vor dem Start der Sequenzierung findet eine Inkubation der Proben für 10 Min. bei 60°C und 3 Min. bei 96°C statt.

## **3.2 Zellkultur und Transfektion von adhärennten Zellen**

Alle Arbeiten zur Kultivierung der Zellen werden in Sterilbänken mit Laminarluftstrom nach gängigen Methoden der Zellkultur durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen findet im Brutschrank bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre und bei 5% CO<sub>2</sub> statt.

### **3.2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen**

B35-Neuroblastomzellen werden in mit poly-L-Lysin (PLL)-beschichteten (0,01%, 1 h, RT) T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die verschiedenen Zelllinien sind unter 2.4.4 aufgeführt. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von etwa 90% erreicht haben, werden die Zellen zweimal mit HBSS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA abgelöst. Die Zugabe von Zellkulturmedium inaktiviert das Trypsin und die sich in Suspension befindlichen Zellen werden anschließend bei 180×g pelletiert. Nach der Zentrifugation werden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und in gewünschten Verdünnungen auf neue Kulturgefäße verteilt.

### **3.2.2 Auftauen von Kulturzellen**

Die in einem Kryogefäß eingefrorenen Zellen werden bei 37°C aufgetaut, mit Zellkulturmedium vermischt und pelletiert. Nach der Resuspension in 12 mL Kulturmedium werden die Zellen in einer T75-Flasche ausgesät.

### 3.2.3 Einfrieren von Kulturzellen

Zellen einer zu 90% konfluenten T75-Flasche werden wie in 3.2.1 beschrieben trypsinisiert und zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert, in Kryogefäße überführt und vor der endgültigen Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff zwei Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.2.4 Stabile Transfektion von Kulturzellen

Die Transfektion von B35-Zellen wird mit Lipofektamin und Plus-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

Es werden  $1,5 \times 10^6$  parentale B35-Zellen in mit PLL-beschichteten (0,01%) 60 mm-Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag werden 3  $\mu\text{g}$  der zu transfizierenden Plasmid-DNA mit 250  $\mu\text{l}$  DMEM-H gut durchgemischt. Anschließend findet die Zugabe von 4  $\mu\text{l}$  vorher gut gemischtem Plus-Reagenz zu dem DNA-DMEM-H-Gemisch statt, dieses wird dann auf dem Vortexer gemischt und für 15 Min. bei RT inkubiert. Währenddessen werden 6  $\mu\text{l}$  Lipofektamin in 250  $\mu\text{l}$  DMEM-H gegeben und gut gemischt. Im nächsten Schritt werden beide Ansätze zusammengegeben und erneut gut gemischt. Nach einer Inkubation von 15 Min. werden die Zellen zweimal mit DMEM-H ( $37^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Anschließend wird das DNA-Lipofektamin-Plus-DMEM-H-Gemisch mit zusätzlichen 2 mL DMEM-H auf die Zellen gegeben. Die Inkubation des Transfektionsgemisches erfolgt für 3 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Schließlich wird das Transfektionsgemisch entfernt und die Zellen im frischem Medium (DMEM-H, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. 48 h nach Transfektionsbeginn erfolgt die Selektion der Zellen.

### 3.2.5 Selektion transfizierter Zellen

Die Zellen werden durch Trypsin-EDTA-Behandlung abgelöst, zentrifugiert (siehe 3.2.1) und in folgenden Konzentrationen auf mit PLL-beschichteten (0,01%) 60

mm Schalen ausgesät: 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200. Auf dem verwendeten eukaryotischen pcDNA3-Vektor ist das Neomycin-Resistenzgen enthalten. Transfizierte Zellen können so aufgrund ihrer Antibiotikaresistenz selektioniert werden. Zur Selektion von transfizierten B35-Zellen wird das Neomycin-Analogon G418 in einer Konzentration von 500 µg/mL eingesetzt. Das Medium wird je nach Bedarf alle zwei bis drei Tage gewechselt.

Nach zwei bis drei Wochen können resistente Klone durch Abschaben mit einer 200 µl Pipette in eine 48-Well-Kulturschale überführt und vereinzelt werden. Die isolierten Klone werden nun mit 250 µg/mL G418 weiter kultiviert und vermehrt.

### **3.2.6 Ausdifferenzieren von B35-Zellen mit dbcAMP**

Durch Serumentzug und die Behandlung mit dbcAMP können B35-Zellen in einen neuronalen Zelltyp ausdifferenziert werden. Die Zellen werden in Zellkulturmedium ausgesät, am darauffolgenden Tag zweimal mit warmem HBSS<sup>-</sup> gewaschen und weitere 24 h in X1-Medium (serumfrei) mit Glutamin und 1 mM dbcAMP kultiviert.

## **3.3 Proteinchemische Methoden**

### **3.3.1 Indirekte Immunfluoreszenz-Analyse**

Die Kulturzellen werden auf PLL-beschichteten 10 mm Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 60% kultiviert. Die Zellen werden einmal mit DPBS (4°C) gewaschen und mit 4% Formaldehyd in PBS für 30 Min. bei RT fixiert. Die Fixierlösung wird durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend werden die Zellen 1 h bei RT mit Blockierlösung (1% Pferdeserum, 0,25% BSA in PBS) behandelt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt für 1 h in Stammlösung bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS findet die Behandlung mit dem zweiten Antikörper in Blockierlösung (1 h, abgedunkelt, RT) statt. Danach

werden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  gewaschen und direkt auf vorbereitete Objektträger mit Permafluor eingedeckelt.

Antikörper	Konzentration
Neuro4	1 : 50
324	1 : 20
Goat-Anti-Maus-Cy3	1 : 1000
Goat-Anti-Rat-Cy3	1 : 1000

**Tab. 12: Verwendete Antikörper und deren eingesetzte Konzentration bei der indirekten Immunfluoreszenz.**

### 3.3.2 Nachweis von L1 auf der Zelloberfläche und in Endocytose-Vesikeln durch indirekte Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung der Endocytose von L1 werden mit L1 transfizierte B35-Neuroblastomzellen zunächst auf mit PLL beschichteten Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag durch die Behandlung mit dbcAMP (siehe 3.2.6) ausdifferenziert. Nach 24 Stunden werden die Zellen zweimal mit warmen HBSS<sup>-</sup> gewaschen und zur Induktion der Endocytose mit in X1-Medium verdünntem Antikörper (25 µg/mL hL1 a J 127.11; Elbing et al., 1996) für 30 Min. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zum Abstoppen der Endocytose werden die Zellen auf Eis dreimal mit kaltem DMEM-H gewaschen und anschließend mit frisch angesetzter 8%iger Paraformaldehydlösung (in 200 mM Hepes, pH 7,4) für 30 Min. fixiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und zur Detektion von zelloberflächenassoziiertem L1 für 30 Min. mit Goat-α-Maus-Cy3 in 1% BSA/PBS (1:1000) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS (4°C) wird durch die 30-minütige Inkubation mit Rabbit-α-Maus-IgG (0,25 mg/mL, 1% BSA in PBS) L1, an den kein Erstantikörper gebunden hat blockiert. Die Zellen werden erneut einmal mit PBS (4°C) gewaschen und auf Eis mit 8%iger Paraformaldehydlösung für 5 Min. nachfixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS (4°C) werden die Zellen im nächsten Schritt durch 30 Min. Inkubation mit 3% BSA in 0,5% Triton X 100 in PBS permeabilisiert und blockiert. Die Zellen werden anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen und zur Detektion von endocytosiertem L1 mit Goat-α-Maus-DTAF für 30 Min. 1:150 in 1% BSA/PBS inkubiert. Zuletzt werden die Zellen dreimal mit PBS und einmal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$

gewaschen und mit Permafluor eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (Leica DMIRBE).

### **3.3.3 Markierung von Proteinen**

#### **3.3.3.1 Nachweis von membranständigem L1 durch Zelloberflächen-Biotinylierung**

Die Markierung von Membranproteinen auf der Zelloberfläche von B35-Neuroblastomzellen wird mit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) durchgeführt. Zellen mit einer Konfluenz von etwa 80% werden zweimal mit DPBS (RT) gewaschen und für 30 Min. bei RT mit frisch angesetztem Sulfo-NHS-LC-Biotin (40 µg/mL in DPBS) inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit TBS (4°C) wird überschüssiges Biotin entfernt. Anschließend werden die Zellen auf Eis mit 250 µl Ripa-Lysepuffer homogenisiert, und es wird eine Immunpräzipitation mit dem Antikörpers Neuro4 (3 µl pro 60er Schale) durchgeführt (siehe 3.3.6). Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (siehe 3.3.8) und Transfer (siehe 3.3.11) der Proteine auf Nitrocellulose werden die mit Biotin markierten Proteine nach Inkubation der Nitrocellulose mit Streptavidin-POD (1:10000, in Roti-Block) durch Chemilumineszenz (Super Signal Substrate Pico, Pierce) detektiert.

#### **3.3.3.2 Markierung von L1 mit <sup>32</sup>P-ortho-Phosphat**

Es werden  $1,5 \times 10^6$  Zellen auf mit PLL-beschichteten (0,01%) 35 mm Kulturschalen für 24 h kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit phosphatfreiem DMEM-H Medium (37°C) werden die Zellen 1 h in 1,4 mL phosphatfreiem Medium, supplementiert mit Glutamin und 10% phosphatfreiem FCS (dialysiert gegen 0,15 M NaCl in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5), bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Danach werden 700 µl des Mediums abgenommen, zu den restlichen 700 µl Medium werden 70 µCi <sup>32</sup>P-o-Phosphat (Phosphorus-32, PBS11, 370 MBq/mL, 10

mCi/mL) gegeben und die Zellen für weitere 4 h unter leichtem Schwenken im Brutschrank kultiviert. Zuletzt werden die Zellen lysiert und immunpräzipitiert (siehe 3.3.6).

### **3.3.4 Herstellung von Zellhomogenaten**

Die Zellen werden bis zur Konfluenz von etwa 80% in PLL-beschichteten (0,01%) Kulturschalen zwei Tage kultiviert. Dann werden die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen, die Kulturschalen auf Eis gestellt und mit Homogenisierungspuffer homogenisiert. Nach einer Inkubation von 30 Min. auf Eis werden die Solubilisate für 20 Min. zentrifugiert (18000×g, 4°C). Der Überstand wird mit 4-fach Probenpuffer versetzt und bei -80°C gelagert.

### **3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Lowry)**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellhomogenaten wird eine Eichkurve mit BSA als Standardprotein im Bereich von 10 bis 1000 µg/mL in Homogenisierungspuffer erstellt. Die Proteinbestimmung der Standardreihe sowie der Proben erfolgte mit dem „DC (Detergent-Compatible) Protein Assay Kit“ (BioRad, München) nach Herstellerangaben. Die Absorption wurde bei  $\lambda = 690$  nm als optische Dichte gemessen.

### **3.3.6 Immunpräzipitation (IP)**

Es werden entweder Zellen mit oder ohne radioaktive Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat für eine IP lysiert. Hierzu werden die Zellen auf Eis zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und mit 250 µl (35 mm-Kulturschale) bzw. 500 µl (60 mm-Kulturschale) Ripa-Lysepuffer und einem Gummischaber abgelöst. Anschließend werden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und 20 Min. bei 4°C inkubiert,

wobei die Lysate alle 5 Min. gründlich gemischt werden. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation (18000×g, 4°C) wird der Überstand abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem primären Antikörper (Neuro4, 2 µl pro 35er und 3 µl pro 60er Schale) gemischt und ü. N. bei 4°C unter Rotierung inkubiert. Am nächsten Tag werden 40 µl Protein-G-Sepharose (in TBS, Amersham Biosciences, Freiburg) hinzugegeben und die Proben erneut für 1,5 h bei 4°C rotiert. Die entstandenen Protein-G-Antikörper-Antigen-Komplexe werden durch eine 2-minütige Zentrifugation sedimentiert (3500×g, 4°C). Der Überstand wird verworfen und das Pellet dreimal mit je 500 µl Ripa-Waschpuffer (3500×g, 4°C) und einmal mit 500 µl H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> (4000×g, 4°C) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet in 20 µl zweifachen Probenpuffer aufgenommen und gut gemischt. Durch die folgende Inkubation der Proben für 5 Min. bei 100°C wird der Antigen-Antikörper-ProteinG-Komplex aufgelöst. Die Proben wurden erneut kräftig gemischt und das Pellet durch Zentrifugation bei 18000×g für 2 Min. bei RT abgetrennt. Der gesamte Überstand wird direkt zur SDS-PAGE (siehe 3.3.8) eingesetzt.

### 3.3.7 Deglykosylierung von Proteinen mit Endoglycosidase H (EndoH)

Es werden zunächst wie in 3.3.4 beschrieben Zellhomogenate hergestellt. Nach der Durchführung einer Proteinbestimmung (siehe 3.3.5), wird bezogen auf die Proteinmenge ein 1,2-facher Überschuss an SDS zugesetzt. Die Proben konnten nun bei -80°C gelagert werden. Nach dem Auftauen der Proben werden diese für 5 Min. bei 100°C inkubiert und der Verdau nach folgendem Schema angesetzt:

	<b>Probe</b>	<b>Kontrolle</b>
Protein	20 µg	20 µg
Protease-Inhibitoren:		
Aprotenin	0,03 µl	0,03 µl
Leupeptin	0,03 µl	0,03 µl
Pepstatin	0,3 µl	0,3 µl
PMSF	0,3 µl	0,3 µl
NaF	1,2 µl	1,2 µl
EndoH-Puffer, 10x	3 µl	3 µl
EndoH (Roche)	0,5 mU	-
H <sub>2</sub> O <sub>demin.</sub>	ad 30,0 µl	ad 30,0 µl

Die Proben werden ü. N. bei 37°C inkubiert und am darauffolgenden Tag mit der entsprechenden Menge Probenpuffer versetzt. Vor dem Auftrag der Proben auf ein SDS-Gel werden diese erneut für 5 Min. bei 100°C inkubiert.

### 3.3.8 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts erfolgt in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970). Zur Herstellung der 1,5 mm dicken Polyacrylamid-Gele und Durchführung der Elektrophorese wird das Minigel-System der Firma BioRad (München) eingesetzt. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine werden Trenngele mit 6, 8 oder 10% Polyacrylamid verwendet, die Sammelgele bestanden aus 5% Polyacrylamid.

*Zusammensetzung der Gel-Lösungen:*

Substanz	6% Trenngel	8% Trenngel	10% Trenngel	5% Sammelgel
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	8,0 mL	7,0 mL	6,0 mL	4,1 mL
Acrylamid-Lösung	3,0 mL	4,0 mL	5,0 mL	1,0 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8 mL	3,8 mL	3,8 mL	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	-	750 µl
10% (w/v) SDS	150 µl	150 µl	150 µl	60 µl
10% (w/v) APS	150 µl	150 µl	150 µl	60 µl
TEMED	12 µl	9 µl	6 µl	6 µl

Die Proben werden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und für 5 Min. bei 100°C inkubiert. Zur Größenbestimmung der Proteine wird ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 50 Volt im Sammelgel bzw. 100 Volt im Trenngel. Nach der Auftrennung der Proteine wird das Gel entweder direkt auf Nitrocellulose transferiert oder mit Silber (siehe 3.3.9) gefärbt. Wenn die Proteine mit <sup>32</sup>P-ortho-Phosphat markiert worden sind, werden diese zunächst mit Fixierlösung (30% Methanol, 10% Essigsäure) behandelt,

evtl. immunpräzipitierte Proteine durch eine Silberfärbung angefärbt und die Gele anschließend getrocknet und autoradiographiert.

### **3.3.9 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Hierzu werden die Proteine zunächst durch Fixierlösung fixiert (dreimal für je 30 Min.). Danach werden die Gele 10 Min. in einer Waschlösung und darauffolgend 10 Min. in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  gewaschen. Im Anschluss daran werden die Gele mit einer 0,8 mM Natriumthiosulfat-Lösung für 1 Min. behandelt. Nach zweimaligem Waschen der Gele für je 20 Sek. mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  findet eine 30-minütige Inkubation der Gele mit Silberlösung statt. Nach Entfernung der Silberlösung und Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  wird die Entwicklung der Gele durchgeführt. Hierzu wird das Gel zweimal 3 Min. in Entwicklerlösung inkubiert. Sobald die Proteine deutlich als bräunliche Banden zu erkennen sind, wird die Entwicklung durch Überführen der Gele in die Stopplösung beendet. Die Gele werden für 10 Min. in der Stopplösung belassen und können dann im Vakuum unter Erwärmung auf  $80^\circ\text{C}$  getrocknet werden. Alle Inkubationsschritte werden unter Schütteln und bei RT durchgeführt.

### **3.3.10 Autoradiographie von SDS-Polyacrylamidgelen**

In SDS-Gelen aufgetrennte  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat-markierte Proteine werden durch eine Silberfärbung im Gel fixiert und sichtbar gemacht (siehe 3.3.9). Die Gele werden unter Vakuum getrocknet und anschließend Röntgenfilme (XOMAT-AR, Kodak) aufgelegt. Die Exposition wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zu 14 Tagen durchgeführt.

### **3.3.11 Western-Blot (Semi-Dry-Verfahren)**

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden mit Hilfe des Semi-Dry Blots auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Hierzu wird eine horizontale Transferkammer mit einem diskontinuierlichen Puffersystem verwendet. Zur Vorbereitung werden pro Gel zehn Filterpapiere (3MM) und die Nitrocellulosemembran entsprechend der Größe des Gels zurechtgeschnitten (6 x 9 cm). Dann werden drei Filterpapiere in Blotpuffer I getränkt und auf die Anodenplatte des Blotgeräts gelegt. Anschließend werden zwei Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran in Blotpuffer II getränkt und auf den Stapel gelegt. Das Gel wird von der Glasplatte gelöst und auf die Nitrocellulosemembran gegeben. Schließlich wird das Gel mit fünf in Blotpuffer III getränkten Filterpapieren überschichtet. Zum Schluss wird die Kathodenplatte aufgelegt. Der Transfer erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 150 mA (35 Min., pro Blotstapel).

### **3.3.12 Ponceau S Färbung von Nitrocellulosemembranen**

Der Transfer der Proteine aus einem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran wird durch eine reversible Ponceau S Färbung kontrolliert. Dazu wird die Membran für 1 Min. in Ponceau S Färbelösung inkubiert. Danach wird die Nitrocellulosemembran mehrmals mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$  gewaschen. Der nun sichtbare Molekulargewichtstandard wird mit Bleistift markiert. Zum Schluss wird die Membran durch kurzes aufkochen in PBS entfärbt. Anschließend können einzelne Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

### **3.3.13 Detektion von Proteinen im Western Blot**

Der Western Blot dient zum Nachweis eines spezifischen Proteins aus einem Proteingemisch, das durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurde. Alle Schritte werden unter Schwenken durchgeführt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die

Nitrocellulose zunächst für 1 h bei RT mit Roti<sup>®</sup>-Block blockiert. Anschließend findet die Inkubation der Nitrocellulosemembran ü. N. bei 4°C oder RT mit dem ersten Antikörper in Roti<sup>®</sup>-Block statt. Um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, wird die Membran am nächsten Tag viermal für jeweils 15 Min. mit Roti<sup>®</sup>-Block gewaschen. Zur Detektion des ersten Antikörpers wird die Nitrocellulosemembran für 1 h bei RT mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert, die an den primären Antikörper binden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden bei RT durch viermaliges Waschen (je 15 Min.) mit Roti<sup>®</sup>-Block entfernt. Der Nachweis der Bindung der Antikörper erfolgt durch die Peroxidase katalysierte Chemilumineszenzreaktion. Dabei wird das Super Signal Substrate Pico oder Dura (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Das emittierte Licht wird auf einem Röntgenfilm (XOMAT-AR, Kodak) sichtbar gemacht.

*Antikörperkonzentrationen für den Western Blot:*

Antikörper	Konzentration	Inkubation
Neuro4	1 : 1000	4°C
p-erk-1/2	1 : 2000	RT
erk-1	1 : 5000	RT
erk-2	1 : 5000	RT
Goat-Anti-Maus-POD	1 : 5000	RT
Goat-Anit-Rat-POD	1 : 5000	RT

**Tab. 13: Verwendete Antikörper-Konzentrationen im Western Blot.**

### 3.3.14 „Strippen“ von Nitrocellulosemembranen

Zur Entfernung von gebundenem primären und sekundären Antikörper wird die Nitrocellulosemembran für 30 bis 60 Min. bei 70°C schwenkend in „Stripping“-Puffer inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>demin.</sub> (10 Min., RT) und PBS-0,25 % Tween (1 Min., RT) wird der Puffer entfernt. Vor der Inkubation mit einem neuen primären Antikörper wird die Nitrocellulosemembran für 30 Min. bei RT mit Roti<sup>®</sup>-Block behandelt.

### **3.4 Messung der Neuritenlänge und Neuritenanzahl von B35-Zellen**

Für die Untersuchung von Neuritenlänge und Neuritenanzahl von B35-Zellen werden  $10^5$  Zellen in einer PLL-beschichteten 60 mm Schale in DMEM-H ausgesät und wie in 3.2.6 beschrieben mit dbcAMP (Endkonzentration 1 mM) ausdifferenziert. Um einen repräsentativen Eindruck der Zellen zu erlangen werden die 60 mm Schalen systematisch unter dem Mikroskop (Leika Axiovert 200) betrachtet und pro Schale 15 bis 20 Fotos mit dem 20er Objektiv (Achrom, Ph2, 20/0,4 Korr) im Computer abgespeichert. Die Auswertung der Neuritenlänge wird mit dem Programm KS100 von Zeiss durchgeführt. Dabei werden nur die Neuriten von Zellen vermessen, die keinen Kontakt zu einer weiteren Zelle aufweisen. Gleichzeitig wird die Anzahl der Neuriten pro vermessener Zelle bestimmt.

### **3.5 Untersuchung der Migration von B35-Zellen**

Zur Untersuchung der Migration von B35-Zellen in Abhängigkeit von der Expression verschiedener Mutanten von L1 im Vergleich zum Wildtyp von L1, werden zunächst  $10^5$  parentale B35-Neuroblastomzellen auf mit PLL-beschichtete 35er Schalen ausgesät. Nach 24 h erfolgt die Co-Transfektion der cDNA des zu untersuchenden Proteins und einem Plasmid, welches die cDNA für eGFP (enhanced green fluorescent protein) enthält, mittels Lipofektamin und Plus-Reagenz. Hierzu werden zunächst 1800 ng des Plasmids mit der cDNA des zu untersuchenden Plasmids und 200 ng des Plasmids mit der cDNA von eGFP mit 125  $\mu$ l DMEM-H gut durchmischt. Bei diesem Größenverhältnis (10:1) kann man davon ausgehen, dass alle Zellen, die das eGFP exprimieren und so später durch Grünfärbung zu erkennen sind, mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 bis 95% auch das zu untersuchende Protein exprimieren. Danach werden 2  $\mu$ l von gut gemischtem Plus-Reagenz zu dem DNA-DMEM-H-Gemisch gegeben, der Ansatz erneut auf dem Vortexer gut gemischt und dann für 15 Min. bei RT inkubiert.

Währenddessen werden 3  $\mu\text{l}$  Lipofektamin zu weiteren 125  $\mu\text{l}$  DMEM-H gegeben und anschließend mit dem DNA-DMEM-H-Plus-Gemisch zusammen gegeben. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation werden die Zellen zweimal mit warmen DMEM-H gewaschen. Das Transfektionsgemisch und 1 mL DMEM-H werden für drei Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf die Zellen gegeben und die Zellen nach Entfernung des Transfektionsgemisches in frischem Medium (DMEM-H, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) kultiviert. Nach 24 Stunden wird die Migration der Zellen im Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn, in einer CO<sub>2</sub>-Box bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 1,5 Stunden mit dem 10er Objektiv (10x/0,25 Ph1) unter dem Axiovert 100 (Zeiss, Oberkochen) beobachtet. Hierfür werden die Zellen im Abstand von jeweils 5 Min. durch den FITC-Filter (09Ex 470/40) fotografiert (AxioCam). Durch die Aneinanderreihung der Bilder erhält man so einen Film, der die Migration der Zellen über einen Zeitraum von 1,5 Stunden wiedergibt. Die Bestimmung der Migration der Zellen mit der Axiovision-Software von Zeiss erfolgt, indem geradlinige Verbindungen der jeweiligen Zellen auf dem ersten und auf dem letzten Bild hergestellt, gemessen und ausgewertet werden.

### 3.6 Statistische Auswertung

Die graphischen Darstellungen der Daten werden mit dem Programm GraphPad Prism erstellt, dazu werden die errechneten Mittelwerte der durchgeführten Experimente mit der entsprechenden SEM (standard error of the mean) dargestellt. Die statistische Auswertung für den Vergleich zwischen mehreren Gruppen erfolgt mit dem Programm SPSS (Superior Performance Software System) für Windows durch die Anwendung der einfaktoriellen ANOVA mit einem folgenden post hoc Test. Der globale Test lehnt die Nullhypothese gleicher Erwartungswerte aller untersuchten Untergruppen ab ( $p < 0,001$ ). P-Werte  $< 0,05$  werden als statistisch signifikant bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zur Funktion der Serin-Phosphorylierung des humanen Zelladhäsionsmoleküls L1

Die cDNA von humanem L1-wt (hL1-wt) sowie hL1-wt exprimierende und parentale B35-Neuroblastomzellen wurden von Patricia F. Maness (University of North Carolina, School of Medicine, Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt. Vor Beginn der Experimente wurde die korrekte Sequenz der hL1-wt-cDNA durch Sequenzierung mit 9 Primerpaaren, die die gesamte Sequenz von L1 abdecken (S1- bis S8-hin, R1-bis R8-rück sowie C-Terminus-hin und -rück), bestätigt.

#### 4.1.1 Mutagenese der humanen L1 cDNA

Insgesamt wurden fünf verschiedene hL1-cDNA Mutanten hergestellt. Bei vier Konstrukten wurde jeweils ein phosphorylierbares Serin der cytoplasmatischen Domäne von L1 gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Leucin ausgetauscht (Ser-1152, Ser-1181, Ser-1204 und Ser-1248). Bei dem fünften Konstrukt wurden die durch erk2 phosphorylierbaren Serine, Ser-1204 und Ser-1248 durch Leucin ersetzt.

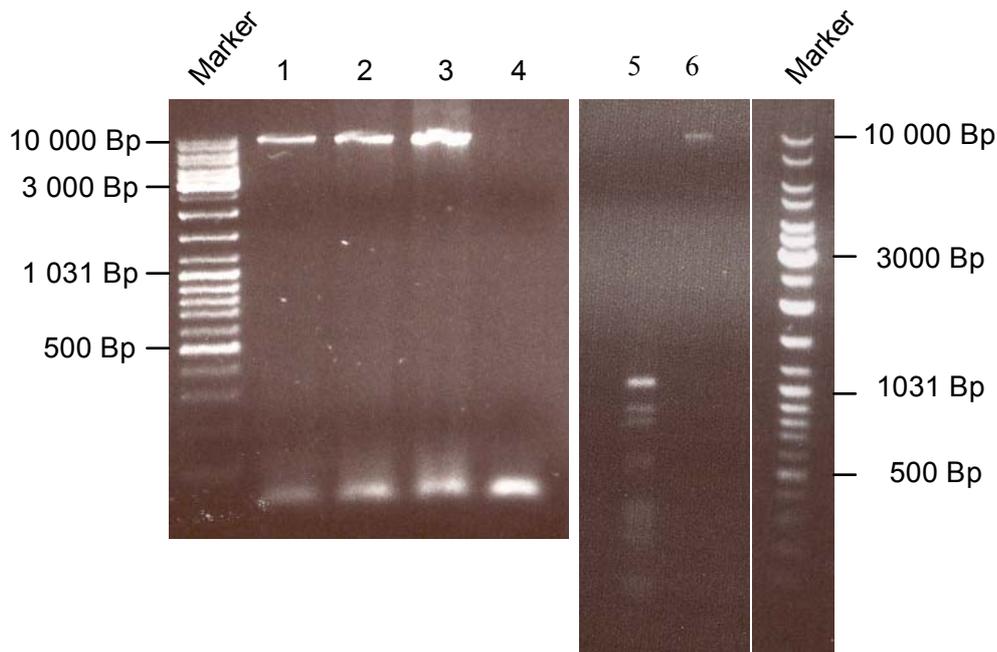
K	R	S	K	G	G	K	Y	S	V	K	D	K	E	D	T	Q	V	D
1144								1152										
S	E	A	R	P	M	K	D	E	T	F	G	E	Y	R	S	L	E	S
																		1181
D	N	E	E	K	A	F	G	S	S	Q	P	S	L	N	G	D	I	K
P	L	G	S	D	D	S	L	A	D	Y	G	G	S	V	D	V	Q	F
			1204															
N	E	D	G	S	F	I	G	Q	Y	S	G	K	K	E	K	E	A	A
G	G	N	D	S	S	G	A	T	S	P	I	N	P	A	V	A	L	E
									1248									1257

**Abb. 7: Aminosäure-Sequenz der cytoplasmatischen Domäne von humanem L1.** Die in dieser Arbeit ausgetauschten Serine sind in rot dargestellt, außerdem ist die Aktin-Bindestelle in grau und die Ankyrin-Bindestelle in grün hervorgehoben. Durch einen alternativen Spleißmechanismus wird das neuronenspezifische RSLE-Peptid in die cytoplasmatische Domäne von L1 eingeführt (hellblau), wodurch ein Endocytosesignal bzw. ein axonale Sortierungssignal entsteht (blaue Buchstaben).

Die Mutagenese der L1 cDNA wurde mittels „QuickChange™ Site-directed Mutagenesis“ durchgeführt. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen des Plasmids pcDNA3-L1-wt, welches die zu mutierende humane L1 cDNA enthielt, verwendet. Durch PCR mit der PfuTurbo™-DNA-Polymerase II und jeweils zwei zueinander komplementären Primern, welche die einzuführende Mutation enthielten, wurde das gesamte eingesetzte Plasmid amplifiziert und dabei die gewünschte Mutation eingefügt. Insgesamt wurden so die fünf folgenden Zielkonstrukte hergestellt: pcDNA3-L1-S1152L, pcDNA3-L1-S1181L, pcDNA3-L1-S1204L, pcDNA3-L1-S1248L, pcDNA3-L1-S1204L/S1248L (siehe Tab. 14 und Abb. 7). Im nächsten Schritt wurden die eingesetzten Eltern-Plasmide, welche nicht die gewünschte L1-Mutation enthielten, entfernt. Diese lagen im Gegensatz zu den amplifizierten PCR-Plasmiden methyliert vor und wurden durch einen anschließenden Verdau mit dem Enzym Dpn I, welches spezifisch methylierte DNA spaltet, abgebaut (siehe Abb. 8). Die PCR-Plasmide mit den unterschiedlichen L1-Mutationen wurden dann nach Transformation in Bakterien vermehrt und anschließend isoliert.

Gewünschter Aminosäureaustausch	Eltern-cDNA	Kompletäre Primer	Ziel Konstrukt
S1152L	pcDNA3-L1wt	hL1-S1152L-hin, hL1-S1152L-rück	pcDNA3-L1-S1152L
S1181L	pcDNA3-L1-wt	hL1-S1181L-hin, hL1-S1181L-rück	pcDNA3-L1-S1181L
S1204L	pcDNA3-L1-wt	hL1-S1204L-hin hL1-S1204L-rück	pcDNA3-L1-S1204L
S1248L	pcDNA3-L1-wt	hL1-S1248L-hin hL1-S1248L-rück	pcDNA3-L1-S1248L
S1204L und S1248L	pcDNA3-L1S1248L	hL1-S1204L-hin hL1-S1204L-rück	pcDNA3-L1-S1204L/S1248L

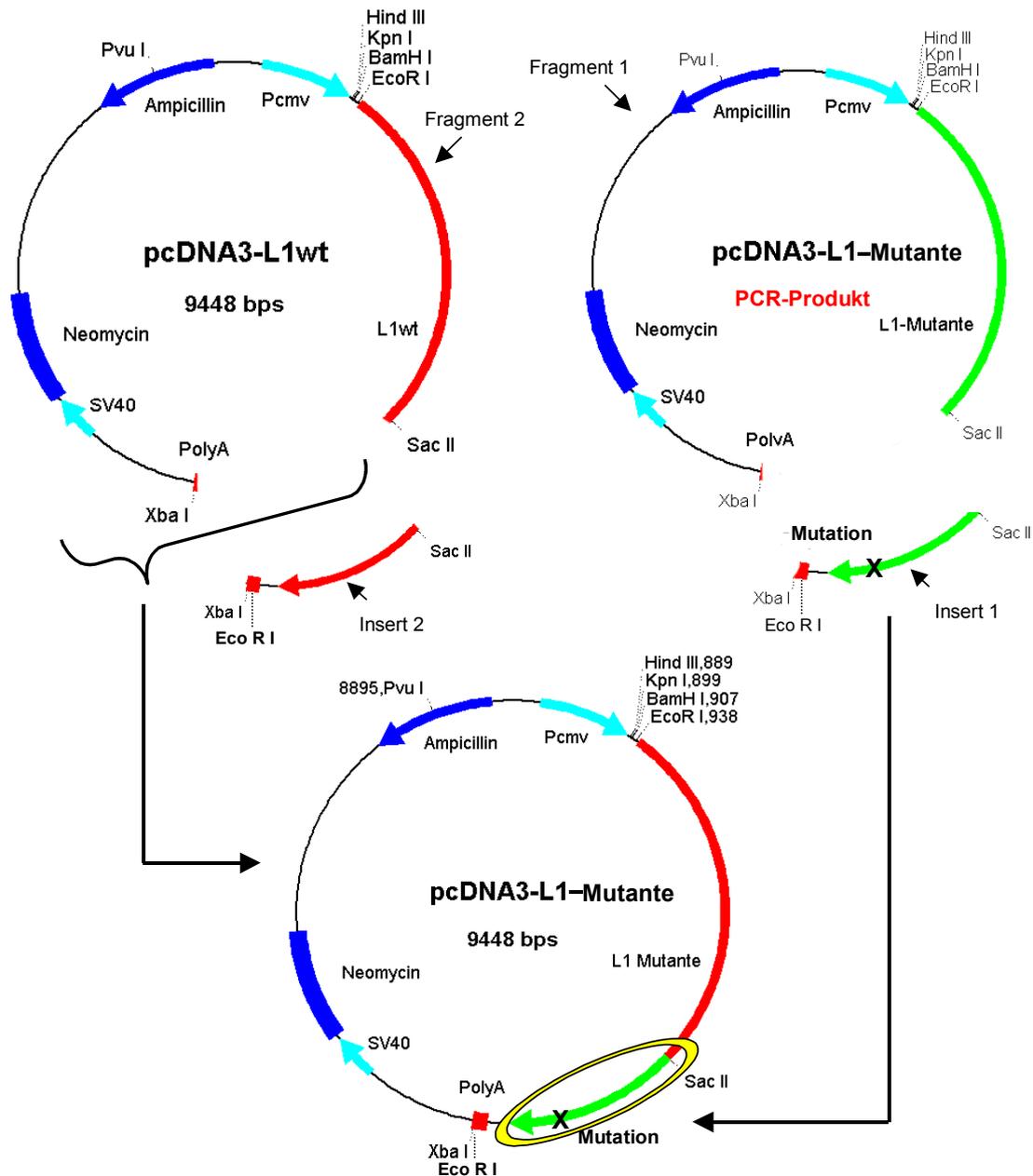
**Tab. 14:** Zielkonstrukte und in der „QuickChange™ Site-directed Mutagenesis“ eingesetzte Primer.



**Abb. 8: PCR des Plasmids pcDNA3-L1-wt als Beispiel mit dem komplementären Primer-Paar hL1-S1248L-hin und hL1-S1248L-rück sowie der Verdau von methylierter Eltern-cDNA durch das Enzym DPN I.**

(1 bis 4): PCR-Produkte bei verschiedenen Konzentrationen der Eltern-Plasmide, 1) 5 ng, 2) 25 ng, 3) 50 ng, 4) 0 ng Eltern-Plasmid. (5) Fragmente der Eltern-Plasmide nach DPN I Inkubation. (6) PCR-Produkt, das nicht durch das Enzym DPN I gespalten wird.

Um auszuschließen, dass bei der PCR unerwünschte Mutationen in die Plasmide eingefügt wurden und um die erfolgreiche Einführung der gewünschten Mutation zu bestätigen, wurde ein Teil der L1 cDNA umkloniert und der amplifizierte Bereich nachfolgend sequenziert. Hierzu wurde durch die Restriktionsenzyme Sac II und Xba I der Bereich mit der gewünschten Mutation aus dem Plasmid, welches über PCR amplifiziert worden war, ausgeschnitten (Insert 1, umfasst einen kleinen Bereich der extrazellulären Domäne sowie die gesamte cytoplasmatische Domäne von L1, 1490 Bp; Fragment 1, restliches Plasmid, 7958 Bp). Zudem wurde das Plasmid pcDNA3-L1-wt mit den selben Restriktionsenzymen verdaut (Insert 2, 1490 Bp und Fragment 2, 7985 Bp). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der jeweiligen Restriktionsprodukte und deren Extraktion aus dem Agarosegel wurde das Insert 1 mit dem Fragment 2 anschließend durch eine Ligationsreaktion zusammengefügt und durch die Transformation in kompetente Bakterien vermehrt (siehe Abb. 9).

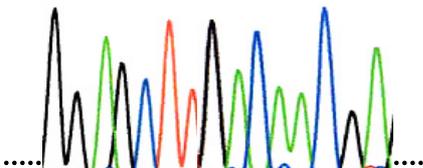
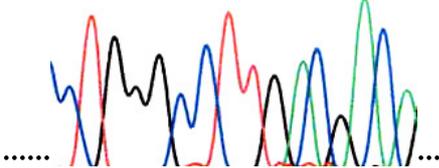
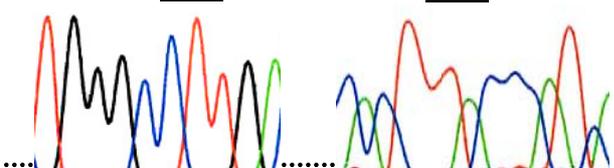


**Abb. 9: Umklonierungsstrategie.**

PCR-Produkt und Eltern-Plasmid wurden mit Sac II und Xba I verdaut. Das Ziel-Plasmid pcDNA3-L1-Mutante wurde anschließend durch die Ligation von Fragment 2 des Eltern-Plasmids, aus dem der entsprechende nicht mutierte Teil von L1 heraus geschnitten war, mit dem Insert 1 des PCR-Produktes generiert. Der gelbmarkierte Bereich wurde anschließend sequenziert.

Nach Isolierung der Plasmide mit den verschiedenen eingefügten L1-Mutationen mittels Minipräparation wurde die erfolgreiche Ligation durch eine Restriktion mit dem Enzym EcoR I (erwartete Fragmente: 5446 Bp und 4002 Bp) überprüft. Schließlich wurden sowohl der Hin-Strang, als auch der Rück-Strang des verbliebenen über PCR amplifizierten cDNA-Bereiches sequenziert (siehe Abb. 9,

gelbmarkierter Bereich). Hierzu wurden die Primer C-Terminus-hin, C-Terminus-rück, R6- bis R8-rück und S6- bis S8-hin verwendet. Der gewünschte Aminosäureaustausch konnte bei allen fünf Zielkonstrukten nachgewiesen werden (siehe Tab. 15), gleichzeitig wurde die Einführung einer unerwünschten Mutation in den jeweiligen Zielkonstrukten ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

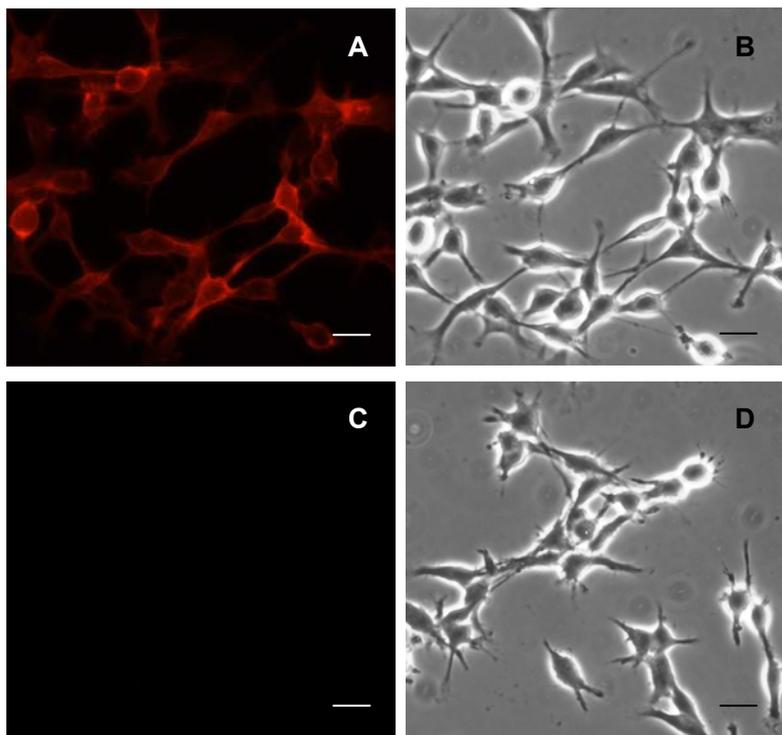
Zielkonstrukt	Mutation 5' → 3'	Sequenzierungsausschnitte (Hin-Strang)
pcDNA3-L1-S1152L	TCA → TTA TGA → TAA	.... <b>AAT</b> <u><b>ACTTAG</b></u> <b>GAAG</b> .... 
pcDNA3-L1-S1181L	AGT → CTT ACT → AAG	.... <b>GGAG</b> <u><b>CTTGACA</b></u> <b>ACGA</b> .... 
pcDNA3-L1-S1204L	AGT → CTT ACT → AAG	..... <b>CTGGGC</b> <u><b>CTTGAC</b></u> <b>GACA</b> .... 
pcDNA3-L1-S1248L	TCC → TTA GGA → TAA	.... <b>ACTTT</b> <u><b>ACCCAT</b></u> <b>CAA</b> ..... 
pcDNA3-L1-S1204L/S1248L	AGT → CTT ACT → AAG  TCC → TTA GGA → TAA	.... <b>TGGGC</b> <u><b>CTTGA</b></u> ..... <b>CACTTT</b> <u><b>ACCCAT</b></u> <b>C</b> ... 

**Tab. 15: Sequenzausschnitte der fünf Zielkonstrukte zur Überprüfung der eingeführten Mutation.**

Durch PCR amplifizierte Bereiche der hL1-cDNA wurden durch Sequenzierung überprüft. Die gewünschten eingefügten Mutationen wurden bestätigt, gleichzeitig traten keine unerwünschten Mutationen auf (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.2 Transfektion von B35-Neuroblastomzellen mit den cDNAs der verschiedenen L1-Mutanten

Die in 4.1.1 beschriebenen generierten L1-Konstrukte im eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 wurden stabil in parentale B35-Neuroblastomzellen (Schubert et al., 1974), die nur eine sehr geringe oder nicht detektierbare interne L1-Expression besitzen (Schmid et al., 2000; Needham et al., 2001), transfiziert. Die Transfektion von je 3 µg Plasmid erfolgte mit Hilfe von Lipofektamin und Plus-Reagenz (Invitrogen). Die Selektion der transfizierten Zellen wurde mit dem Neomycin-Analogon G418 (500 µg/mL) durchgeführt. Das Absterben der nicht transfizierten Zellen während der Selektion führte zu großem Stress für die überlebenden transfizierten Zellen. Bei Verteilungen der Transfektionsansätze in Kulturschalen im Bereich 1:5, 1:10 und 1:20 führte dies oftmals zum Absterben aller Zellen. Hingegen konnte dieser Stress bei Kulturschalen mit Verdünnungen der Transfektionsansätze im Bereich 1:50, 1:100 und 1:200 minimiert werden und so in der Regel einzelne Klone isoliert und weiterkultiviert werden. Positive Klone wurden durch eine Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen, gegen humanes L1 gerichteten Antikörper Neuro4 detektiert (siehe Abb. 10). Für alle Transfektionsansätze konnten mehrere homogene positive Klone isoliert werden.

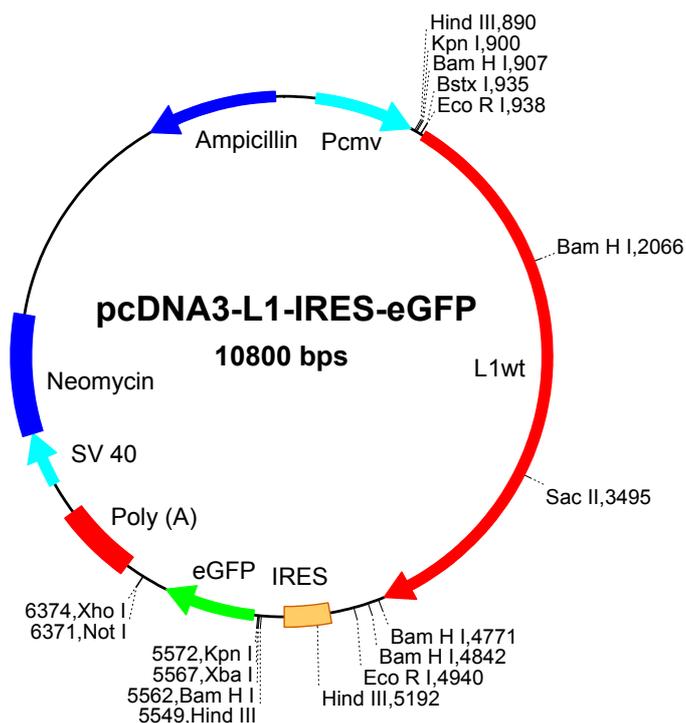


**Abb. 10: Beispiel für L1-transfizierte B35-Zellen.**

Der Nachweis von erfolgreich transfizierten Zellen erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung (IF) mit dem Antikörper Neuro4 und mit Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpern.

A: L1 transfizierte B35-Zellen,  
C: nicht transfizierte B35-Zellen,  
B und D: Phasenkontrastaufnahme zu A und C.  
Balken entspricht 25 µm.

Da die Transfektion von B35-Zellen mit den verschiedenen pcDNA3-L1-Plasmiden sowie die Detektion und Isolierung von positiven Klonen sich als schwierig erwies, wurde die kodierende Region der L1-wt-cDNA bzw. der mutierten L1-cDNAs mit EcoR I aus den verschiedenen generierten Plasmiden ausgeschnitten und in den zuvor durch EcoR I linearisierten Vektor pcDNA3-IRES-eGFP kloniert (siehe Abb. 11). Der Vektor ermöglicht neben der Expression des gewünschten Proteins durch eine sogenannte interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) zusätzlich die Expression des „enhanced green fluorescent protein“- (eGFP)-Reporterproteins. Nach der Transfektion von B35-Zellen mit diesen Plasmiden sollten positive Klone, die die transfizierten L1-Konstrukte exprimieren, durch die Fluoreszenz des gleichzeitig exprimierten eGFPs identifiziert werden. Allerdings konnten weder bei der Betrachtung lebender Zellen noch nach Fixierung der Zellen L1-positive Klone isoliert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die eingesetzte IRES in B35-Neuroblastomzellen nicht funktioniert und daher keine Expression von eGFP erfolgt. Ähnliche Probleme der Funktion von IRES von mit vergleichbaren Vektoren transfizierten Neuroblastomzellen konnten durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt werden (PD Dr. S. Baader, Institut für Anatomie und Zellbiologie, persönliche Mitteilung). Aufgrund der dargestellten Problematik wurde dieser Ansatz verworfen und im Folgenden mit den in Tab. 15 beschriebenen Konstrukten weitergearbeitet.

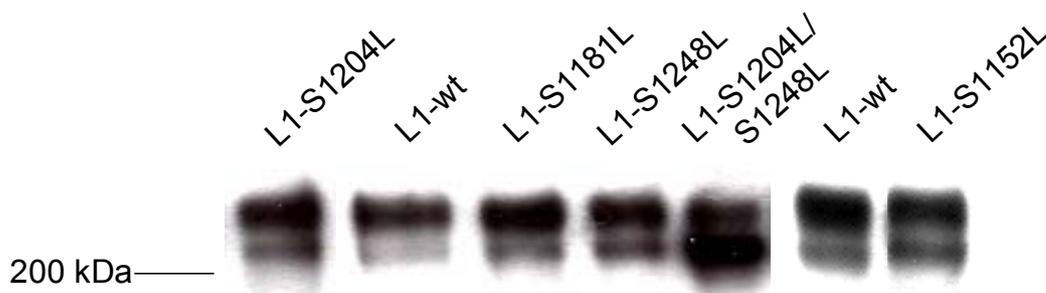


**Abb. 11: Darstellung des Plasmids pcDNA3-L1-IRES-eGFP.**

Die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) ermöglicht die Expression der einklonierten L1-cDNA sowie von eGFP.

### 4.1.3 Western Blot der B35-Transfektanten

Durch die Western Blot-Analyse sollte die Expression der mutierten L1-Proteine in B35-Zellen untersucht werden und Klone identifiziert werden, deren Expressionsniveau dem vom B35-Zellen vergleichbar ist, die L1-wt (B35-L1-wt) exprimieren. Jeweils 20 µg von Zellhomogenaten der B35-L1-wt Zellen und der verschiedenen B35-Klone, die L1-Mutanten exprimieren, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Nach Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen humanes L1 (Neuro4) und POD gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm.



**Abb. 12: Vergleich des Expressionsniveaus der verschiedenen B35-L1-Transfektanten mit dem L1 spezifischen Antikörper Neuro4.**

Der Nachweis im Western Blot erfolgte mit dem gegen humanes L1 gerichteten Antikörper Neuro4 und POD gekoppelten sekundären Antikörpern. Es wurden jeweils 20 µg Protein der Zellhomogenate der verschiedenen B35-L1-Transfektanten in einem 6%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

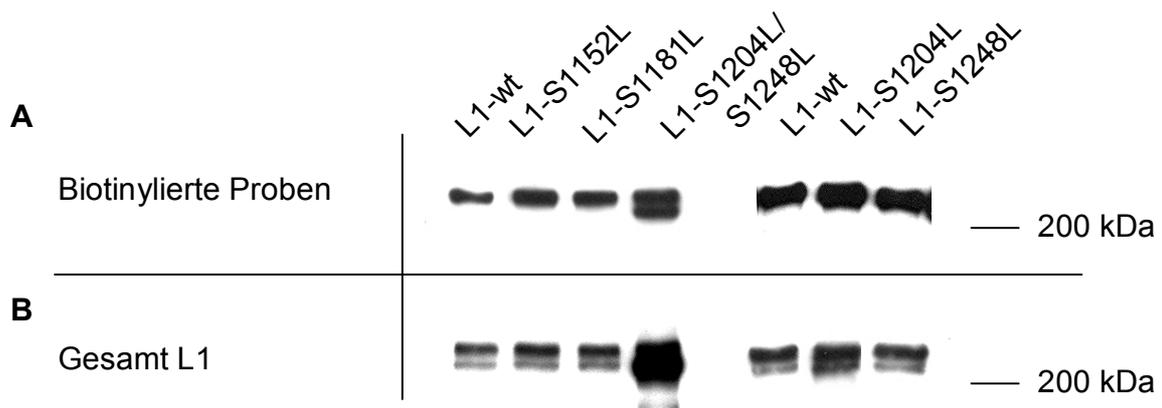
Im Western Blot konnten das L1-wt Protein sowie die verschiedenen mutierten L1 Proteine als eine Doppelbande bei etwa 210 und 220 kDa detektiert werden. Ein Vergleich der Intensität der beiden Banden zeigte, dass bei L1-wt, L1-S1152L, L1-S1181L, L1-S1204L, und L1-S1248L die obere Bande (220 kDa) deutlich stärker ist als die untere Bande (210 kDa). Bei L1-S1204L/S1248L exprimierenden B35-Neuroblastomzellen hingegen wurde bei sämtlichen untersuchten Klonen eine

stärkere 210 kDa Bande detektiert. Von allen in B35-Zellen transfizierten L1-Konstrukten wurde jeweils ein Klon ausgewählt, dessen Expressionsstärke der jeweils exprimierten L1-Mutanten mit der von L1-wt exprimierenden B35-Zellen vergleichbar war. (siehe Abb. 12). Bei der Wahl eines B35-L1-S1204L/S1248L Klons wurde die Intensität des 220 kDa Signals als Maßstab verwendet. Es wurde mit folgenden B35-L1-Transfektanten weitergearbeitet:

- B35-L1-S1152L Klon 23
- B35-L1-S1181L Klon 53
- B35-L1-S1204L Klon 014
- B35-L1-S1248L Klon 3
- B35-L1-S1204L/S1248L Klon e40

#### **4.1.4 Nachweis von Zelloberflächen-assoziiertem L1**

Zur Untersuchung der Expression von L1 an der Zelloberfläche wurden zunächst alle Zelloberflächenproteine der B35-L1-wt-Zellen und der verschiedenen B35-Transfektanten mit Biotin markiert. Anschließend wurden die Zellen in Ripa-Lysepuffer homogenisiert und L1 mit dem Neuro4 Antikörper immunpräzipitiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der immunpräzipitierten Proteine in einem 6%igen SDS-Polyacrylamidgel wurden diese auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die biotinylierten und daher Zelloberflächen-assoziierten L1-Proteine wurden mit Streptavidin-POD nachgewiesen. Zur Entfernung von gebundenem Streptavidin-POD wurde die Nitrocellulosemembran anschließend gestrippt. Durch die folgende Inkubation der Nitrocellulosemembran mit dem Neuro4 Antikörper und mit POD gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte der Nachweis der gesamten immunpräzipitierten L1-Proteinmenge (siehe Abb. 13).



**Abb. 13: Nachweis von biotinyliertem zelloberflächenassoziiertem L1 und Gesamt-L1 in den verschiedenen B35-Transfektanten.**

Membranständiges L1 der verschiedenen B35-Transfektanten wurde durch Markierung der Oberflächenproteine mit Biotin und anschließende Immunpräzipitation mit dem Neuro4 Antikörper im Western Blot mit Streptavidin-POD nachgewiesen (A). Gesamt-L1 wurde nach Entfernen von Streptavidin-POD im Western Blot mit dem Neuro4 Antikörper und POD gekoppelten sekundären Antikörpern detektiert (B).

Für die B35-L1-wt, B35-L1-S1152L, B35-L1-S1181L, B35-L1-S1204L, und B35-L1-S1248L exprimierenden Zellen ergab sich, dass jeweils nur die 220 kDa Bande von L1 in die Plasmamembran integriert war. Die mit dem Neuro4 Antikörper detektierte 210 kDa Bande war nicht als biotinyliert nachzuweisen und kann daher intrazellulärem L1 zugeordnet werden. Bei B35-Zellen, die das Protein L1-S1204L/S1248L exprimieren, konnten sowohl die 220 kDa Bande, als auch die 210 kDa Bande von L1 an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Aus dem Vergleich der 210 kDa Western Blot Bande von L1-S1204L/S1248L (Abb. 13, B) mit der dazugehörigen biotinylierten Bande (Abb. 13, A) wird deutlich, dass der Zelloberflächen-assoziierte Anteil vergleichsweise gering ist, so dass der größte Teil sich wahrscheinlich intrazellulär befindet. Die Expression von L1-wt, L1-S1152L, L1-S1181L, L1-S1204L und L1-S1248L an der Zelloberfläche von B35-Zellen ist bei allen untersuchten Klonen ähnlich.

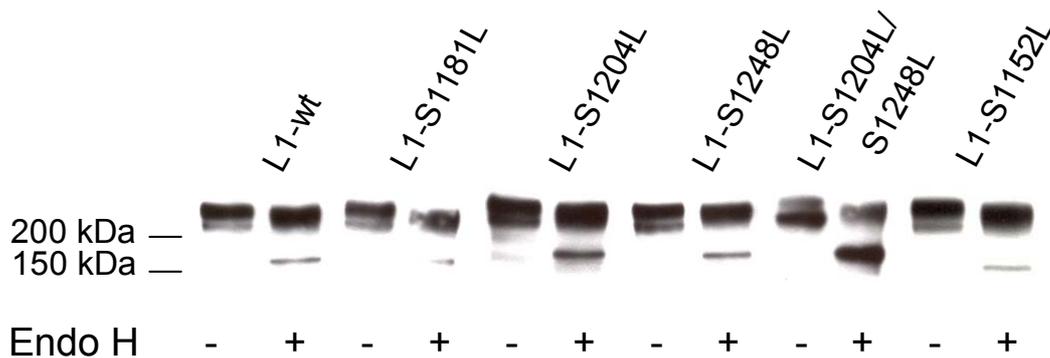
#### 4.1.5 Untersuchung der Glykosylierung von L1-wt und L1-Mutanten mit Endoglykosidase H

Um zu überprüfen, ob die L1-Doppelbande bei 220 und 210 kDa auf unterschiedliche Glykosylierung des Proteins zurückzuführen ist, wurden L1-wt Protein und die verschiedenen L1-Mutanten mit dem Enzym Endoglykosidase H behandelt. Dieses Enzym hydrolysiert N-Glykane vom oligomannosidischen oder Hybrid-Typ in der „core-Region“ von Oligosacchariden zwischen den zwei N-Acetylglukosamin (GlcNAc) Einheiten. Diese Glykane kommen überwiegend im endoplasmatischen Retikulum und dem cis-Golgi Apparat vor.

20 µg Protein der Zellhomogenate der verschiedenen L1-Transfektanten wurden für den Verdau durch Endoglykosidase H eingesetzt. Um den proteolytischen Abbau der Proteine während der Inkubation mit Endoglykosidase H über Nacht bei 37°C zu verhindern, wurden zudem Protease-Inhibitoren eingesetzt; parallel dazu wurden zur Kontrolle Zellhomogenate der verschiedenen L1-Mutanten ohne die Zugabe des Enzyms behandelt. Am folgenden Tag wurde der gesamte Ansatz durch SDS-PAGE aufgetrennt und L1 im Western Blot mit dem Neuro4 Antikörper und sekundären POD gekoppelten Antikörpern nachgewiesen.

Wie in Abb. 14 dargestellt, wurde bei den Kontroll-Zellhomogenaten die für L1 typische Doppelbande von 220 und 210 kDa nachgewiesen. Die Behandlung der Proben mit Endoglykosidase H führte zu einem Verlust der 210 kDa Bande von L1, gleichzeitig konnte auf der Höhe von 155 kDa eine Proteinbande detektiert werden, die in etwa dem Molekulargewicht von deglykosyliertem L1 entspricht (Linder et al., 1983). Da Endoglykosidase H anscheinend alle Glykane der 210 kDa Form von L1 entfernt ist anzunehmen, dass die Kohlenhydrate der 210 kDa Form von L1 dem oligomannosidischen/hybriden Typ entsprechen, d.h. dass L1 wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum und dem frühen cis-Golgi Apparat lokalisiert ist. Die Mutation der beiden durch erk2 phosphorylierbaren Serine des Zelladhäsionsmoleküls L1 führte im Vergleich zu L1-wt und den Mutanten L1-S1152L, L1-S1181L, L1-S1204L und L1-S1248L zu einer verstärkten Expression der 210 kDa Proteinbande von L1 (siehe auch Abb. 12 und 13). Die Reduzierung des Molekulargewichts dieser Bande von 210 kDa auf 155 kDa nach der Behandlung des Zellhomogenats mit Endoglykosidase H ist bei der L1-S1204L/S1248L-Mutante besonders ausgeprägt, so dass anzunehmen ist, dass

diese Mutation zu einer vermehrten Bildung von L1 mit unvollständig prozessierten Kohlenhydraten führt. Dies bedeutet in Übereinstimmung mit dem Experiment der Zelloberflächen-Biotinylierung, dass ein größerer Teil dieser L1-Mutante im Vergleich zu den anderen Mutanten und L1-wt nicht an die Zelloberfläche gelangt, sondern im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi Apparat lokalisiert ist.



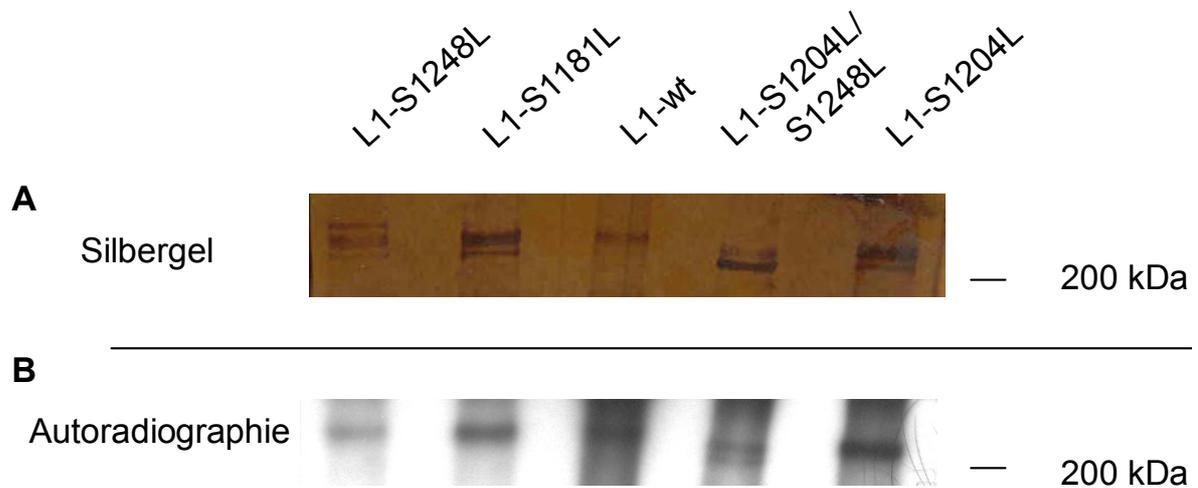
**Abb. 14: Western Blot von Zellhomogenaten mit und ohne Endoglykosidase H-Behandlung (EndoH -/+).**

Es wurden jeweils 20 µg Protein von Zellhomogenaten der verschiedenen B35-Transfektanten für die Inkubation mit Endoglykosidase H eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C unter Zusatz von Protease-Inhibitoren. Anschließend wurde nach SDS-PAGE L1 mit dem Neuro4 Antikörper und POD gekoppelten sekundären Antikörpern nachgewiesen.

#### 4.1.6 Untersuchung der Phosphorylierung der mutierten L1-Proteine

Um zu untersuchen, ob sich der Phosphorylierungsgrad der L1-Mutanten von dem des L1-wt Proteins unterscheidet und in welchem Umfang die einzelnen Serinreste zur Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L1 beitragen, wurden die B35-Transfektanten *in vivo* mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat markiert. Nach Immunpräzipitation von L1 mit dem Neuro4 Antikörper erfolgte die Auftrennung durch SDS-PAGE. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Silberfärbung des Gels sichtbar gemacht. Nach Trocknung der Gele wurden diese für den

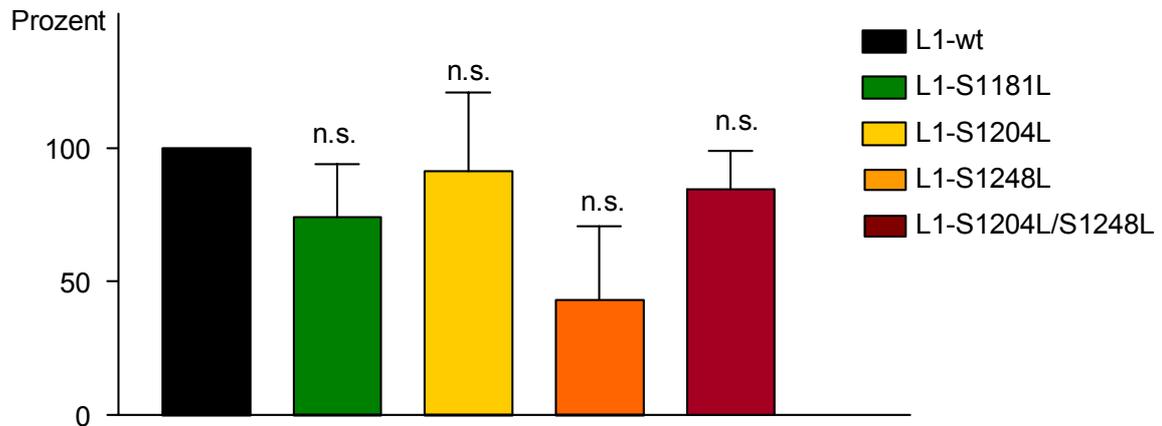
Nachweis der radioaktiven Signale mit einem Röntgenfilm bis zu 14 Tage bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.



**Abb. 15: Analyse der Phosphorylierung der L1-Mutanten im Vergleich zu L1-wt.**

Nach  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat-Markierung der jeweiligen B35-Transfektanten wurden die immunpräzipitierten Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung durch SDS-PAGE anschließend durch Silber angefärbt (A). In (B) ist die Autoradiographie der entsprechenden Proteinbanden dargestellt.

Im Silbergel konnte die für L1 typische Doppelbande von 220 und 210 kDa sowohl für L1-wt, als auch für die jeweiligen L1-Mutanten nachgewiesen werden. Die Autoradiographie der  $^{32}\text{P}$ -markierten und immunpräzipitierten Proteine L1-wt, L1-S1181L, L1-S1204L und L1-S1248L zeigt, dass nur die 220 kDa Bande phosphoryliert vorliegt, während die 210 kDa Bande nicht phosphoryliert ist. Eine Ausnahme stellt L1-S1204L/S1248L dar, da bei dieser L1-Mutante sowohl die 220 kDa Bande als auch die 210 kDa Bande  $^{32}\text{P}$ -Phosphat-markiert vorliegt. In der Silberfärbung wird zudem deutlich, dass die 210 kDa Bande von L1-S1204L/S1248L im Vergleich zu L1-wt und den anderen mutierten L1-Proteinen stärker ist. Dies bestätigt die Ergebnisse der Western Blot-Analyse (siehe Abb. 12).



**Abb. 16: Densitometrische Auswertung des Phosphorylierungsgrades der mutierten L1-Proteine in Relation zu L1-wt.**

Die 220 kDa Bande von L1 im Silbergel und die dazugehörige radioaktive Bande der Autoradiographie (siehe Abb. 15) wurden densitometrisch erfasst und bezogen auf die Proteinmenge quantitativ ausgewertet. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche ausgewertet, dabei wurden die Signale von L1-wt jeweils 100% gesetzt. Die statistische Analyse erfolgte durch Anwendung der einfaktoriellen ANOVA und des post-hoc Tests. Die Werte sind in %  $\pm$  SEM angegeben, n. s. = nicht signifikant.

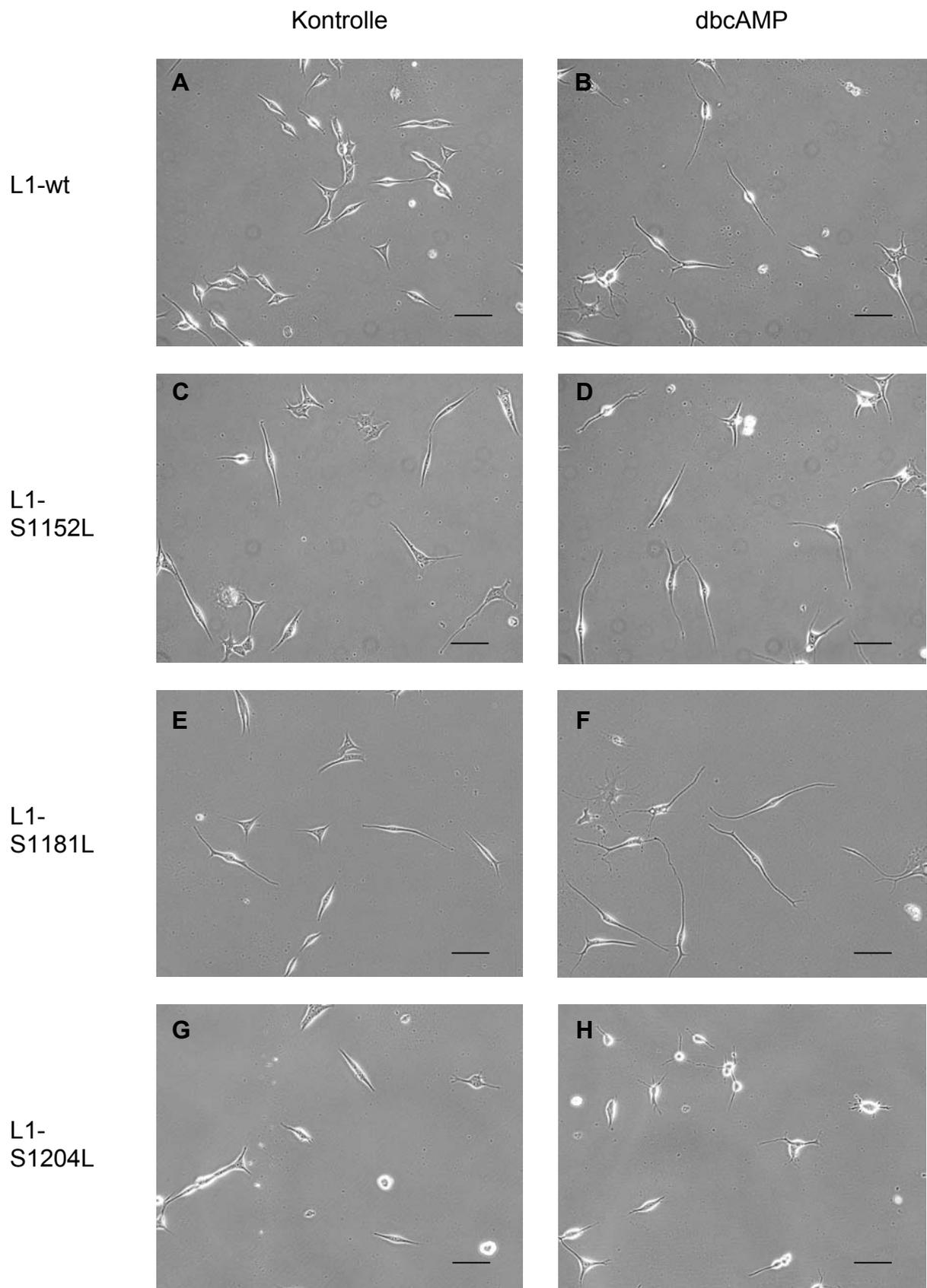
Für die Berechnung des Phosphorylierungsgrades wurden die Signale der Autoradiographie sowie die dazugehörigen Proteinbanden im Silbergel densitometrisch ausgewertet. Hierzu wurde die jeweiligen Signale durch die Software Aida (Version 2.11) berechnet und der entsprechende Hintergrund des Silbergels oder der Autoradiographie von diesem Wert abgezogen. Es wurden insgesamt drei Versuche ausgewertet. Die densitometrisch errechneten Werte für die L1-wt Signale wurden 100% gesetzt und mit den densitometrischen Werten der Transfektanten verglichen. Die statistische Auswertung (einfaktorielle ANOVA und post hoc Test) zeigt, dass der Phosphorylierungsgrad der Transfektanten im Vergleich zu L1-wt nicht signifikant verändert ist (Abb. 16). Unter den gewählten Bedingungen scheint der Austausch von einem Serin bzw. zwei Serinen in der cytoplasmatischen Domäne von L1 den Phosphorylierungsgrad von L1 nicht zu beeinflussen.

Die Transfektion der cDNA von L1-S1152L in B35-Neuroblastomzellen war zum Zeitpunkt der  $^{32}\text{P}$ -Phosphorylierungs-Versuche noch nicht abgeschlossen. Von der

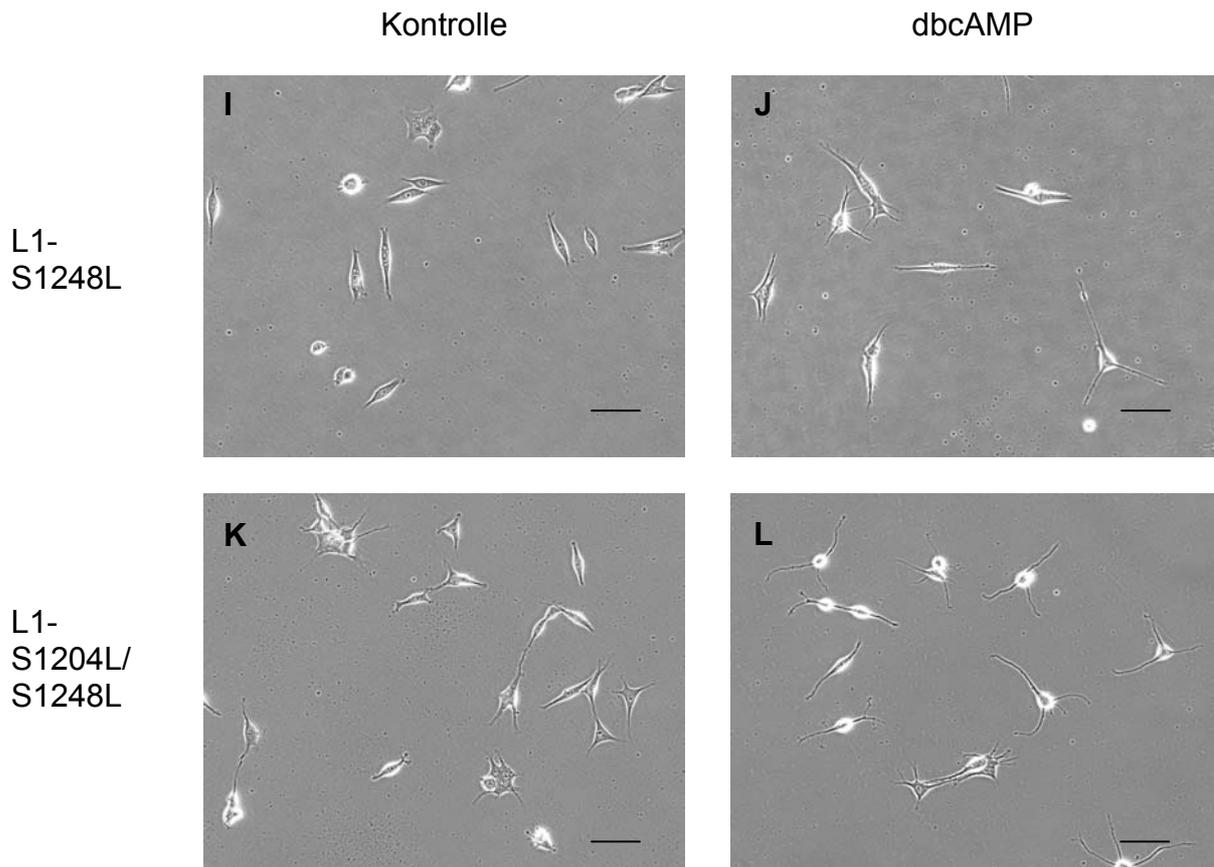
Untersuchung der Phosphorylierung dieser Mutante wurde abgesehen, da unter den gewählten Bedingungen auch bei L1-S1152L kein signifikanter Unterschied zum Phosphorylierungsgrad von L1-wt erwartet wurde.

#### **4.1.7 Untersuchung des basalen Neuritenwachstums**

Ziel der nachfolgend beschriebenen Experimente war es, die Frage zu beantworten, ob die Serin-Phosphorylierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 an der Regulation des zellautonomen, sogenannten basalen Neuritenwachstum beteiligt ist. Hierzu wurden die mit L1-wt, L1-S1152L, L1-S1181L, L1-S1204L, L1-S1248L und L1-S1204L/S1248L stabil transfizierten B35-Zellen auf dem inerten Substrat poly-L-Lysin (PLL) ausgesät und mit dbcAMP ausdifferenziert (siehe Abb. 17). Zur Kontrolle wurden auch nicht ausdifferenzierte Zellen untersucht. 24 Stunden nach der Ausdifferenzierung wurden die Schalen systematisch fotografiert, so dass ein repräsentatives Bild der Zellen gewonnen werden konnte. Anschließend wurde die Länge der Neuriten von etwa 30 bis 50 Zellen mit Hilfe des Softwareprogramms KS100 (Zeiss) bestimmt; pro Schale wurden mindestens 100 Neuriten vermessen. Um den Einfluss von trans-Interaktionen zwischen zwei Zellen auf das Neuritenwachstum auszuschließen, wurden nur die Neuriten vermessen, die keinen Kontakt zu einer anderen Zelle hatten. Außerdem mussten die vermessenen Neuriten eine Länge von mindestens 5  $\mu\text{m}$  aufweisen. Bei sich verzweigenden Neuriten wurde nur der Hauptzweig, d.h. der jeweils längste Neurit vermessen. Gleichzeitig wurde die Anzahl der vermessenen Neuriten pro Zelle ermittelt.



⇒ Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite



**Abb. 17: Repräsentative Phasenkontrastaufnahmen der verschiedenen B35-Transfektanten ohne und mit Ausdifferenzierung der Zellen durch dbcAMP.**

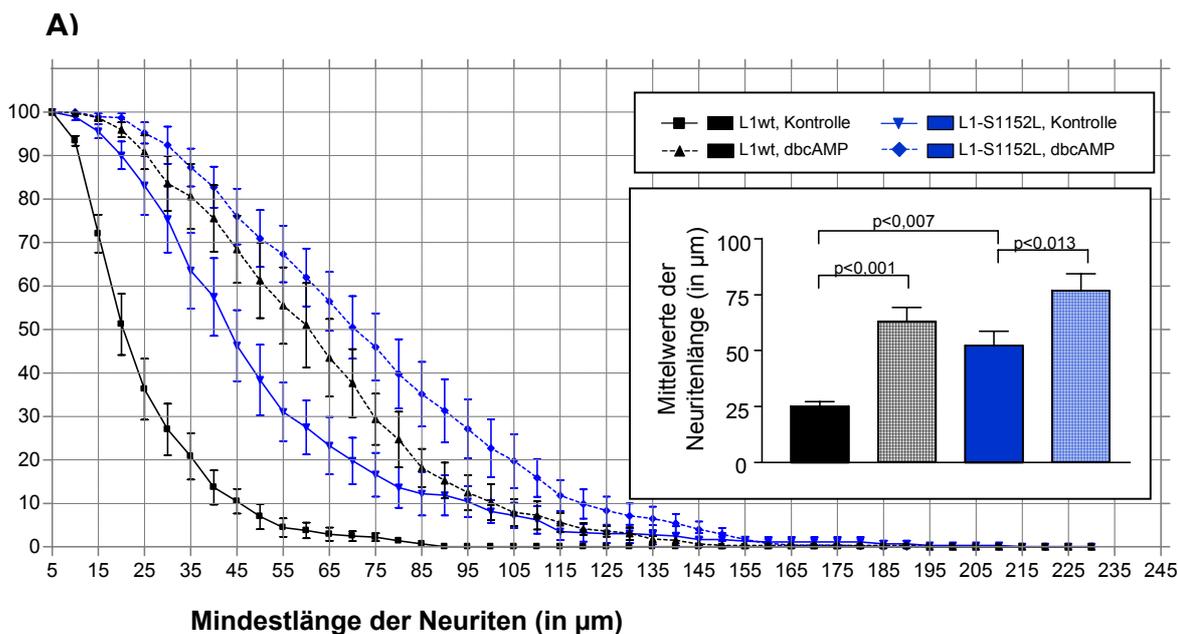
Für die Untersuchung des basalen Neuritenwachstums wurden  $10^5$  Zellen der verschiedenen B35-Transfektanten auf mit 0,01% PLL beschichteten Kulturschalen ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 1mM dbcAMP in X1-Medium ausdifferenziert und zur Kontrolle nur mit X1-Medium kultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen fotografiert und anschließend deren Neuritenlänge vermessen.

A), C), E), G), I), K) zeigen die verschiedenen B35-Transfektanten in X1-Medium ohne Ausdifferenzierung mit dbcAMP; B), D), F), H), J), L) zeigen die B35-Transfektanten 24 Stunden nach der Ausdifferenzierung mit 1 mM dbcAMP. Der Balken entspricht 50  $\mu$ m.

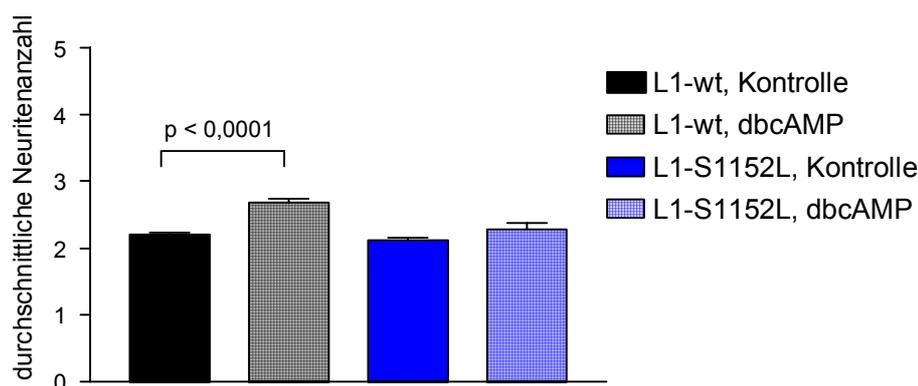
Bei allen Versuchen wurden die Ergebnisse von insgesamt fünf unabhängigen Experimenten ausgewertet, so dass pro Behandlung insgesamt etwa 500 Neuriten ausgemessen und statistisch ausgewertet wurden. Um sicherzustellen, dass die Neuritenlänge der untersuchten B35-Transfektanten auf die Expression der verschiedenen L1-Mutationen zurückzuführen ist und Unterschiede nicht durch Artefakte der einzelnen Klone zu Stande kommen, wurden die Ergebnisse durch die Untersuchung der Neuritenlänge von jeweils zwei weiteren Klonen pro L1-Mutation überprüft und konnten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Es kann

daher davon ausgegangen werden, dass stabil transfizierte B35-Zellen ein gutes System darstellen, um verschiedene Parameter wie beispielsweise die Neuritenlängen in Abhängigkeit von der Expression verschiedener Proteine zu untersuchen.

Die mikroskopische Betrachtung der Zellen lässt bereits erkennen, dass bei allen B35-Zellen, die entweder den Wildtyp oder die Mutanten von L1 exprimieren, die Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP mit einem signifikanten Anstieg der Neuritenlängen verbunden ist. Wie erwartet, führt daher die Differenzierung der Zellen in einen neuronalen Typ zu einem verstärkten Neuritenwachstum. Für die detaillierte Auswertung der Neuritenlänge und der durchschnittlichen Neuritenanzahl pro Zelle werden im Folgenden die B35-L1-S1152L, B35-L1-S1181L exprimierenden Zellen sowie die drei L1-Mutanten, deren Phosphorylierungsstellen für die Kinase erk2 mutiert sind (L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L), einzeln betrachtet und mit L1-wt exprimierenden B35-Zellen verglichen.



**B)**

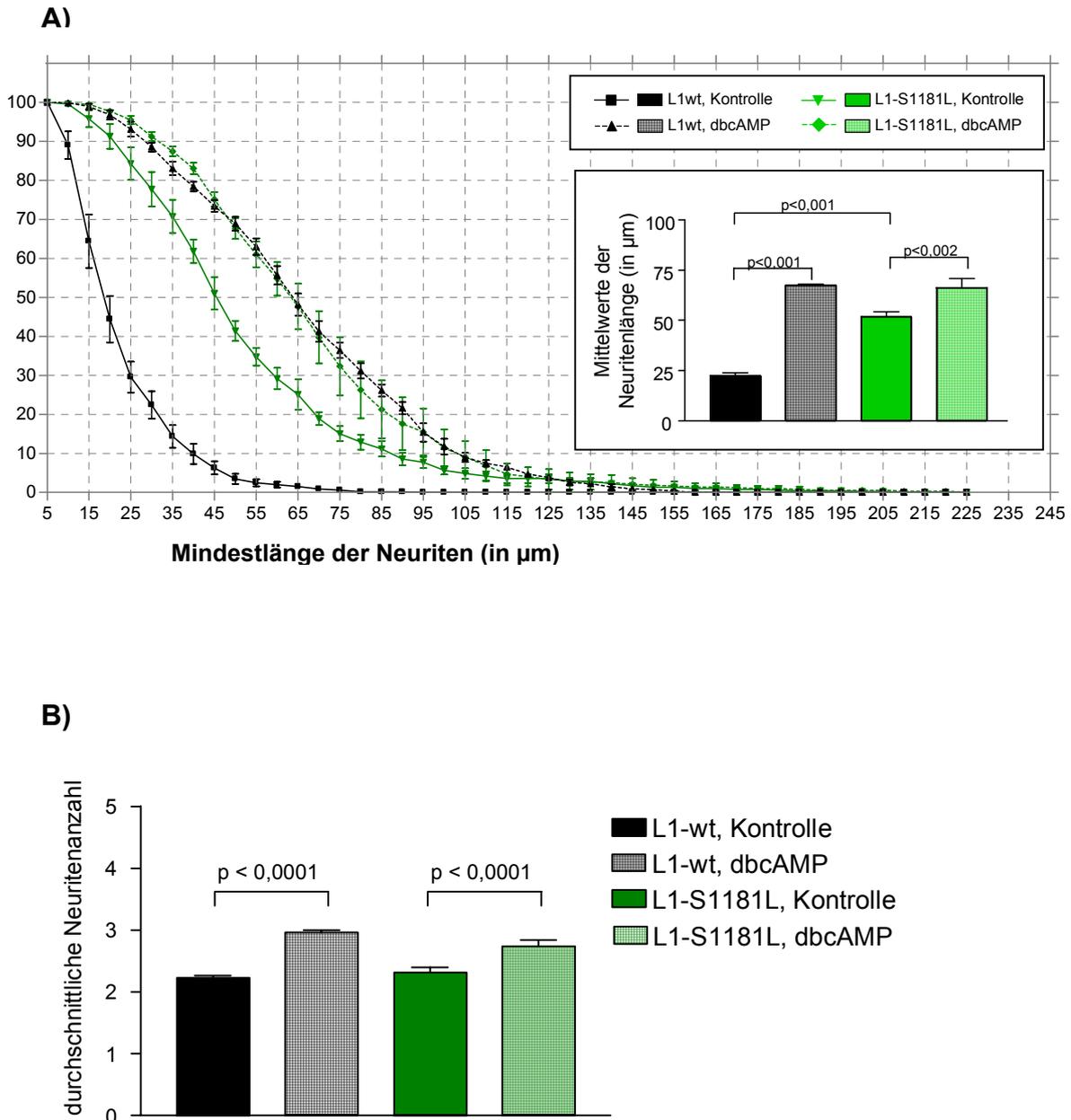


**Abb. 18: Statistische Auswertung der Neuritenlänge und Neuritenanzahl von L1-wt und L1-S1152L exprimierenden B35-Zellen mit und ohne Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.**

In der Graphik (A) ist die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Mindestlänge der Neuriten in Prozent dargestellt. Da nur Neuriten ab einer Länge von 5 µm gemessen wurden, besitzen 100% der ausgewerteten Zellen eine Länge von mindestens 5 µm.

Der prozentuale Anteil an Neuriten mit einer bestimmten Mindestlänge (Y-Achse) nimmt mit zunehmender Neuritenlänge bis zur jeweiligen maximalen Neuritenlänge ab. Außerdem sind im Balkendiagramm (A) die Mittelwerte der Neuritenlängen ± SEM angegeben. In (B) ist die durchschnittliche Neuritenanzahl der ausgezählten Zellen ± SEM dargestellt. Für die statistische Analyse wurden jeweils fünf unabhängige Experimente ausgewertet. Signifikante Unterschiede sind durch die Angabe der jeweiligen Signifikanz gekennzeichnet (einfaktorielle ANOVA mit anschließendem post hoc Test).

Wie aus der Darstellung der Ergebnisse in Abb. 4.18 (A) hervorgeht, ist das basale Neuritenwachstum von L1-S1152L exprimierenden B35-Zellen im nicht ausdifferenzierten Zustand im Vergleich zu B35-L1-wt Zellen signifikant erhöht. Während L1-wt exprimierende B35-Zellen im undifferenzierten Zustand durchschnittlich eine Neuritenlänge von 23  $\mu\text{m}$  aufwiesen, waren die Neuriten von L1-S1152L exprimierenden B35-Zellen mit durchschnittlich 52  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,007$ ) ungefähr doppelt so lang. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Phosphorylierung des Ser-1152 durch die Kinase  $p90^{\text{rsk}}$  an der Regulation des basalen Neuritenwachstums beteiligt ist. Nach Ausdifferenzierung der B35-Zellen war die Länge der Neuriten von L1-S1152L exprimierenden Zellen mit durchschnittlich 77  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu L1-wt exprimierenden Zellen mit durchschnittlich 63  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,130$ ) nicht signifikant erhöht. Das bedeutet, dass das basale Neuritenwachstum nur in nicht differenzierten B35-Zellen signifikant erhöht ist, wenn das Ser-1152 des Zelladhäsionsmoleküls L1 durch die Kinase  $p90^{\text{rsk}}$  nicht phosphoryliert werden kann. Die durchschnittliche Anzahl der Neuriten pro Zelle wurde bei L1-wt exprimierenden B35-Zellen durch die Ausdifferenzierung mit dbcAMP von 2,1 Neuriten pro Zelle auf 2,7 Neuriten pro Zelle signifikant erhöht. Hingegen blieb die Anzahl der Neuriten pro Zelle bei L1-S1152L exprimierenden B35-Zellen nach der Ausdifferenzierung mit etwa 2 Neuriten pro Zelle konstant (Abb. 4.18, B).



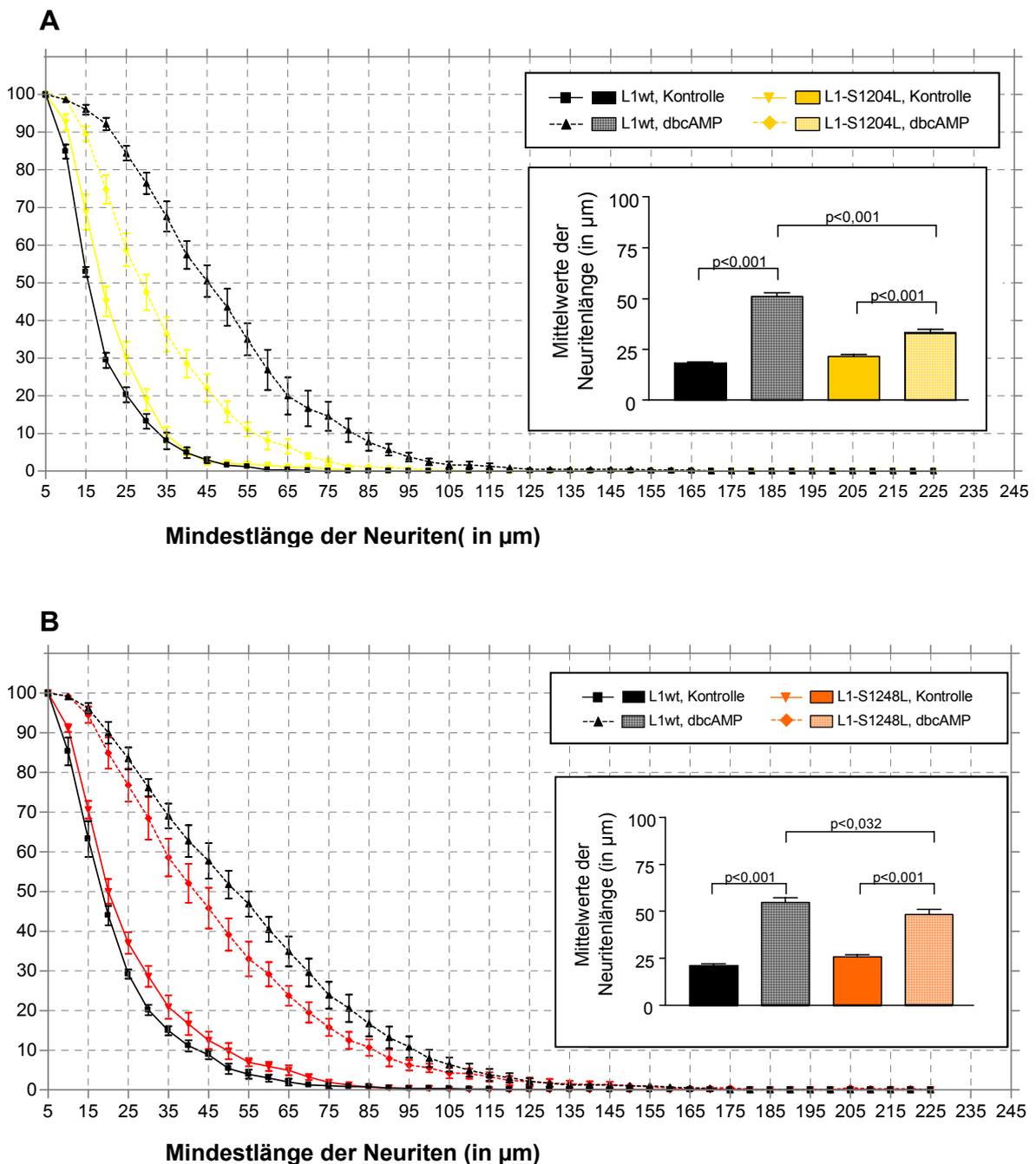
**Abb. 19: Statistische Auswertung der Neuritenlänge und Neuritenanzahl von L1-wt und L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen mit und ohne Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.**

In der Graphik (A) ist die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Mindestlänge der Neuriten in Prozent dargestellt. Da nur Neuriten ab einer Länge von 5 µm gemessen wurden, besitzen 100% der ausgewerteten Zellen eine Länge von mindestens 5 µm.

Der prozentuale Anteil an Neuriten mit einer bestimmten Mindestlänge (Y-Achse) nimmt mit zunehmender Neuritenlänge bis zur jeweiligen maximalen Neuritenlänge ab. Außerdem sind im Balkendiagramm (A) die Mittelwerte der Neuritenlängen ± SEM angegeben. In (B) ist die durchschnittliche Neuritenanzahl der ausgezählten Zellen ± SEM dargestellt. Für die statistische Analyse wurden jeweils fünf unabhängige Experimente ausgewertet. Signifikante Unterschiede sind durch die Angabe der jeweiligen Signifikanz gekennzeichnet (einfaktorielle ANOVA mit anschließendem post hoc Test).

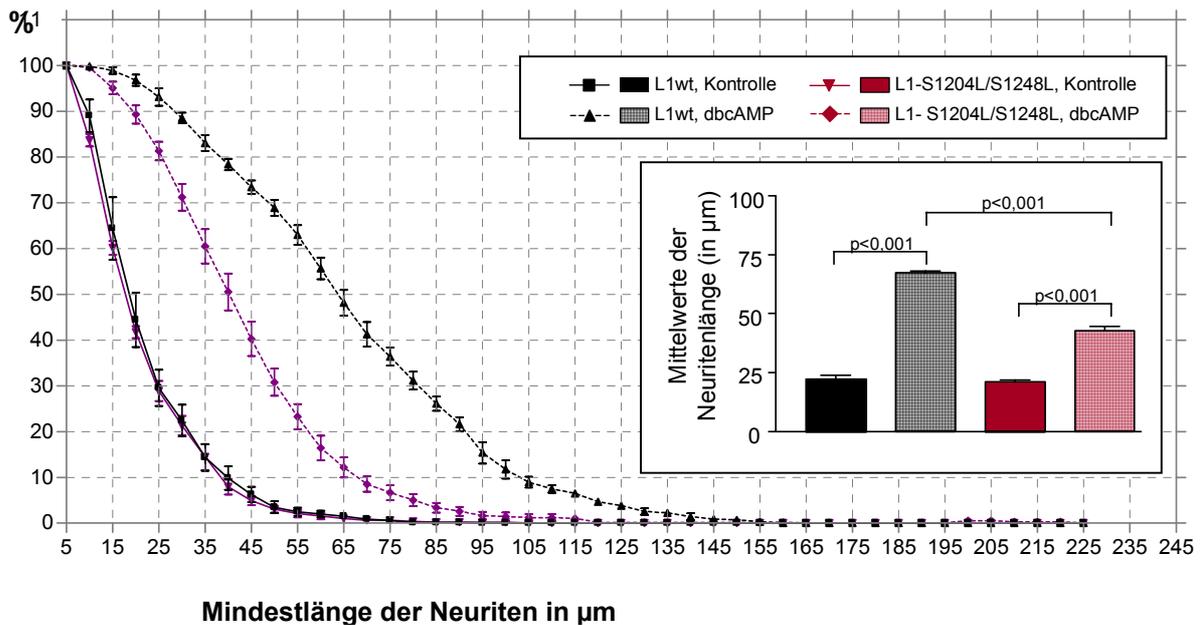
Auch bei dem Vergleich von L1-S1181L mit L1-wt exprimierenden B35-Zellen konnten für das basale Neuritenwachstum signifikante Unterschiede festgestellt werden (siehe Abb. 19). Die Mittelwerte der durchschnittlichen Neuritenlänge der nicht ausdifferenzierte B35-L1-S1181L Zellen sind mit etwa 52  $\mu\text{m}$  ähnlich wie die der B35-L1-S1152L Zellen doppelt so groß wie die der L1-wt exprimierenden B35-Zellen (durchschnittliche Neuritenlänge etwa 23  $\mu\text{m}$ ). Dieser Unterschied konnte allerdings nach der Ausdifferenzierung der B35-Transfektanten mit dbcAMP nicht mehr festgestellt werden. Die Neuritenlängen der B35-L1-wt und B35-L1-S1181L exprimierenden Zellen nähern sich nach der Ausdifferenzierung mit dbcAMP vielmehr an: mit einem Mittelwert von 67  $\mu\text{m}$  für L1-wt und 66  $\mu\text{m}$  für L1-S1181L exprimierende B35-Zellen waren sie nahezu identisch. Zusammengefasst kann man sagen, dass der Verlust der Phosphorylierung des cytoplasmatischen Ser-1181 von L1 das basale Neuritenwachstum bei nicht ausdifferenzierten Zellen signifikant erhöht, während dessen Phosphorylierung das basale Neuritenwachstum von ausdifferenzierten Zellen – ähnlich wie bei L1-S1152L exprimierenden B35-Zellen – nicht beeinflusst.

Wie bereits erwähnt, führte die Ausdifferenzierung von L1-wt exprimierenden B35-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der durchschnittlichen Anzahl von Neuriten pro Zelle. Dieser Anstieg konnte auch bei L1-S1181L exprimierenden B35 Zellen festgestellt werden und entsprach mit einer durchschnittlichen Neuritenanzahl von 2,7 Neuriten den L1-wt exprimierenden B35-Zellen mit 2,8 Neuriten pro Zelle.



**Abb. 20: Statistische Auswertung der Neuritenlänge von L1-wt und L1-S1204L sowie L1-S1248L exprimierenden B35-Zellen mit und ohne Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.**

In den Graphiken (A, B) ist jeweils die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Mindestlänge der Neuriten in Prozent dargestellt. Da nur Neuriten ab einer Länge von 5  $\mu\text{m}$  gemessen wurden, besitzen 100% der ausgewerteten Zellen eine Länge von mindestens 5  $\mu\text{m}$ . Der prozentuale Anteil an Neuriten mit einer bestimmten Mindestlänge (Y-Achse) nimmt mit zunehmender Neuritenlänge bis zur jeweiligen maximalen Neuritenlänge ab. Außerdem sind in den nebenstehenden Balkendiagrammen die Mittelwerte der Neuritenlängen  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Unterschiede sind durch die Angabe der jeweiligen Signifikanz gekennzeichnet (einfaktorielle ANOVA mit anschließendem post hoc Test).



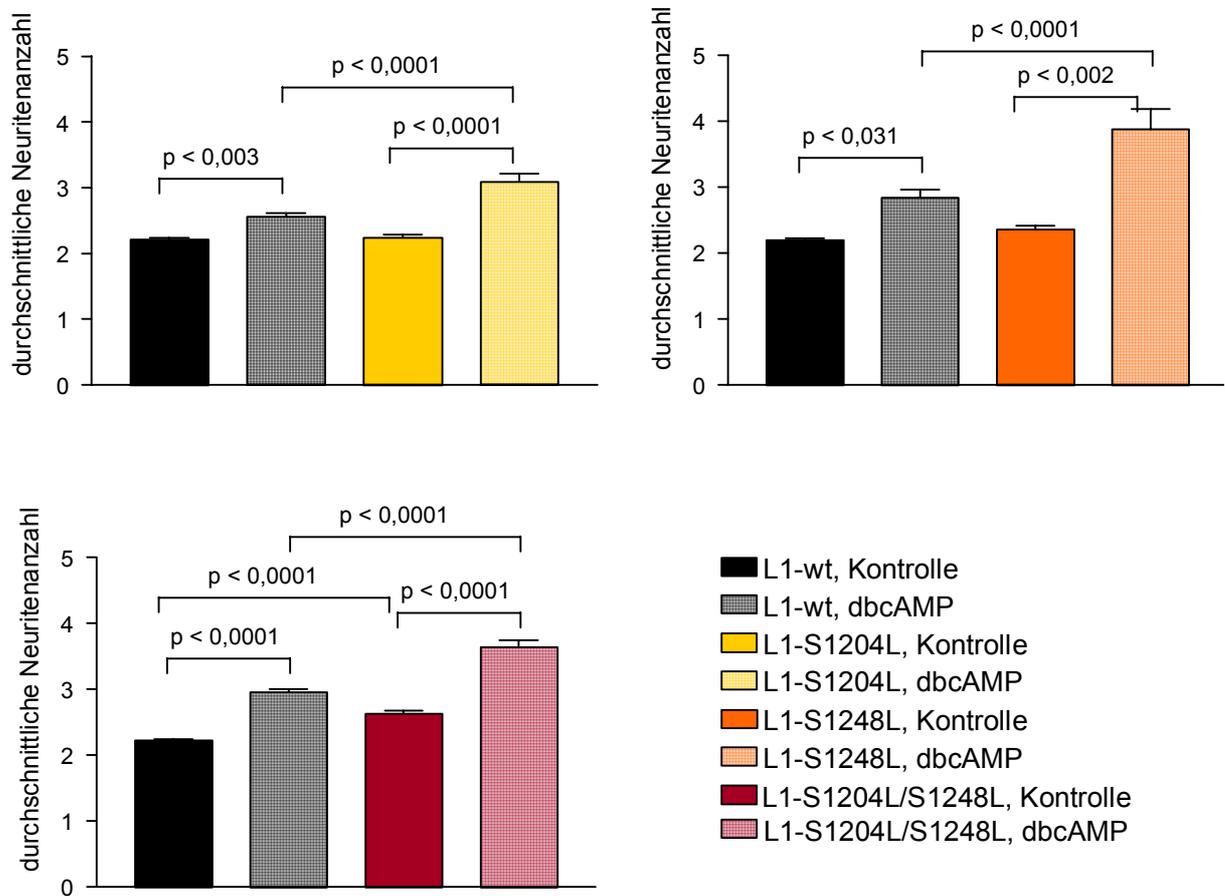
**Abb. 21: Statistische Auswertung der Neuritenlänge von B35-L1-wt und B35-L1-S1204L/S1248L exprimierenden Zellen ohne und nach der Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.**

In der Graphik ist jeweils die Anzahl der Zellen mit einer bestimmten Mindestlänge der Neuriten in Prozent dargestellt. Da nur Neuriten ab einer Länge von fünf  $\mu\text{m}$  gemessen wurden, besitzen 100% der ausgewerteten Zellen eine Länge von mindestens 5  $\mu\text{m}$ . Der prozentuale Anteil an Neuriten mit einer bestimmten Mindestlänge (Y-Achse) nimmt mit zunehmender Neuritenlänge bis zur jeweiligen maximalen Neuritenlänge ab. Außerdem sind im nebenstehenden Balkendiagramm die Mittelwerte der Neuritenlängen  $\pm$  SEM angegeben. Signifikante Unterschiede sind durch die Angabe der jeweiligen Signifikanz gekennzeichnet (einfaktorielle ANOVA mit anschließendem post hoc Test).

Während L1-S1152L und L1-S1181L exprimierenden undifferenzierte Zellen ein verstärktes Neuritenwachstum aufwiesen, zeigten die verschiedenen L1-Mutanten, in denen jeweils eine oder alle beide durch erk2 phosphorylierbaren Serine zu Leucin mutiert worden waren (L1-erk2-Mutanten) im Vergleich zu B35-L1-wt keinen Unterschied in der Neuritenlänge, wenn die Zellen nicht ausdifferenziert waren. Vergleicht man die durchschnittliche Neuritenlänge von etwa 23  $\mu\text{m}$  von L1-wt exprimierenden undifferenzierten Zellen mit der durchschnittlichen Neuritenlänge der B35-L1-S1204L Zellen von 22  $\mu\text{m}$ , der B35-L1-S1248L Zellen von 25  $\mu\text{m}$  und der B35-L1-S1204L/S1248L Zellen von 21  $\mu\text{m}$ , so wird deutlich, dass die Länge der Neuriten bei undifferenzierten Zellen nahezu unverändert ist (siehe Abb. 20, A, B und Abb. 21). Die Phosphorylierung des

Zelladhäsionsmoleküls L1 durch die Kinase erk2 scheint daher bei undifferenzierten Zellen keine Bedeutung zu haben. Die statistische Auswertung der Neuritenlängen nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP ergab für L1-S1204L und L1-S1248L im Vergleich zu L1-wt exprimierenden Zellen unterschiedliche Effekte. Das Neuritenwachstum von ausdifferenzierten L1-S1204L exprimierenden Zellen war mit durchschnittlich 33 µm im Vergleich zu B35-L1-wt um mehr als 1/3 signifikant reduziert (siehe Abb. 20, A). Auch ausdifferenzierte B35-L1-S1248L Zellen zeigten im Vergleich zu L1-wt exprimierenden Zellen ein signifikant verringertes Neuritenwachstum, allerdings bei einer durchschnittlichen Neuritenlänge von 48 µm von deutlich geringerem Ausmaß. Die Mutante L1-S1204L/S1248L, bei der beide durch erk2 phosphorylierbaren Serine gegen nicht phosphorylierbare Leucine ausgetauscht worden waren, bewirkte nach ihrer Expression in ausdifferenzierten B35-Zellen im Vergleich zu B35-L1-wt Zellen die Ausbildung von deutlich kürzeren Neuriten. Ähnlich wie bei L1-S1204L exprimierenden Zellen war die Neuritenlänge im Vergleich zu B35-L1-wt etwa um 1/3 signifikant vermindert. Da schon der Austausch von Ser-1204 der cytoplasmatischen Domäne von L1 das Neuritenwachstum in ausdifferenzierten B35-Zellen ähnlich stark reduziert wie die Mutante L1-S1204L/S1248L, ist die Bedeutung der Phosphorylierung von Ser-1248 geringer als die Phosphorylierung von Ser-1204 für das basale Neuritenwachstum einzuschätzen.

Durch Ausdifferenzierung der B35-Transfektanten (B35-L1-S1204L, B35-L1-S1248L und B35-L1-S1204L/S1248L), nahm die Anzahl der Neuriten pro Zelle wie bei den zuvor beschriebenen L1-wt und L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen signifikant zu (siehe Abb. 16). Bei den untersuchten L1-erk2-Mutanten war dieser Anstieg noch deutlich höher. L1-S1248L exprimierende Zellen wiesen mit einer Neuritenanzahl von durchschnittlich 3,9 Neuriten pro Zelle die stärkste Zunahme auf. Allerdings war auch die Anzahl der Neuriten pro Zelle bei B35-L1-S1204L- (3,1 Neuriten pro Zelle) und B35-L1-S1204L/S1248L- (3,6 Neuriten pro Zelle) Zellen im Vergleich zu L1-wt exprimierenden Zellen (maximal 2,7 Neuriten pro Zelle) signifikant erhöht. Die Abnahme der Neuritenlänge in ausdifferenzierten L1-erk2-Mutanten exprimierenden Zellen scheint mit einer Zunahme der Neuriten pro Zelle verbunden zu sein.

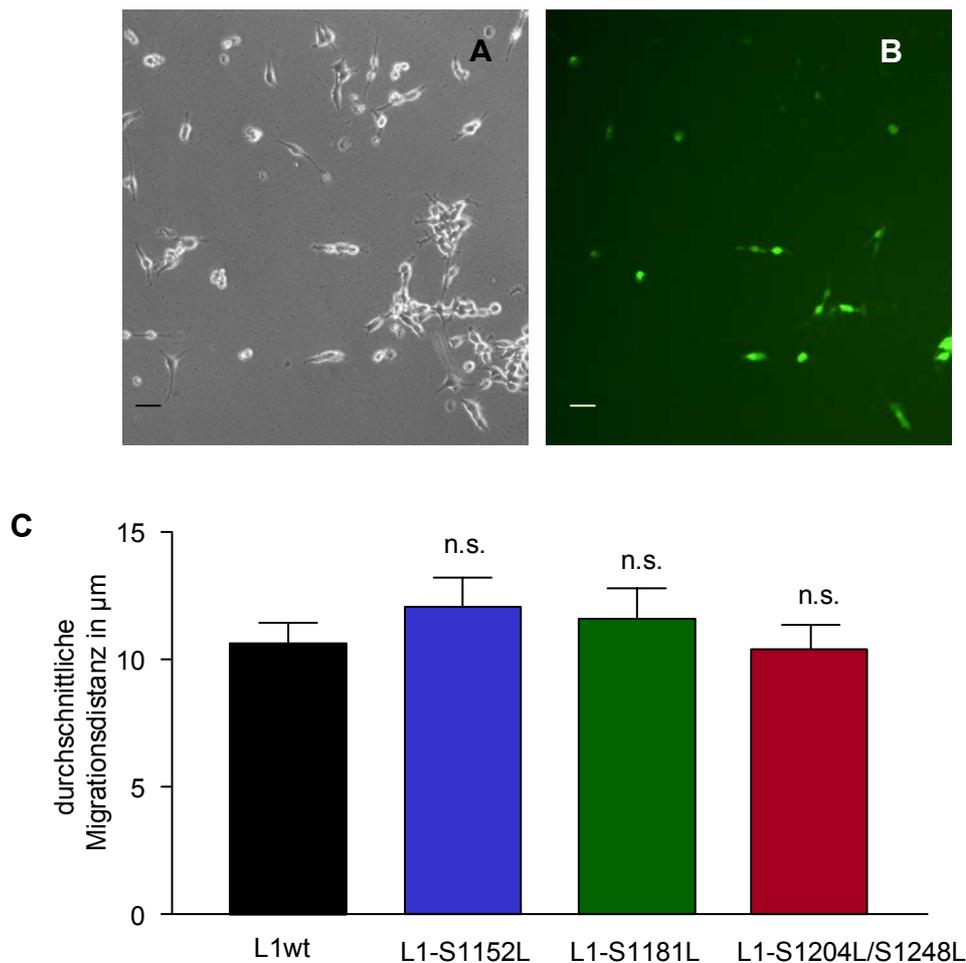


**Abb. 22: Statistische Auswertung der durchschnittlichen Neuritenanzahl der L1-S1204L, L1-S1248L und L1-S1204L/S1248L exprimierenden B35-Zellen im Vergleich zu B35-L1-wt.**

In den Balkendiagrammen ist jeweils die durchschnittliche Neuritenanzahl der Zellen  $\pm$  SEM dargestellt. Für die statistische Analyse wurden insgesamt etwa 200 Zellen von fünf unabhängigen Experimenten ausgewertet. Signifikante Unterschiede sind durch die Angabe der jeweiligen Signifikanz gekennzeichnet (einfaktorielle ANOVA mit anschließendem post hoc Test).

#### **4.1.8 Untersuchung der Migration von L1 und L1-Mutanten exprimierenden B35-Zellen auf PLL**

Durch das nachfolgend beschriebene Experiment sollte die Migration von B35-Zellen auf PLL in Abhängigkeit der Expression von L1-wt oder den verschiedenen L1-Mutanten untersucht werden. Hierzu wurden parentale B35-Zellen transient mit der cDNA von L1 und einem Plasmid, welches die cDNA für eGFP (enhanced green fluorescent protein) enthielt, im Mengenverhältnis 10:1 transfiziert. Dieses Mengenverhältnis wurde gewählt, da man davon ausgehen kann, dass nach der Transfektion alle eGFP exprimierenden Zellen mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 90% auch das zu untersuchende L1 Protein exprimieren. Die Untersuchung der Migration in Abhängigkeit von der Expression von L1-wt, L1-S1152L, L1-S1181L und L1-S1204L/S1248L erfolgte durch die Betrachtung der eGFP exprimierenden Zellen für 1,5 Stunden (siehe Abb. 23). Die Zellen wurden alle fünf Minuten durch einen FITC-Filter fotografiert. Um die Zellen nicht zu schädigen, wurde das UV-Licht nur für die entsprechenden Aufnahmen angeschaltet. Für die Messung der Migrationsstrecke wurde der Mittelpunkt des Zellkörpers einer grün fluoreszierenden Zelle auf dem ersten und dem letzten Foto markiert. Anschließend wurde die Migration der Zelle durch geradlinige Verbindung der beiden Punkte mit der Axiovision Software bestimmt.



**Abb. 23: Migration von mit L1 oder den verschiedenen L1-Mutanten transient transfizierten parental B35-Zellen.**

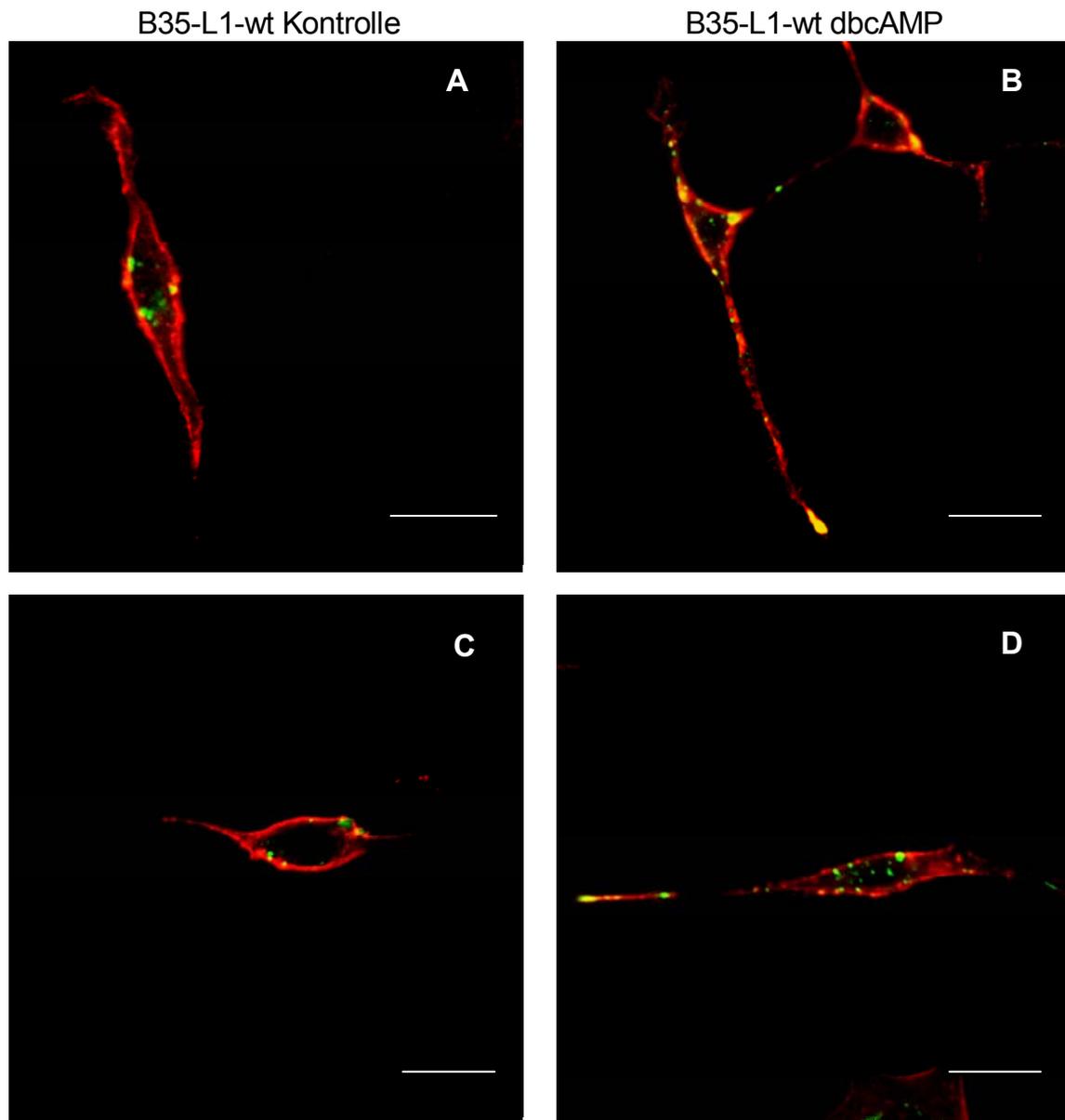
Nach der Co-Transfektion der Plasmide mit der cDNA für L1 bzw. für L1-Mutanten sowie der cDNA für eGFP im Verhältnis 10:1 wurden die Zellen für den Zeitraum von etwa 1,5 Stunden beobachtet. eGFP exprimierende Zellen wurden im Abstand von 5 Min. fotografiert und anschließend der in dieser Zeit zurückgelegte Weg (Migration in  $\mu\text{m}$ ) mit der Software von Axiovision ausgewertet. (A) Phasenkontrastaufnahme der transfizierten parental B35-Zellen. (B) Fluoreszenzaufnahme der eGFP exprimierenden Zellen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 90% auch das zu untersuchende L1 Protein exprimieren. Der Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ . Für die Berechnung der durchschnittlichen Migrationsdistanz wurde die Migration von mindestens 25 Zellen pro Versuch gemessen und durch die Anwendung der einfaktoriellen ANOVA und des post hoc Tests statistisch ausgewertet.

Für die statistische Auswertung wurde die Migrationsstrecke von jeweils mindestens 30 grünfluoreszierenden Zellen vermessen. Die Ergebnisse der Varianzanalyse zeigen, dass sich die Migration von B35-L1-S1152L mit durchschnittlich 12,1  $\mu\text{m}$ , B35-L1-S1181L mit durchschnittlich 11,6  $\mu\text{m}$  und B35-L1-S1240L/S1248L mit einer durchschnittlichen Migrationsdistanz von 10,4  $\mu\text{m}$

nicht signifikant von L1-wt exprimierenden B35-Zellen mit einer durchschnittlichen Migrationsdistanz von 10,5  $\mu\text{m}$  unterscheidet. Auch bei der differenzierteren Betrachtung der Verteilungen der Migrationsdistanzen (kumulativen Häufigkeiten) konnten bei den verschiedenen L1-Mutationen im Vergleich zu L1-wt exprimierenden Zellen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Migration von L1 exprimierenden B35-Zellen auf einem inerten Substrat wie PLL nicht durch die Phosphorylierung der Serine Ser-1152, Ser-1181, Ser-1204 und Ser-1248 des Zelladhäsionsmoleküls L1 beeinflusst zu werden scheint.

#### **4.1.9 Endocytose von L1-wt und L1-S1181L in stabil transfizierten B35-Zellen**

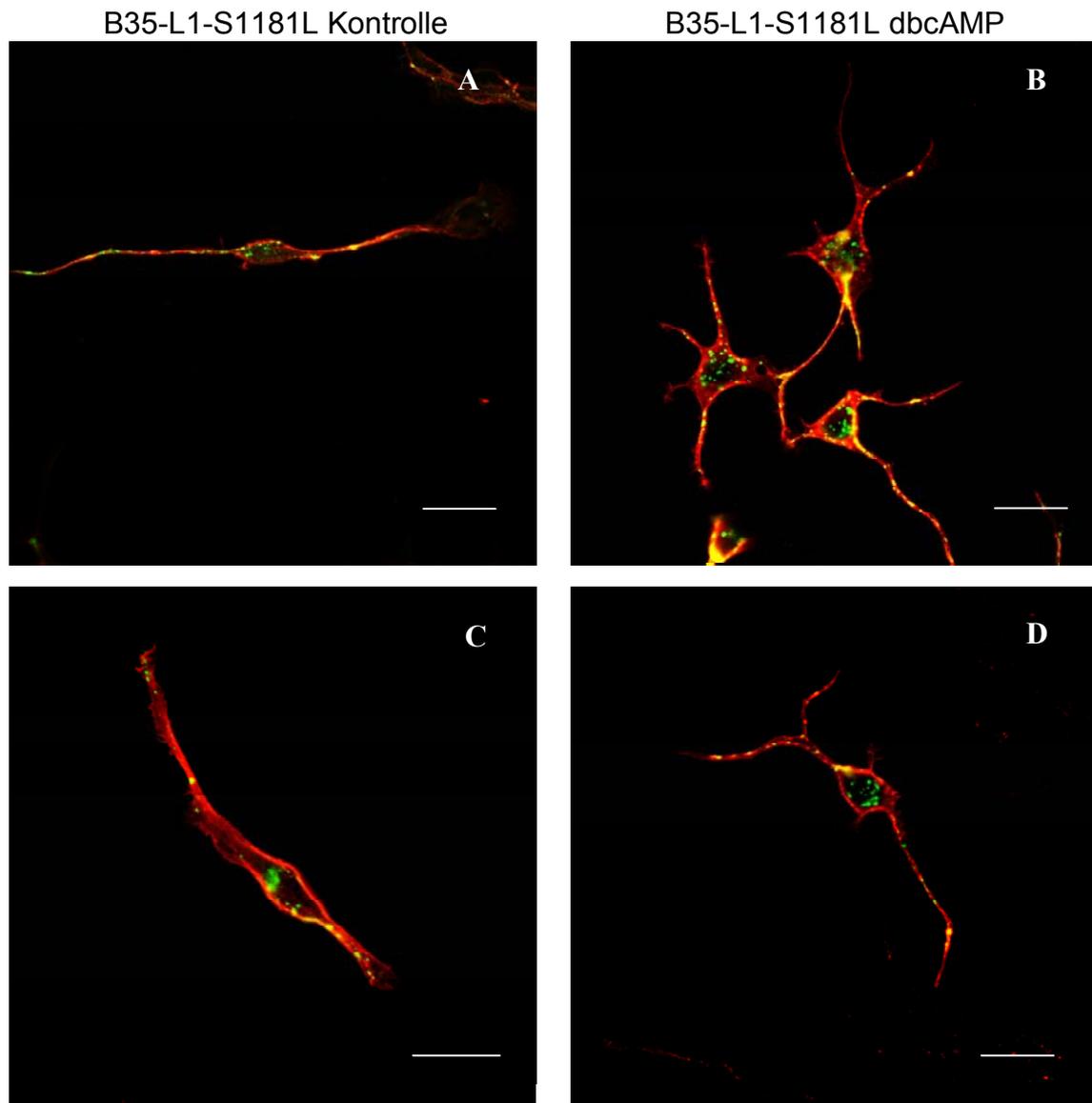
Die cytoplasmatische Domäne von L1 wird direkt im Anschluss an das Endocytosesignal YRSL am Ser-1181 von der Casein Kinase 2 phosphoryliert. Um zu untersuchen, ob diese Phosphorylierung einen Einfluss auf die Endocytose von L1 hat, wurde die Endocytose von L1-wt und L1-S1181L in transfizierten B35-Zellen miteinander verglichen. Die Zellen wurden nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP und zur Kontrolle im nicht ausdifferenzierten Zustand untersucht. Zur Induktion der Endocytose wurden die Zellen zunächst mit einem monoklonalen L1 Antikörper (UJ 127.11, Elbing et al., 1996) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zum Abstoppen der Endocytose sofort auf Eis gestellt und mit 8% Paraformaldehyd in 200 mM HEPES fixiert. Plasmamembranständiges L1 wurde mittels Immunfluoreszenz nach Inkubation der fixierten Zellen mit Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpern nachgewiesen. Nicht durch Primär- und Sekundär-Antikörper abgesättigtes L1 an der Zelloberfläche wurde durch Inkubation der Zellen mit Rabbit- $\alpha$ -Maus-IgG blockiert. Nach erneuter Fixierung und darauffolgender Permeabilisierung der Zellen mit 0,05% Triton X-100 in 3% BSA/PBS wurde an Primär-Antikörper gebundenes endocytosiertes L1 mit DTAF gekoppelten sekundären Antikörpern durch Immunfluoreszenz detektiert. Die Auswertung der Zellen erfolgte mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie (siehe Abb. 24 und 25).



**Abb. 24: Nachweis der Endocytose von humanem L1 in L1-wt exprimierenden B35-Zellen vor und nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.**

B35-Neuroblastomzellen, die stabil mit der cDNA von L1-wt und L1-S1181L transfiziert worden waren, wurden auf mit 0,01 % poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach 24 Stunden mit dbcAMP ausdifferenziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen zur Induktion der Endocytose mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  L1-Antikörper (hL1 UJ127.11) inkubiert. Nach Abstoppen der Endocytose und Fixierung der Zellen erfolgte der Nachweis von Zelloberflächen-exprimiertem L1 mit Cy3 gekoppelten sekundären Antikörpern ( $\alpha$ -Maus-Cy3, rot) und von endocytosiertem L1 durch DTAF gekoppelte sekundäre Antikörper ( $\alpha$ -Maus-DTAF, grün).

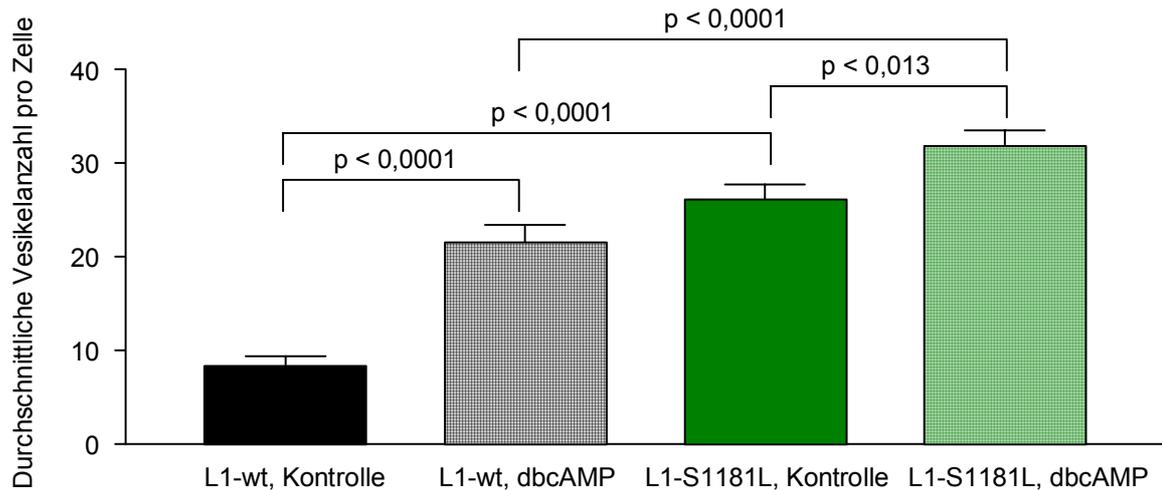
A), C) L1-wt exprimierende Zellen ohne und B), D) mit dbcAMP-Behandlung; der Balken entspricht 25  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 25: Nachweis der Endocytose von humanem L1 in L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen vor und nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP.**

B35-Neuroblastomzellen, die stabil mit der cDNA von L1-wt und L1-S1181L transfiziert worden waren, wurden auf mit 0,01 % poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach 24 Stunden mit dbcAMP ausdifferenziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen zur Induktion der Endocytose mit 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  L1-Antikörper (hL1 UJ127.11) inkubiert. Nach Abstoppen der Endocytose und Fixierung der Zellen erfolgte der Nachweis von Zelloberflächen-exprimiertem L1-S1181L mit Cy3 gekoppelten sekundären Antikörpern ( $\alpha$ -Maus-Cy3, rot) und von endocytosiertem L1-S1181L durch DTAF gekoppelte sekundäre Antikörper ( $\alpha$ -Maus-DTAF, grün).

A), C) L1-S1181L exprimierende Zellen ohne und B), D) mit dbcAMP-Behandlung; der Balken entspricht 25  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 26: Statistische Auswertung der durchschnittlich endocytosierten Vesikel in nicht ausdifferenzierten (Kontrolle) und ausdifferenzierten (dbcAMP) L1-wt und L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen.**

Insgesamt wurden die endocytosierten Vesikel in jeweils 50 Zellen pro Behandlung und B35-Transfektante von drei unabhängigen Versuchen gezählt und durch die Anwendung der einfaktoriellen ANOVA und des post hoc Tests statistisch ausgewertet. In der Abb. ist der Mittelwert der Vesikelanzahl pro Zelle  $\pm$  SEM angegeben.

Sowohl bei den L1-wt, als auch bei den L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen konnte ohne und mit Ausdifferenzierung endocytosiertes L1 in Vesikeln (grün) innerhalb der Zellkörper und entlang der ausgebildeten Neuriten detektiert werden. Zur Auswertung des Versuches wurden in drei unabhängigen Experimenten die endocytosierten Vesikel von insgesamt 50 Zellen pro Behandlung gezählt. Anschließend erfolgte die statistische Analyse der Ergebnisse durch die Anwendung der einfaktoriellen ANOVA und einen post-hoc Test (siehe Abb. 26). Nicht ausdifferenzierte B35-L1-wt Zellen zeigten mit durchschnittlich etwa neun Vesikeln pro ausgezählter Zelle die geringste Endocytose von L1. Im Vergleich dazu wurde die in B35-Zellen exprimierte Mutante L1-S1181L mit durchschnittlich etwa 26 Vesikeln pro Zelle fast dreimal so stark endocytosiert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung des Ser-1181 der cytoplasmatischen Domäne von L1 bei Regulation der Endocytose von L1 eine wichtige Rolle spielt. Die Ausdifferenzierung der B35-L1-wt Zellen und der B35-L1-S1181L Zellen in einen neuronalen Zelltyp führte in beiden Transfektanten zu einer signifikanten Zunahme der durchschnittlich endocytosierten L1-haltigen Vesikel. Die Endocytose von L1-wt wurde mit durchschnittlich 21 Vesikeln pro Zelle im

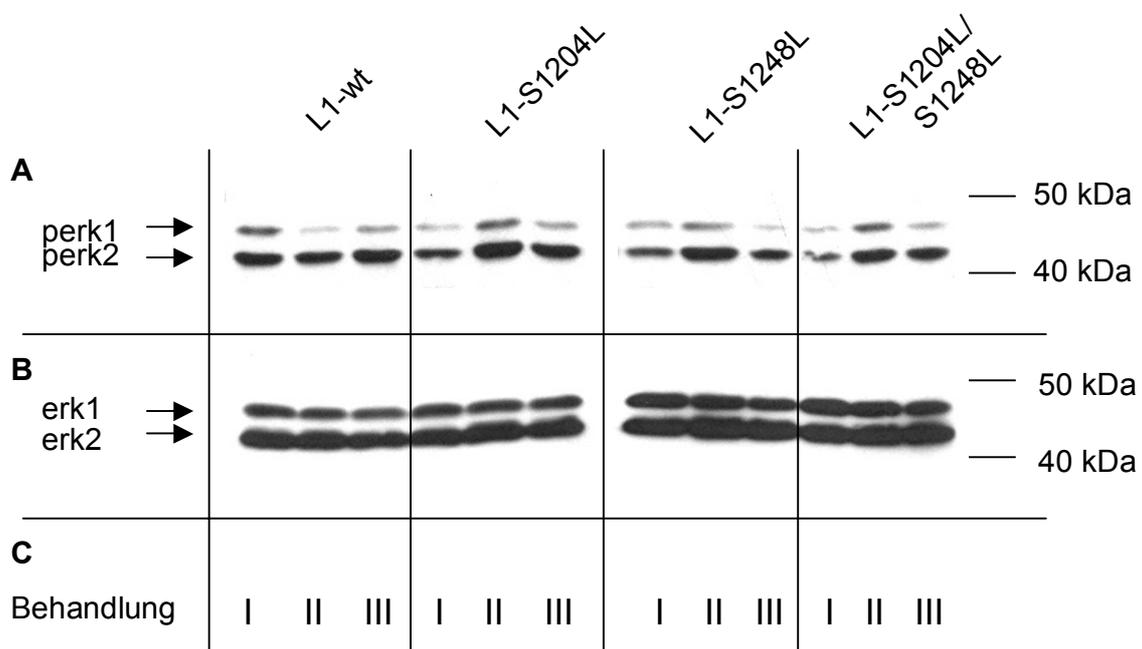
Vergleich zu nicht ausdifferenzierten B35-L1-wt Zellen mit durchschnittlich neun Vesikeln pro Zelle mehr als verdoppelt. Auch bei L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen konnte eine signifikante Zunahme der endocytosierten L1-haltigen Vesikel nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP nachgewiesen werden. Der Anstieg von durchschnittlich etwa 26 auf etwa 32 endocytosierte Vesikel pro Zelle war im Vergleich zu B35-L1-wt exprimierenden Zellen geringer. Allerdings wurde L1-S1181L mit 32 Vesikeln pro Zelle nach der Ausdifferenzierung dennoch signifikant stärker als L1-wt mit durchschnittlich 21 Vesikeln endocytosiert.

#### **4.1.10 Untersuchung von erk1/2 und p-erk1/2 in L1-wt und den L1-erk2-Mutanten exprimierenden B35-Zellen**

Da die MAP-Kinasen erk1 und erk2 in L1-stimulierten Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle spielen, sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von erk1 und erk2 in L1-S1204L, L1-S1248L und L1-S1204L/S1248L exprimierenden B35-Zellen im Vergleich zu B35-L1-wt Zellen verändert ist. Hierzu wurden sowohl undifferenzierte als auch durch dbcAMP ausdifferenzierte Zellen lysiert und im Western Blot phosphoryliertes und damit aktiviertes erk1 und erk2 durch einen spezifischen Antikörper, der nur die phosphorylierte Form von erk1/2 erkennt, und POD gekoppelte sekundäre Antikörper nachgewiesen. Parallel dazu wurden dieselben Proben in einem zweiten Gel aufgetrennt und die gesamte Menge an erk1 und erk2 in einem Western Blot durch Antikörper, die gegen den Proteinteil von erk1 und erk2 gerichtet sind und POD gekoppelte sekundäre Antikörper mittels Chemilumineszenz nachgewiesen.

Bei allen untersuchten Transfektanten konnte mit und ohne Ausdifferenzierung der Zellen aktiviertes p-erk1 und p-erk2 nachgewiesen werden, zudem war die Gesamtmenge an erk1 und erk2 in allen untersuchten Klonen ähnlich. Für die statistische Auswertung wurden sowohl die Signale von p-erk1/2 spezifischen als auch die erk1/2 Protein-spezifischen Banden aus vier unabhängigen

Experimenten densitometrisch ausgewertet, d.h. jeweils auch die gleiche Proteinmenge normiert und mit den Banden der L1-wt exprimierenden Zellen verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Aktivierung von erk1/2 zwischen den L1-S1204L, L1-S1248L und L1-S1204L/S1248L im Vergleich zu L1-wt exprimierenden Zellen festgestellt werden. Die Mutation der durch erk2 phosphorylierbaren Serine (Ser-1204, Ser-1248) zu der nicht mehr phosphorylierbaren Aminosäure Leucin in der cytoplasmatischen Domäne von L1 scheint die Aktivierung der Kinasen erk1/2 des MAPK-Signalweges nicht zu beeinflussen.



**Abb. 27: Western Blots zum Nachweis von aktiviertem erk1/2 (perk1/2) und der Expression von erk1/2 in Homogenaten von L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L und L1-wt exprimierenden B35-Zellen.**

Es wurden jeweils  $10^6$  Zellen der verschiedenen B35-Transfektanten auf mit 0,01% PLL beschichteten 60er Schalen ausgesät und nach 24 Stunden mit 1 mM dbcAMP in X1-Medium ausdifferenziert (C, III) oder zur Kontrolle nur in X1-Medium (C, II) bzw. in normalem Kulturmedium (C, I) kultiviert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in Homogenisierungspuffer lysiert und anschließend die Proteine nach Auftrennung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. P-erk1/2 wurde durch den Antikörper Phospho-p44/p42 MAPK nachgewiesen (A). Außerdem wurde die gesamte Menge an erk1/2 durch spezifische erk1 und erk2 Antikörper detektiert (B).

## **5. Diskussion**

### **5.1 Bedingungen des basalen und stimulierten Neuritenwachstums**

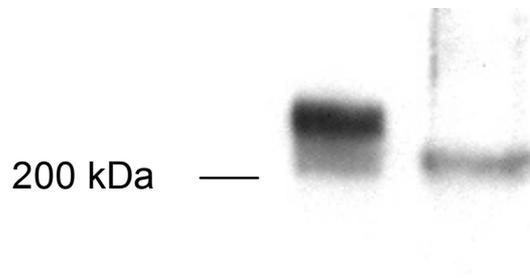
Viele Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass trans-Interaktionen zwischen Zelladhäsionsmolekülen mit einem gesteigerten Neuritenwachstum einhergehen (Doherty und Walsh, 1994). Das Neuritenwachstum von Zellen, deren an der Membranoberfläche exprimierte Zelladhäsionsmoleküle trans-Interaktionen mit der Umgebung oder mit Zelladhäsionsmolekülen anderer Zellen ausüben können, bezeichnet man als stimuliertes Neuritenwachstum. Hierbei ist zudem zu berücksichtigen, welche Interaktionen von den Zelladhäsionsmolekülen der Zellen mit der Umgebung eingegangen werden können, da je nach Interaktionspartner wahrscheinlich verschiedene intrazelluläre Signalwege aktiviert werden können, die unterschiedliche Auswirkungen auf das Wachstum und die Struktur der Neuriten haben können. Burden-Gulley et al. (1995) konnten zeigen, dass sich die Morphologie der Wachstumskegel von RGC (chick retinal ganglion cells), die zunächst auf Laminin auswachsen, nach dem Kontakt mit einem L1-Substrat deutlich verändert. Ähnliche Effekte wurden auch an DRG Neuronen der Hinterwurzelganglien (dorsal root ganglion) gezeigt (Burden-Gulley et al., 1997).

Viele Studien untersuchten die Bedeutung von L1-L1-trans-Interaktionen für die Funktion von L1 nach Kultivierung von Zellen auf einem L1-Substrat oder durch Inkubation der Zellen mit L1-Antikörpern, wobei angenommen wird, dass die Bindung des Antikörpers an L1 ähnliche Auswirkungen hat wie die L1-L1-Interaktion (Kamiguchi und Lemmon, 2000; Schmid et al., 2000; Kamiguchi und Yoshihara, 2001; Long et al., 2001). Hingegen gibt es wenige Untersuchungen, die sich mit dem basalen, d. h. zellautonomen Neuritenwachstum beschäftigen. Das basale Neuritenwachstum unterscheidet sich vom stimulierten Neuritenwachstum insofern, dass keine trans-Interaktionen der Zellen mit der Extrazellulärmatrix oder anderen Zellen stattfinden und damit das Neuritenwachstum nicht durch Signale von außerhalb der Zelle stimuliert werden

kann. Beim basalen Neuritenwachstum können die von den Zellen exprimierten Zelladhäsionsmoleküle nur homophile oder heterophile cis-Interaktionen innerhalb der Zellmembran einer Zelle ausüben. Während der Entwicklung des Nervensystems findet man das basale Neuritenwachstum bei sogenannten Pionieraxonen, wenn diese über Areale ohne wachstumsfördernde Proteine der Extrazellulärmatrix oder Adhäsionsmoleküle wachsen müssen. Die Untersuchung des basalen Neuritenwachstums kann durch die Kultivierung der Zellen auf dem inerten Substrat PLL durchgeführt werden, und ermöglicht so die genaue Analyse der „intrinsischen“ Mechanismen, die dem Neuritenwachstum von Nervenzellen in Abwesenheit von einer externen Stimulierung zu Grunde liegen. Heiland et al. (1998) konnten zeigen, dass ein vermindertes basales Neuritenwachstum mit einer generellen Reduktion der Phosphorylierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 einhergeht, wie durch  $^{32}\text{P}$ -Phosphateinbau-Studien nachgewiesen wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun durch den gezielten Austausch von nachweislich phosphorylierbaren Serinen der cytoplasmatischen Domäne von L1 gegen nicht phosphorylierbare Aminosäuren die Funktion der Serin-Phosphorylierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 für das basale Neuritenwachstum untersucht.

Wie in 1.2.6 beschrieben, kann die extrazelluläre Domäne von L1 durch proteolytische Spaltungen ins Medium sezerniert werden. Das bedeutet, dass dieses lösliche L1-Fragment durch trans-Interaktionen in anderen Zellen L1-stimuliertes Neuritenwachstum auslösen könnte. Um einschätzen zu können, ob dieser Mechanismus wesentlich zum Neuritenwachstum der B35-Neuroblastomzellen unter den in dieser Arbeit angewendeten Kulturbedingungen beiträgt, wurde untersucht, ob und in welchem Umfang diese Zellen L1 sekretieren. Es zeigte sich, dass L1-200 im Medium detektiert werden kann (siehe Abb. 28). Obwohl daher mögliche Interaktionen des löslichen L1 mit L1 an der Zelloberfläche von B35-Zellen nicht ausgeschlossen werden können, wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem untersuchten Neuritenwachstum dennoch um basales Neuritenwachstum handelt. Ein möglicher Einfluss von sezerniertem L1 auf das Neuritenwachstum wurde als sehr gering eingeschätzt, da für die Untersuchungen der Neuritenlängen jeweils die Zelldichte sehr niedrig gehalten wurde, so dass vermutlich nur sehr wenig L1-200 sezerniert werden konnte. Der

Nachweis der L1-Sekretion hingegen wurde mit zu 80% konfluenten Zellen durchgeführt.



**Abb. 28: Western Blot zum Nachweis von L1 im Homogenat und Zellkulturüberstand mit dem Antikörper Neuro4.**

Zu 80% konfluente B35-L1-wt Zellen wurden 24 Stunden in DMEM-H ohne FCS kultiviert und anschließend lysiert, gleichzeitig wurden die Proteine aus dem Überstand durch Aceton gefällt. Der Nachweis von L1 im Homogenat und Überstand erfolgte im Western Blot durch den Antikörper Neuro4 und POD gekoppelte sekundäre Antikörper.

## 5.2 Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L1

L1 enthält in seiner cytoplasmatischen Domäne 16 Serin-, 3 Threonin- und 4 Tyrosinreste (siehe auch Abb. 7). Es wurde gezeigt, dass L1 außer an Serin auch an Tyrosin phosphoryliert wird, während Threoninreste nicht phosphoryliert werden (Faissner et al., 1985; Sadoul et al., 1989; Heiland et al., 1996). Aufgrund der Untersuchungen von Wong et al. (1996 a, b) und Schäfer et al. (1999) kann davon ausgegangen werden, dass wahrscheinlich nur vier Serine phosphoryliert werden (Ser-1152, Ser-1181, Ser-1204, Ser-1248, siehe Abb. 5). Die Störung der L1-NCAM-Interaktion durch oligomannosidische Glykopeptide bewirkt eine Reduktion des basalen Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen und war gleichzeitig mit einer verminderten Phosphorylierung von L1 verbunden (Heiland et al., 1998). Die Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung von L1 scheint daher für das basale Neuritenwachstum eine wichtige Rolle zu spielen.

Für die Untersuchung der Bedeutung der Serin-Phosphorylierung von L1 wurden die cDNA-Mutanten L1-S1152L, L1-S1181L, L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L hergestellt. Nach der stabilen Transfektion von B35-Neuroblastomzellen mit der cDNA von L1-wt und den verschiedenen L1-Mutanten konnten im Western Blot zwei für L1 charakteristische Banden von etwa 210 und 220 kDa detektiert werden. Die Markierung der Zelloberflächenproteine mit Biotin ergab, dass außer für die L1-Mutante L1-S1204L/S1248L, bei der beide Banden mit Biotin markiert wurden, jeweils nur die 220 kDa Bande von L1 als Zelloberflächenmembran-assoziiert nachgewiesen werden konnte.

Die Phosphorylierung von L1-wt und den verschiedenen L1-Mutanten wurde durch die Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat in den stabil transfizierten B35-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei L1-wt, L1-S1152L, L1-S1181L, L1-S1204L, L1-S1248L jeweils die 220 kDa Bande und nicht die 210 kDa Bande phosphoryliert vorliegt, während auch die 210 kDa Bande der Mutante L1-S1204L/S1248L phosphoryliert wird, wenn auch zu einem insgesamt geringeren Anteil. Die 220 kDa Bande wurde schon von Zisch et al. (1997) der komplex glykosylierten L1-Form zugeordnet. Da diese Autoren nur die 220 kDa Bande auch als phosphoryliert nachweisen konnten, postulierten sie, dass die Phosphorylierung möglicherweise erst nach dem Transport an die Zelloberfläche stattfindet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellhomogenate der verschiedenen B35-Transfektanten mit Endoglykosidase H zum Abbau der 210 kDa Bande zu einer Bande von etwa 155 kDa führte, während die 220 kDa Bande nahezu unverändert blieb. Da die 155 kDa Bande etwa dem Molekulargewicht von deglykosyliertem L1 entspricht (Lindner et al., 1983), scheint die 210 kDa Bande eine L1-Form zu sein, die vorwiegend intrazellulärem L1 zugeordnet werden kann. Die 210 kDa Form trägt also oligomannosidische Kohlenhydrate, die durch Endoglykosidase H gespalten werden und die überwiegend im ER vorkommen, während die 220 kDa Form komplexe Kohlenhydrate trägt, die durch Endoglykosidase H nicht gespalten werden können. Aus unbekanntem Gründen wird aber wohl auch die 210 kDa Bande von L1-S1204L/S1248L, wenn auch zu einem insgesamt geringen Teil, ohne

Prozessierung der N-Glykane im Golgi-Apparat zu komplexen Kohlenhydraten an die Zelloberflächenmembran transportiert, wie die Analyse der Zelloberflächenbiotinylierung ergeben hatte, wo sie dann auch phosphoryliert wird. Da die 210 kDa Bande von B35-L1-S1204L/S1248L-Zellen im Vergleich zu allen anderen untersuchten L1-Mutanten sehr stark exprimiert wird, ist die Glykosylierungsmaschinerie im Golgi-Apparat möglicherweise überlastet, so dass ein kleiner Teil von L1 in oligomannosidischer Form die Zelloberflächenmembran erreicht, dort integriert und phosphoryliert wird.

Obwohl bei den hergestellten Mutanten verschiedene phosphorylierbare Serine gegen die nicht mehr phosphorylierbare Aminosäure Leucin ausgetauscht wurden und damit eine geringere Phosphorylierung bei den L1-Mutanten im Vergleich zu L1-wt erwartet wurde, konnten bei den Mutanten durch die Markierung mit  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat keine signifikanten Unterschiede im Phosphorylierungsgrad im Vergleich zu L1-wt festgestellt werden. Anscheinend hat die Serin-Phosphorylierung unter den für diesen Versuch gewählten Zellkulturbedingungen keine große Bedeutung für den gesamten Phosphorylierungsgrad von L1, so dass der Verlust eines phosphorylierbaren Serins keinen detektierbaren Einfluss zeigt. In einigen Experimenten war ein Trend für eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades von L1 erkennbar, der allerdings nach der densitometrischen Auswertung von drei Experimenten statistisch nicht signifikant war. Insbesondere bei L1-S1204L wurde in allen drei Experimenten die Tendenz für eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades detektiert. Dieser Trend war für L1-S1248L und die anderen Mutanten schwächer, so dass die Phosphorylierung von Ser-1204 unter den gewählten Bedingungen vielleicht eine stärkere Rolle für den Phosphorylierungsgrad von L1 spielt. Möglicherweise könnte die Erhöhung der Anzahl an Experimenten diese Tendenz statistisch bestätigen. Eine andere Möglichkeit wäre, die Veränderungen der Serin-Phosphorylierung nach Hydrolyse des Proteins und der 2D-Auftrennung der Phosphoaminosäuren zu analysieren.

In den von Heiland et al. (1998) durchgeführten Experimenten ging die Reduktion der Phosphorylierung von L1 mit einem verminderten basalen Neuritenwachstum einher. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Austausch der durch erk2 phosphorylierbaren Aminosäuren Ser-1204 und/oder Ser-1248 in die

nicht phosphorylierbare Aminosäure Leucin im Vergleich zu L1-wt zu einer signifikanten Reduktion des basalen Neuritenwachstums von ausdifferenzierten, stabil transfizierten B35-Zellen führte. Interessantweise war das basale Neuritenwachstum in B35-L1-S1204L Zellen im Vergleich zu B35-L1-S1248L Zellen signifikant stärker vermindert, so dass die Phosphorylierung von Ser-1204 möglicherweise eine größere Bedeutung für die Regulation des basalen Neuritenwachstums hat, die ja auch, wie oben diskutiert wurde, einen stärkeren Einfluss auf den gesamten Phosphorylierungsgrad von L1 haben könnte.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Ser-1152 und Ser-1181 der cytoplasmatischen Domäne von L1 gegen Leucin nach Expression der L1-Mutanten in B35-Zellen im Vergleich zu L1-wt zu einer signifikanten Zunahme der Neuritenlänge führt. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der Phosphorylierung von L1 und das damit verbundene verminderte basale Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen in den Untersuchungen von Heiland et al. (1998) möglicherweise weniger durch eine veränderte Phosphorylierung von Ser-1152 und Ser-1181 bedingt sind. Wahrscheinlich haben diese beiden Phosphorylierungsstellen unter den gewählten Bedingungen nur einen geringen Einfluss auf den gesamten Phosphorylierungsgrad von L1, wie der ähnliche Phosphorylierungsgrad von L1-S1181L im Vergleich zu L1-wt zeigt. Die stabile Transfektion der cDNA von L1-S1152L war während der Durchführung der Phosphorylierungs-Experimente noch nicht abgeschlossen und da aufgrund der erhaltenen Ergebnisse auch bei dieser Mutante keine signifikanten Unterschiede erwartet wurden, wurde der Phosphorylierungsgrad dieser L1-Mutante nicht untersucht. Vor dem Hintergrund der Arbeit von Heiland et al. (1998) lassen sich diese Ergebnisse insgesamt dahingehend interpretieren, dass die Aktivierung des MAPK-Signalweges nicht nur für das stimulierte sondern auch für das zellautonome Neuritenwachstum eine Rolle zu spielen scheint. Im Einklang damit haben andere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe gezeigt, dass auch eine Mutation in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM einen MAP-Kinase abhängigen Einfluss auf das zellautonome, basale Neuritenwachstum ausübt.

Auch wenn die Untersuchungen von Wong et al. (1996 a, b) darauf hindeuten, dass nur vier Serine phosphoryliert werden, ist bislang noch nicht bekannt, ob

noch weitere Serinreste der cytoplasmatischen Domäne von L1 phosphoryliert werden können. Die Bedeutung von anderen Serinresten für die Funktion von L1 lässt sich daraus ableiten, dass die Mutationen von Ser-1194 und Ser-1224 in die Aminosäure Leucin beim Menschen zu neurologischen Störungen führen (Fransen et al., 1994). Während die genaue Funktion von Ser-1194 für die Funktion von L1 noch nicht bekannt ist, konnte für die Mutation S1224L eine reduzierte Bindung von Ankyrin<sub>G</sub> nachgewiesen werden, so dass die Phosphorylierung von Ser-1224 (neben der Phosphorylierung von Tyr-1229, siehe Abb. 5) für die Regulation der Ankyrinbindung von Bedeutung zu sein scheint (Needham et al., 2001).

Es wäre interessant, den Phosphorylierungsgrad von L1-wt und den verschiedenen L1-Mutanten nach Inkubation mit L1-Antikörpern, d. h. unter Bedingungen des L1-stimulierten Neuritenwachstums, zu untersuchen. Die dadurch ausgelösten Signalkaskaden könnten möglicherweise stärkere Unterschiede in der Serin-Phosphorylierung und damit des gesamten Phosphorylierungsgrades der Mutanten im Vergleich zu L1-wt hervorrufen.

#### **5.4 Bedeutung der Ser-1152 Phosphorylierung durch die Kinase p90<sup>rsk</sup> für die Funktion von L1**

Dahlin-Huppe et al. (1997) hatten gezeigt, dass die ersten sieben Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne von L1 für die Interaktion von L1 mit Aktin-Filamenten essentiell sind. Die Kinase p90<sup>rsk</sup> phosphoryliert L1 direkt hinter der für L1 lokalisierten Aktin-Bindestelle an Ser-1152 und ist so möglicherweise an der Regulation der Interaktion von L1 mit dem Cytoskelett beteiligt. Interessanterweise ist dieses Serin in den zu L1 homologen Molekülen NrCAM (Grumet et al., 1991) und Neurofascin (Rathjen et al., 1987) durch ein Prolin ersetzt. Somit scheint die Phosphorylierung des Ser-1152 insbesondere für die Funktion von L1 eine Bedeutung zu haben. Wong et al. (1996) konnten zeigen, dass die Phosphorylierung des Ser-1152 eine wichtige Rolle für das L1-stimulierte Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglien des Huhns spielt. In dieser Studie

wurde das Neuritenwachstum von Neuronen der Hinterwurzelganglien des Huhns auf Laminin und einem L1-Substrat nach dem Transfer bestimmter Peptide in die Zelle durch Elektroporation untersucht. In Gegenwart eines Peptids, welches die Sequenz der ersten 15 Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne von L1 umfasste, war das L1 stimulierte Neuritenwachstum der Hinterwurzelganglien des Huhns signifikant reduziert, während auf Laminin kultivierte Zellen unverändertes Neuritenwachstum aufwiesen. Dieser Effekt wird darauf zurückgeführt, dass das von den Nervenzellen aufgenommene Peptid die Phosphorylierung des Ser-1152 kompetitiv hemmt. Peptide bei denen Ser-1152 gegen Alanin ausgetauscht wurde, zeigten keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum (Wong et al., 1996). Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Austausch des Ser-1152 der cytoplasmatischen Domäne von L1 in die nicht mehr phosphorylierbare Aminosäure Leucin bei undifferenzierten B35-L1-S1152L Zellen im Vergleich zu L1-wt exprimierenden Zellen mit einem signifikanten Anstieg des basalen Neuritenwachstums verbunden ist. Nach der Ausdifferenzierung wurde dieser Unterschied nicht mehr festgestellt, vielmehr war die durchschnittliche Neuritenlänge nahezu identisch. Diese Beobachtungen scheinen im Widerspruch zu denen von Wong et al. (1996) beschriebenen Ergebnissen zu stehen und sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Phosphorylierung des Ser-1152 bei L1 stimuliertem Neuritenwachstum eine andere Funktion hat als bei basalem Neuritenwachstum. Möglicherweise interagieren die bei Wong et al. (1996) eingesetzten Peptide aber auch noch mit anderen Proteinen, so dass die Reduktion des Neuritenwachstums nicht alleine auf die Inhibition der Phosphorylierung des Ser-1152 zurückgeführt werden kann. Da insbesondere die ersten sieben Aminosäuren für die Interaktion von L1 mit dem Aktin-Cytoskelett von Bedeutung sind und zudem Aktin wahrscheinlich durch einen indirekten Mechanismus mit L1 interagiert, kämen hierfür noch unbekannte Linker-Proteine in Frage (Dahlin-Huppe et al., 1997). In dieser Arbeit wurde speziell die Bedeutung der Phosphorylierung des Ser-1152 von L1 für das basale Neuritenwachstum untersucht. In zukünftigen Experimenten sollte auch das L1 stimulierte Neuritenwachstum von transfizierten B35-L1-S1152L Zellen mit L1-wt exprimierenden B35-Zellen zu verglichen werden.

Da die Phosphorylierung des Ser-1152 von L1 möglicherweise die Bindung von Aktin an L1 beeinflusst, erschien es vielversprechend, die Co-Lokalisation von L1 und Aktin in den beiden B35-Transfektanten zu untersuchen. Hierzu wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen an permeabilisierten L1-wt und L1-S1152L exprimierenden Zellen durchgeführt. L1 wurde durch den Antikörper Neuro4 und DTAF-gekoppelte sekundäre Antikörper und Aktin durch Phalloidin-TRITC nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Da die Struktur von Aktin sehr empfindlich ist, wurden alle Inkubationsschritte in einem Aktin-stabilisierenden Puffer durchgeführt. Die Untersuchung der Zellen, insbesondere der Wachstumskegel, erfolgte mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie. Auffallende Unterschiede ließen sich nicht beobachten. Außerdem stellte sich die Detektion von Aktinstrukturen auch als schwierig heraus, so dass aus in diesen ersten als vorläufig zu betrachtenden Experimenten keine Schlüsse über einen Einfluss der Phosphorylierung des Ser-1152 auf die Bindung von Aktin an L1 gezogen werden können. Prinzipiell scheint der Nachweis einer Co-Lokalisation in den etwa 3 µm großen Wachstumskegeln der B35-Zellen durch die Technik der konfokalen Mikroskopie möglich zu sein. Allerdings setzt das korrekte Scannen von Strukturen in dieser Größenordnung umfangreiche Erfahrungen im Umgang mit dem konfokalen Mikroskop voraus, um unter anderem keine falsch-positiven Signale zu detektieren. Auch hätten die Bedingungen für diese Immunfluoreszenztechnik in langwierigen Untersuchungen optimiert werden müssen, was den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

## **5.5 Bedeutung der Ser-1181 Phosphorylierung durch Casein Kinase 2 für die Funktion von L1**

Durch die ubiquitär vorkommende Casein Kinase 2 werden zahlreiche Proteine phosphoryliert, so dass sie im Organismus vielfältige Funktionen zu erfüllen scheint. Da die Casein Kinase 2 besonders stark im sich entwickelnden Gehirn gefunden wird, spielt sie vermutlich generell eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Nervensystems (Girault et al., 1990). Ulloa et al. (1993) konnten

zeigen, dass die Inhibierung der Casein Kinase 2 durch Antisense Oligodeoxyribonucleotide die Neuritogenese von Neuroblastomzellen verhinderte. Die Casein Kinase 2 scheint somit für die Reifung von Neuronen eine besondere Bedeutung zu haben. Die genaue Funktion der Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L1 am Ser-1181 durch die Casein Kinase 2 ist bis heute noch nicht genau bekannt. Ser-1181 befindet sich direkt hinter dem Endocytosesignal YRSL, welches durch die Insertion der RSLE-Sequenz aufgrund eines alternativen Spleißmechanismus nur in neuronalem L1 vorkommt. Über das Endocytosesignal interagiert L1 mit der  $\mu$ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes, wenn das Tyr-1176 dieser Sequenz nicht phosphoryliert vorliegt, wodurch die Clathrin abhängige Endocytose von L1 initiiert wird (Kamiguchi et al., 1998). Eine mögliche Bedeutung des Ser-1181 für die Endocytose von L1 wird schon länger diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch L1-Antikörper stimulierte Endocytose von L1-S1181L sowohl in ausdifferenzierten als auch in nicht-differenzierten B35-Zellen im Vergleich zu B35-L1-wt Zellen signifikant erhöht ist. Das bedeutet, dass die Phosphorylierung des Ser-1181 die Endocytose von L1 beeinflusst. Untersuchungen der Bindung der  $\mu$ 2-Untereinheit an Peptide, die Ser-1181 entweder in phosphorylierter oder nicht-phosphorylierter Form enthalten, scheinen nicht zu bestätigen, dass die Phosphorylierung des Ser-1181 die Bindung der  $\mu$ 2-Untereinheit inhibiert, so dass diese Aminosäure im Gegensatz zum Tyr-1176 der YRSL-Sequenz für die Bindung der  $\mu$ 2-Untereinheit an L1 keine oder nur geringe Bedeutung zugeschrieben wird. Allerdings handelt es sich bei diesen Peptidbindungsanalysen um ein sehr artifizielles System.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die Endocytose von L1, welches am Ser-1181 nicht phosphoryliert werden kann, signifikant zunimmt. Dies ist möglicherweise auf eine Stabilisierung der Interaktion der  $\mu$ 2-Untereinheit an L1 durch eine Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domäne von L1 zu erklären. Möglich ist auch, dass die Zusammenlagerung der anderen Komponenten des AP-2 Komplexes ( $\alpha$ -Adaptin,  $\beta$ 1-Adaptin oder  $\beta$ 2-Adaptin,  $\sigma$ 2-Untereinheit) erleichtert wird, wenn L1 am Ser-1181 nicht phosphoryliert ist, und damit Endocytose in B35-L1-S1181L beschleunigt ablaufen kann. Letztendlich resultiert aus dieser Beobachtung, dass Casein Kinase 2 abhängige Phosphorylierung dieses Serins die

Endocytosegeschwindigkeit von L1 senkt und damit nach dem in Abb. 6 vorgestellten Modell vielleicht speziell das L1-stimulierte Neuritenwachstum hemmt. Hingegen stimuliert die Casein Kinase 2 generell die Neuritogenese, u.a. wahrscheinlich durch die Phosphorylierung von cytoskeletalen Proteinen wie z. B. MAP1B (microtubule-associated protein), d. h. die Initiationsphase der Ausbildung von Neuriten, wie Ulloa et al. (1993) gezeigt hatten.

Während die gesteigerte L1-Endocytose nur für das L1-stimulierte Neuritenwachstum eine Rolle spielt, konnte auch für das basale Neuritenwachstum undifferenzierter B35-L1-S1181L Zellen im Vergleich zu B35-L1-wt Zellen gezeigt werden, dass es signifikant erhöht ist. Kamiguchi und Yoshihara (2001) konnten einen Zusammenhang zwischen Endocytose und dem L1 abhängigen Neuritenwachstum von DRG Neuronen nachweisen. Die Endocytose von auf einem L1-Substrat kultivierten DRG Neuronen war im Vergleich zu DRG Neuronen, die auf N-Cadherin kultiviert wurden, signifikant erhöht. Die Hemmung der Endocytose durch die Inkubation der DRG Neuronen mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Adaptin (AP.6) führte zu einer Reduktion des Neuritenwachstum, wenn die DRG Neuronen auf einem L1-Substrat kultiviert wurden und blieb bei der Kultivierung der DRG Neuronen auf N-Cadherin unverändert (Kamiguchi und Yoshihara, 2001). Die Endocytose scheint somit nur das L1-abhängige Neuritenwachstum zu beeinflussen. Interessant wäre auch hier, das L1-stimulierte Neuritenwachstum der L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen zu untersuchen. Die beobachtete beschleunigte Endocytose dieser Zellen nach Vernetzen von L1 mit Antikörpern lässt vermuten, dass auch das Neuritenwachstum stimuliert ist. In zukünftigen Experimenten sollte überprüft werden, ob eine Inhibition der Endocytose unter den beschriebenen Bedingungen zu einer Verminderung des Neuritenwachstums führt.

*In vitro* und *in vivo* wurde eine direkte Interaktion von L1 mit dem zur ERM-Familie zugehörigen Ezrin nachgewiesen. ERM-Proteine können mit ihrer cytoplasmatischen Domäne direkt an F-Aktin binden und sind damit an der dynamischen Regulation von Wechselwirkungen der Membran mit dem Cytoskelett beteiligt. Der genaue Bindungsmechanismus von Ezrin an L1 ist noch nicht bekannt, allerdings wurde gezeigt, dass die RSLE-Sequenz der

cytoplasmatischen Domäne von L1 für eine Bindung essentiell ist. Es gibt Hinweise, dass Ezrin an ähnlicher Position wie die  $\mu$ 2-Untereinheit des AP-2 Komplexes an L1 bindet, d. h. eventuell sogar mit der  $\mu$ 2-Untereinheit um die Bindungsstelle konkurriert (Dickson et al., 2002). Interessanterweise werden Proteine der ERM-Familie besonders stark während der Differenzierung von Neuronen exprimiert, was auf eine wichtige Funktion bei diesem Prozess schließen lässt (Kunimoto, 1995). Die Bedeutung der Phosphorylierung des Ser-1181 von L1 für die Bindung von Ezrin an L1 wurde bisher noch nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass undifferenzierte L1-S1181L exprimierende B35-Zellen im Vergleich zu B35-L1-wt Zellen signifikant längere Neuriten ausbildeten. Die Mutation führt damit im Prinzip zu einer Ausdifferenzierung der Zellen in einen neuronaleren Typ ohne eine externe Stimulation. Möglicherweise ist die Zunahme der Neuritenlänge in undifferenzierten B35-L1-S1181L Zellen auf eine verstärkte oder reduzierte Interaktion von L1 mit Ezrin und damit einer verstärkten oder reduzierten Interaktion von L1 mit dem Cytoskelett zu erklären. Um diese Hypothese zu bestätigen müssten allerdings Experimente durchgeführt werden, in denen konkret die Bindung von Ezrin an L1 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung des Ser-1181 untersucht werden kann.

## **5.6 Bedeutung der Phosphorylierung von Ser-1204 und Ser-1248 durch erk2 für die Funktion von L1**

Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass verschiedene Zelladhäsionsmoleküle – wie beispielsweise L1, NCAM, N-Cadherin und Laminin-Rezeptoren – bei der Signalweiterleitung von außen ins Innere der Zelle (outside-in signalling) die Aktivierung des MAPK-Signalweges gemeinsam haben (Schmid et al., 1999; Schaefer et al., 1999; Perron et al., 1999; Schmid et al., 2000; Kolkova et al., 2000). Für L1 zeigten Schmid et al. (2000), dass die durch L1-Antikörper ausgelöste Assoziation von L1 an der Zelloberfläche einen Signalweg aktiviert, der über PI3-Kinase und Rac1 schließlich zur Aktivierung des MAPK-

Signalweges führt. Die Aktivierung von erk2 wurde durch Blockierung der Dynamin abhängigen Endocytose von L1 inhibiert und führte zu einer Reduktion des Neuritenwachstums. Neben der beschriebenen Aktivierung von erk2 konnte zudem gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne von L1 *in vitro* an Ser-1204 und Ser-1248 phosphoryliert werden kann (Schaefer et al., 1999; Schmid et al., 2000). Die Bedeutung der Phosphorylierung dieser Serine ist noch nicht genau bekannt. Untersuchungen von Garver et al. (1997) deuten darauf hin, dass die Phosphorylierung des Ser-1204 an der Regulation der Wechselwirkung von L1 mit dem Cytoskelett beteiligt ist. Als Bindungsstelle für Ankyrin wurde die in allen Spezies hochkonservierte Aminosäuresequenz FIGQY identifiziert. Durch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes wird die Ankyrinbindung gehemmt, was bedeutet, dass die Assoziation von L1 und Ankyrin vorwiegend durch die Phosphorylierung dieses Tyrosins reguliert wird (Garver et al., 1997). Da die Bindung von Ankyrin an eine Mutante von Neurofascin, bei der ein Bereich von 26 Aminosäuren deletiert worden war, der analog zu L1 neben Tyr-1229 auch die Aminosäure Ser-1204 enthielt, komplett verhindert wurde, ist es wahrscheinlich, dass auch die Phosphorylierung des Ser-1204 an der Regulation der Bindung von Ankyrin an L1 beteiligt ist.

Auf die Phosphorylierungsstelle Ser-1248 folgt interessanterweise direkt die Aminosäure Prolin, wodurch ein minimales Konsensus-Motiv, S(PXXP), einer SH3 Bindedomäne gebildet wird (Ren et al., 1993). Obwohl von L1 bis jetzt keine Interaktionen mit SH3 bindenden Proteinen bekannt sind, könnte die Phosphorylierung des Ser-1248 durch erk2 die Assoziation dieser möglichen Bindungspartner mit L1 regulieren (Corbalan-Garcia et al., 1996).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das basale Neuritenwachstum von B35-Zellen, die L1-S1204L, L1-S1248L oder L1-S1204L/S1248L stabil exprimieren, im Vergleich zu B35-L1-wt Zellen signifikant reduziert ist. Dabei zeigten B35-L1-S1204L und B35-L1-S1204L/S1248L Zellen eine ähnliche Verminderung der Neuritenlänge, die zudem deutlich stärker ausgeprägt war als die von B35-L1-S1248L Zellen, so dass die Phosphorylierung des Ser-1204 eine entscheidendere Rolle für die Regulation des basalen Neuritenwachstums zu spielen scheint.

In Untersuchungen von Gil et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Bindung von Ankyrin an die cytoplasmatische Domäne von L1 zu einer Stimulierung des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen, die auf NgCAM kultiviert wurden, führt. Diese Zunahme konnte bei auf Laminin kultivierten Kleinhirnneuronen nicht beobachtet werden, so dass die Bindung von Ankyrin an L1 nur für das L1 stimulierte Neuritenwachstum eine Rolle zu spielen scheint. Möglicherweise wirkt die Bindung von Ankyrin an L1 aber auch auf das basale Neuritenwachstum hemmend, so dass die in dieser Arbeit festgestellte Reduktion des basalen Neuritenwachstums von B35-L1-S1204L Zellen durch eine Stabilisierung der Ankyrinbindung an L1 erklärt werden könnte. Eine veränderte Ankyrinbindung könnte zudem Assoziationen mit weiteren cytoskeletalen Proteinen wie Fodrin und Tubulin beeinflussen, so dass möglicherweise eine Änderung der für den axonalen Transport notwendigen Mikrotubuli-Organisation aufgrund veränderter L1-Ankyrin-Tubulin Wechselwirkungen das reduzierte Neuritenwachstum verursachen. Diese Hypothese steht im Einklang mit der generellen Vorstellung, dass die Destabilisierung von Cytoskelett-Interaktionen Neuritenwachstum fördert, während die Stabilisierung solcher Interaktionen sich hemmend auf das Neuritenwachstum auswirken.

Schmid et al. (2000) zeigten, dass für die Aktivierung des MAPK-Signalweges die durch die Kinase pp60<sup>c-src</sup> regulierte Endocytose von L1 essentiell ist, gleichzeitig wird durch den MAPK-Signalweg das L1 abhängige Neuritenwachstum stimuliert (siehe Abb. 4). Untersuchungen von P. Maness (University of North Carolina, School of Medicine, Chapel Hill, USA; persönliche Mitteilung) zeigten, dass L1-S1204L/S1248L ähnlich wie L1-wt endocytosiert wird, so dass die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L1 an den Ser-1204 und Ser-1248 bei der Regulation der Endocytose von L1 keine Rolle zu spielen scheint. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Inhibition von erk durch den MEK-Inhibitor PD98059 die Endocytose von L1 nicht beeinflusst, so dass die Aktivierung des MAPK-Signalweges anscheinend erst nach der Endocytose stattfindet (Schmid et al., 2000). Die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion des basalen Neuritenwachstums von differenzierten B35-L1-S1204L-, B35-L1-S1248L- und B35-L1-S1204L/S1248L-Zellen ist daher vermutlich auf die

Beeinflussung von Mechanismen zurückzuführen, die nach der Endocytose zum Tragen kommen bzw. durch diese ausgelöst werden. Interessanterweise lässt sich die Co-Lokalisation von L1 und aktiviertem erk2 nicht mit Zelloberflächen-exprimierten L1, sondern mit internalisiertem L1 in frühen Endosomen nachweisen (Schaefer et al., 1999). Möglicherweise ist die Phosphorylierung von internalisiertem L1 durch erk2 an der Regulation des intrazellulären Transports von L1-Vesikeln beteiligt, der dann in den untersuchten Mutanten gestört ist, so dass es zur Verminderung des basalen Neuritenwachstums kommt. Wie in der Einleitung beschrieben, zeigten Kamiguchi et al. (2000) für L1-abhängiges Neuritenwachstum einen L1-Wiederverwertungsmechanismus in den Wachstumskegeln von Neuronen (siehe Abb. 6). Auch wenn dieser Mechanismus nur für L1-abhängiges Neuritenwachstum gezeigt wurde, so könnte die für den anterograden Transport von L1 erforderliche Interaktion von L1-haltigen Vesikeln mit Mikrotubuli durch die Phosphorylierung von erk2 reguliert werden. Die Reduktion des in dieser Arbeit untersuchten basalen Neuritenwachstums könnte dann möglicherweise durch eine gestörte Interaktion der L1-haltigen Vesikel mit den dynamischen Enden der Mikrotubuli erklärt werden. Wie auch schon für die anderen Mutanten diskutiert, wäre es interessant das L1-stimulierte Neuritenwachstum der B35-L1-S1204L-, B35-L1-S1248L- und B35-L1-S1204L/S1248L Zellen zu untersuchen. Da erk-Aktivierung die Stimulierung des L1-abhängigen Neuritenwachstums zur Folge hat, kann vermutet werden, dass das Neuritenwachstum dieser Zellen, in denen L1 nicht mehr durch erk phosphoryliert werden kann, ähnlich wie das basale Neuritenwachstum gehemmt ist und ähnliche Mechanismen wie diskutiert (Ankyrin- oder Mikrotubuli-Interaktionen) betroffen sind. Allerdings ist auch möglich, dass andere, durch erk vermittelte Signalwege von Bedeutung sind und kein Unterschied zum Neuritenwachstum der L1-wt Zellen zu beobachten ist. Es wurde in dieser Arbeit auch untersucht, ob sich die Aktivität von erk durch die Mutationen L1-S1204L, L1-1248L und L1-S1204L/S1248L verändert. Nach der densitometrischen und statistischen Auswertung von 4 unabhängigen Experimenten konnte bei den L1-Mutanten (L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L) im Vergleich zu L1-wt keine signifikanten Unterschiede für die Aktivierung von erk1/2 festgestellt werden. Allerdings konnte für p-erk1 und etwas schwächer für p-erk2 insbesondere bei der Kultivierung der Zellen in definiertem, serumfreien Medium ein Trend für eine

gesteigerte Aktivierung beobachtet werden. Möglicherweise würde die Erhöhung der Anzahl an Experimenten diesen Trend statistisch bestätigen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass neben der Reduktion der basalen Neuritenlänge in ausdifferenzierten B35-L1-S1204L-, B35-L1-S1248L- und B35-L1-S1204L/S1248L Zellen die durchschnittliche Anzahl von Neuriten pro Zelle im Vergleich zu B35-L1wt signifikant erhöht ist. B35-L1-S1204L/S1248L Zellen zeigten diesen Anstieg auch schon im undifferenzierten Zustand. Nishimura et al. (2003) konnten zeigen, dass bei Kleinhirnneuronen und DRG Neuronen von Ankyrin<sub>B</sub> knock-out nicht aber von Ankyrin<sub>G</sub> knock-out Mäusen, die auf einem L1-Substrat kultiviert wurden, die Initiation der Neuriten signifikant reduziert wurde. Die Kultivierung der Kleinhirnneuronen und DRG Neuronen von Ankyrin<sub>B</sub> knock-out Mäusen auf N-Cadherin oder Laminin als Substrat, beeinflusste die Initiation der Neuriten nicht, so dass die Interaktion der cytoplasmatischen Domäne von L1 mit Ankyrin<sub>B</sub> und nicht mit Ankyrin<sub>G</sub> bei der L1 abhängigen Initiation der Neuriten eine Rolle zu spielen scheint. In diesem Zusammenhang ist sicher auch von Bedeutung, dass Ankyrin im proximalen Teil von Neuriten exprimiert wird, also dem Bereich, in dem das Neuritenwachstum initiiert wird. Interessanterweise wurde auch die Initiation der Neuriten von DRG Neuronen nach der Transfektion von L1-Mutanten mit Mutationen, die beim Menschen zu neurologischen Störungen führen (L1-S1224L und L1-S1229H), signifikant reduziert (Van Camp et al., 1996; Nishimura et al., 2003). Es ist nicht ausgeschlossen, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der beim basalen Neuritenwachstum der B35-L1-S1204L-, B35-L1-S1248L und B35-L1-S1204L/S1248L-Zellen nachgewiesenen erhöhten Anzahl an Neuriten pro Zelle und der vermehrten Initiation von Neuriten aufgrund einer Stabilisierung der Bindung von Ankyrin<sub>B</sub> an die cytoplasmatische Domäne von L1. Ein solcher Mechanismus würde auch im Einklang stehen mit einem gleichzeitig auf stabilisierter Ankyrinbindung beruhendem reduzierten Neuritenwachstum, wie bereits diskutiert wurde.

Zur Untersuchung der Migration der B35-L1-S1204L/S1248L Zellen auf Proteinen der Extrazellulärmatrix wurde die cDNA dieser Mutante der Arbeitsgruppe von P. Maness (Chapel Hill, USA) überlassen. Es zeigte sich, dass die Migration dieser Zellen im Vergleich zu den L1-wt Zellen gehemmt wird (P. Maness, persönliche

Mitteilung). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in der Arbeitsgruppe von P. Altevogt (DKFZ, Heidelberg) für die L1-Mutante gezeigt, in der das Ser-1248 gegen eine nicht phosphorylierbare Aminosäure ausgetauscht wurde (P. Altevogt, persönliche Mitteilung).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein Einfluss auf die zellautonome Migration (d. h. auf PLL als Substrat) der verschiedenen L1-Mutanten, bei denen die durch erk2 phosphorylierbaren Serine gegen Leucin ausgetauscht wurden, nachgewiesen werden. Diese unterschiedlichen Effekte sind auf das Substrat, auf dem die Migration der Zellen untersucht wurde, zurückzuführen. Für die L1-abhängige Migration von Zellen scheint deren Fähigkeit, mit Proteinen der Extrazellulärmatrix interagieren zu können, von entscheidender Bedeutung zu sein. Es wird angenommen, dass hierbei die Assoziation von L1 mit dem Extrazellulärmatrixrezeptor Integrin eine Rolle spielt (Needham et al., 2001; Thelen et al., 2002). Der Einfluss der Phosphorylierung des Ser-1248 auf die Migration scheint relativ gesichert zu sein, es ist jedoch die Frage, ob auch das Ser-1204 an diesem Mechanismus beteiligt ist, da die von P. Maness festgestellte Hemmung der Migration bei der Mutante L1-S1204L/S1248L auch allein auf die Mutation S1248L zurückgeführt werden könnte.

Es wäre interessant, die L1-Mutanten durch einen „knock-in“ in die L1-negative Maus einzuführen, um die Bedeutung der Phosphorylierung von L1 durch erk2 *in vivo* genauer zu untersuchen und die aufgestellten Hypothesen zu verifizieren.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Serin-Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von L1 für das Neuritenwachstum von kultivierten Neuroblastomzellen untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss der Phosphorylierung des Ser-1181 der cytoplasmatischen Domäne von L1 durch Casein Kinase 2 auf die Endocytose von L1 analysiert.

Zur Untersuchung der Bedeutung der Serin-Phosphorylierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 für das Neuritenwachstum wurden vier Serine der cytoplasmatischen Domäne von L1, von denen bekannt war, dass sie durch bestimmte Kinasen phosphoryliert werden können, gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Leucin ausgetauscht. Es wurden vier L1-Mutanten mit jeweils einem Serin-Leucin Austausch sowie eine weitere Mutante hergestellt, bei der zwei durch die MAP-Kinase erk2 phosphorylierbare Serine zu Leucin mutiert wurden (L1-S1152L, L1-S1181L, L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L). B35-Neuroblastomzellen mit geringer endogener L1-Expression wurden mit diesen Mutanten stabil transfiziert. Durch Immunfluoreszenz- und Western Blot-Analyse wurden für die weiteren Experimente Klone ausgewählt, bei denen die Expression der verschiedenen L1-Mutanten der des nicht mutierten L1 (L1-wt) vergleichbar war.

Der Einbau von  $^{32}\text{P}$ -ortho-Phosphat in L1-wt und die verschiedenen L1-Mutanten sowie die Markierung von Zelloberflächen-assoziiertem L1 durch Biotin zeigten, dass jeweils nur Zelloberflächen-exprimiertes L1 auch in phosphorylierter Form vorliegt.

Die Untersuchung des basalen, d. h. zellautonomen Neuritenwachstums wurde an den verschiedenen auf poly-L-Lysin kultivierten B35-Transfektanten entweder mit oder ohne Ausdifferenzierung durch dbcAMP durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutationen der phosphorylierbaren Serine das basale Neuritenwachstum auf unterschiedliche Weise beeinflussen. In L1-S1152L und L1-S1181L exprimierenden B35-Zellen war das basale Neuritenwachstum ohne

Behandlung mit dbcAMP signifikant erhöht, während dieser Unterschied nach Ausdifferenzierung der Zellen in einen neuronalen Zelltyp mit dbcAMP nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Das basale Neuritenwachstum scheint somit bei nicht differenzierten Zellen stimuliert zu werden, wenn Ser-1152 und Ser-1181 der cytoplasmatischen Domäne von L1 nicht phosphoryliert werden können, während die Phosphorylierung dieser beiden Serine das basale Neuritenwachstum von ausdifferenzierten Zellen nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu war das basale Neuritenwachstum von ausdifferenzierten B35-Zellen, die L1-Mutanten exprimieren, die nicht mehr durch erk2 phosphoryliert werden konnten, signifikant reduziert (L1-S1204L, L1-S1248L, L1-S1204L/S1248L). Die S1204L Mutation führt im Vergleich zur S1248L Mutation zu einer stärkeren Hemmung des basalen Neuritenwachstums, so dass vermutet werden kann, dass die Phosphorylierung des Ser-1204 insgesamt eine wichtigere Rolle für das basale Neuritenwachstum spielt. Mit der Reduktion des basalen Neuritenwachstums wurde zudem in ausdifferenzierten L1-S1204L-, L1-S1248L- und L1-S1204L/S1248L-B35-Neuroblastomzellen ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Anzahl an Neuriten detektiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem an transient transfizierten Zellen die zellautonome Migration (d. h. auf poly-L-Lysin als Substrat) untersucht. Für die untersuchten Mutanten L1-S1152L, L1-S1181L und L1-S1204L/S1248L konnten im Vergleich zu L1-wt allerdings keine signifikanten Unterschiede im Migrationsverhalten nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung dieser Serine des Zelladhäsionsmoleküls L1 scheint daher für die Migration zumindest auf einem inerten Substrat wie poly-L-Lysin keine Bedeutung zu haben.

Da die Casein Kinase 2 die cytoplasmatische Domäne von L1 am Ser-1181 phosphoryliert, das unmittelbar auf das L1-Endocytosesignals YRSL folgt, wurde außerdem in dieser Arbeit die Bedeutung der Phosphorylierung des Ser-1181 auf die Endocytose von L1 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Endocytose von L1 signifikant erhöht ist, wenn L1 am Ser-1181 nicht phosphoryliert werden kann. Dieser Unterschied konnte an stabil transfizierten B35-Zellen mit und ohne Ausdifferenzierung mit dbcAMP nachgewiesen werden. Welche Rolle die Phosphorylierung von Ser-1181 durch Casein Kinase 2 für das

Wachstum von Neuriten oder andere L1-abhängige Prozesse während der Entwicklung des Nervensystems hat, muss in weiterführenden Untersuchungen abgeklärt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alberts, P., R. Rudge, I. Hinners, A. Muzerelle, S. Martinez-Arca, T. Irinopoulou, V. Marthiens, S. Tooze, F. Rathjen, P. Gaspar, and T. Galli. 2003. Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion. *Mol Biol Cell*. 14:4207-20.
- Appel, F., J. Holm, J.F. Conscience, and M. Schachner. 1993. Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J Neurosci*. 13:4764-75.
- Beer, S., M. Oleszewski, P. Gutwein, C. Geiger, and P. Altevogt. 1999. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci*. 112 ( Pt 16):2667-75.
- Beggs, H.E., P. Soriano, and P.F. Maness. 1994. NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J. Cell Biol*. 127:825-833.
- Bennett, V., and L. Chen. 2001. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol*. 13:61-7.
- Bianchine, J.W., and R.C. Lewis, Jr. 1974. The MASA syndrome: a new heritable mental retardation syndrome. *Clin Genet*. 5:298-306.
- Bickers, D.S. and Adams, R.D. 1949. Hereditary stenosis of the aqueduct of Sylvius as a cause of congenital hydrocephalus. *Brain* 72: 246-262.
- Bollensen, E., and M. Schachner. 1987. The peripheral myelin glycoprotein P0 expresses the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures shared by neural adhesion molecules. *Neurosci Lett*. 82:77-82.
- Brittis, P.A., J. Silver, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1996. Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina. *Mol. Cell. Neurosci*. 8:120-128.
- Brummendorf, T., M. Hubert, U. Treubert, R. Leuschner, A. Tarnok, and F.G. Rathjen. 1993. The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron*. 10:711-27.
- Buchstaller, A., S. Kunz, P. Berger, B. Kunz, U. Ziegler, C. Rader, and P. Sonderegger. 1996. Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion. *J Cell Biol*. 135:1593-607.

- Burden-Gulley, S.M., H.R. Payne, and V. Lemmon. 1995. Growth cones are actively influenced by substrate-bound adhesion molecules. *J Neurosci.* 15:4370-81.
- Burden-Gulley, S.M., M. Pendergast, and V. Lemmon. 1997. The role of cell adhesion molecule L1 in axonal extension, growth cone motility, and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 290:415-22.
- Castellani, V. 2002. The function of neuropilin/L1 complex. *Adv Exp Med Biol.* 515:91-102.
- Castellani, V., A. Chedotal, M. Schachner, C. Faivre-Sarrailh, and G. Rougon. 2000. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Semaphorin 3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron.* 27:237-49.
- Chou, D.K., A.A. Ilyas, J.E. Evans, C. Costello, R.H. Quarles, and F.B. Jungalwala. 1986. Structure of sulfated glucuronyl glycolipids in the nervous system reacting with HNK-1 antibody and some IgM paraproteins in neuropathy. *J Biol Chem.* 261:11717-25.
- Cohen, N.R., J.S.H. Taylor, L.B. Scott, R.W. Guillery, P. Soriano, and A.J.W. Furley. 1997. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Current Biol.* 8:26-33.
- Corbalan-Garcia, S., S.S. Yang, K.R. Degenhardt, and D. Bar-Sagi. 1996. Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Mol Cell Biol.* 16:5674-82.
- Coutelle, O., G. Nyakatura, S. Taudien, G. Elgar, S. Brenner, M. Platzer, B. Drescher, M. Jouet, S. Kenwright, and A. Rosenthal. 1998. The neural cell adhesion molecule L1: genomic organisation and differential splicing is conserved between man and the pufferfish *Fugu*. *Gene.* 208:7-15.
- Crossin, K.L., and L.A. Krushel. 2000. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Developmental Dynamics.* 218:260-279.
- Dahlin-Huppe, K., E.O. Berglund, B. Ranscht, and W.B. Stallcup. 1997. Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol Cell Neurosci.* 9:144-56.
- Dahme, M., U. Bartsch, R. Martini, B. Anliker, M. Schachner, and N. Mantei. 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat Genet.* 17:346-9.
- Davis, J.Q., and V. Bennett. 1994. Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem.* 269:27163-6.

- Davis, J.Q., T. McLaughlin, and V. Bennett. 1993. Ankyrin-binding proteins related to nervous system cell adhesion molecules: candidates to provide transmembrane and intercellular connections in adult brain. *J Cell Biol.* 121:121-33.
- DeBernardo, A.P., and S. Chang. 1996. Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J Cell Biol.* 133:657-66.
- Deichmann, M., H. Kurzen, U. Egner, P. Altevogt, and W. Hartschuh. 2003. Adhesion molecules CD171 (L1CAM) and CD24 are expressed by primary neuroendocrine carcinomas of the skin (Merkel cell carcinomas). *J Cutan Pathol.* 30:363-8.
- Demyanenko, G.P., A.Y. Tsai, and P.F. Maness. 1999. Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci.* 19:4907-20.
- Dickson, T.C., C.D. Mintz, D.L. Benson, and S.R. Salton. 2002. Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J. Cell Biol.* 157:1105-1112.
- Doherty, P., and F.S. Walsh. 1994. Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Current Opinion in Neurobiology.* 4:49-55.
- Doherty, P., and F.S. Walsh. 1996. CAM-FGF receptor interactions: A model for axonal growth. *Mol. Cell. Neurosci.* 8:99-111.
- Doherty, P., Williams, E, Walsh, F S. 1995. A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron.* 14:57-66.
- Ebeling, O., A. Duczmal, S. Aigner, C. Geiger, S. Schollhammer, J.T. Kemshead, P. Moller, R. Schwartz-Albiez, and P. Altevogt. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol.* 26:2508-16.
- Fahrig, T., B. Schmitz, D. Weber, A. Kucherer-Ehret, A. Faissner, and M. Schachner. 1990. Two Monoclonal Antibodies Recognizing Carbohydrate Epitopes on Neural Adhesion Molecules Interfere with Cell Interactions. *Eur J Neurosci.* 2:153-161.
- Faissner, A. 1987. Monoclonal antibody detects carbohydrate microheterogeneity on the murine cell adhesion molecule L1. *Neurosci Lett.* 83:327-32.
- Faissner, A., J. Kruse, C. Goridis, E. Bock, and M. Schachner. 1984. The neural cell adhesion molecule L1 is distinct from the N-CAM related group of surface antigens BSP-2 and D2. *Embo J.* 3:733-7.

- Faissner, A., D.B. Teplow, D. Kubler, G. Keilhauer, V. Kinzel, and M. Schachner. 1985. Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *Embo J.* 4:3105-13.
- Felding-Habermann, B., S. Silletti, F. Mei, C.H. Siu, P.M. Yip, P.C. Brooks, D.A. Cheresh, T.E. O'Toole, M.H. Ginsberg, and A.M. Montgomery. 1997. A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins. *J Cell Biol.* 139:1567-81.
- Finckh, U., J. Schroder, B. Ressler, A. Veske, and A. Gal. 2000. Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease. *Am J Med Genet.* 92:40-6.
- Fransen, E., R. D'Hooge, G. Van Camp, M. Verhoye, J. Sijbers, E. Reyniers, P. Soriano, H. Kamiguchi, R. Willemsen, S.K. Koekkoek, C.I. De Zeeuw, P.P. De Deyn, A. Van der Linden, V. Lemmon, R.F. Kooy, and P.J. Willems. 1998 a. L1 knockout mice show dilated ventricles, vermiform hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum Mol Genet.* 7:999-1009.
- Fransen, E., C. Schrander-Stumpel, L. Vits, P. Coucke, G. Van Camp, and P.J. Willems. 1994. X-linked hydrocephalus and MASA syndrome present in one family are due to a single missense mutation in exon 28 of the L1CAM gene. *Hum Mol Genet.* 3:2255-6.
- Fransen, E., G. Van Camp, R. D'Hooge, L. Vits, and P.J. Willems. 1998 b. Genotype-phenotype correlation in L1 associated diseases. *J Med Genet.* 35:399-404.
- Fransen, E., L. Vits, G. Van Camp, and P.J. Willems. 1996. The clinical spectrum of mutations in L1, a neuronal cell adhesion molecule. *Am J Med Genet.* 64:73-7.
- Friedlander, D.R., P. Milev, L. Karthikeyan, R.K. Margolis, R.U. Margolis, and M. Grumet. 1994. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 125:669-80.
- Fushiki, S., and M. Schachner. 1986. Immunocytological localization of cell adhesion molecules L1 and N-CAM and the shared carbohydrate epitope L2 during development of the mouse neocortex. *Brain Res.* 389:153-67.
- Garver, T.D., Q. Ren, S. Tuvia, and V. Bennett. 1997. Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J. Cell Biol.* 137:703-714.
- Gil, O.D., T. Sakurai, A.E. Bradley, M.Y. Fink, M.R. Cassella, J.A. Kuo, and D.P. Felsenfeld. 2003. Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol.* 162:719-30.

- Girault, J.A., H.C. Hemmings, Jr., S.H. Zorn, E.L. Gustafson, and P. Greengard. 1990. Characterization in mammalian brain of a DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase II. *J Neurochem.* 55:1772-83.
- Griffith, L.S., B. Schmitz, and M. Schachner. 1992. L2/HNK-1 carbohydrate and protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule P0. *J Neurosci Res.* 33:639-48.
- Grumet, M., D.R. Friedlander, and G.M. Edelman. 1993. Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun.* 1:177-90.
- Grumet, M., V. Mauro, M.P. Burgoon, G.M. Edelman, and B.A. Cunningham. 1991. Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol.* 113:1399-412.
- Gumbiner, B.M. 1993. Proteins associated with the cytoplasmatic surface of adhesion molecules. *Neuron.* 11:551-564.
- Gundersen, R.W. 1987. Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro. *Dev Biol.* 121:423-31.
- Gutwein, P., S. Mechtersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel, and D.P. Altevogt. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *Faseb J.* 17:292-4.
- Gutwein, P., M. Oleszewski, S. Mechtersheimer, N. Agmon-Levin, K. Krauss, and P. Altevogt. 2000. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem.* 275:15490-7.
- Hall, H., E.J. Williams, S.E. Moore, F.S. Walsh, A. Prochiantz, and P. Doherty. 1996. Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neurite outgrowth by a cell-membrane permeable phosphopeptide. *Curr. Biol.* 6:580-587.
- Halliday, J., C.W. Chow, D. Wallace, and D.M. Danks. 1986. X linked hydrocephalus: a survey of a 20 year period in Victoria, Australia. *J Med Genet.* 23:23-31.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80.
- Heiland, P.C., L.S. Griffith, R. Lange, M. Schachner, B. Hertlein, O. Traub, and B. Schmitz. 1998. Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *Eur J Cell Biol.* 75:97-106.
- Heiland, P.C., B. Hertlein, O. Traub, L.S. Griffith, and B. Schmitz. 1996. The neural adhesion molecule L1 is phosphorylated on tyrosine and serine residues. *Neuroreport.* 7:2675-8.

- Holland, S.J., E. Peles, T. Pawson, and J. Schlessinger. 1998. Cell-contact-dependent signalling in axon growth and guidance: Eph receptor tyrosine kinases and receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$ . *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:117-127.
- Holm, J., F. Appel, and M. Schachner. 1995. Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in homophilic interactions. *J Neurosci Res.* 42:9-20.
- Horstkorte, R., M. Schachner, J.P. Magyar, T. Vorherr, and B. Schmitz. 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.* 121:1409-21.
- Hortsch, M. 1996. The L1 family of neural cell adhesion molecules: Old proteins performing new tricks. *In Neuron.* Vol. 17. 587-593.
- Hortsch, M., K.S. O'Shea, G. Zhao, F. Kim, Y. Vallejo, and R.R. Dubreuil. 1998. A conserved role for L1 as a transmembrane link between neuronal adhesion and membrane cytoskeleton assembly. *Cell Adhesion and Communication.* 5:61-73.
- Hortsch, M., Y.M. Wang, Y. Marikar, and A.J. Bieber. 1995. The cytoplasmic domain of the Drosophila cell adhesion molecule neuroglian is not essential for its homophilic adhesive properties in S2 cells. *J Biol Chem.* 270:18809-17.
- Ignelzi, M.A., D.R. Miller, P. Soriano, and P.F. Maness. 1994. Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron.* 12:873-884.
- Ivanov, D.B., M.P. Philippova, and V.A. Tkachuk. 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc).* 66:1174-86.
- Jacob, J., J. Haspel, N. Kane-Goldsmith, and M. Grumet. 2002. L1 mediated homophilic binding and neurite outgrowth are modulated by alternative splicing of exon 2. *J Neurobiol.* 51:177-89.
- Jouet, M., A. Rosenthal, G. Armstrong, J. MacFarlane, R. Stevenson, J. Paterson, A. Metzberg, V. Ionasescu, K. Temple, and S. Kenwrick. 1994. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nat Genet.* 7:402-7.
- Jouet, M., A. Rosenthal, and S. Kenwrick. 1995. Exon 2 of the gene for neural cell adhesion molecule L1 is alternatively spliced in B cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 30:378-80.
- Kadmon, G., B.A. Imhof, P. Altevogt, and M. Schachner. 1995. Adhesive hierarchy involving the cell adhesion molecules L1, CD24, and  $\alpha 6$  integrin in murine neuroblastoma N2A cells. *Biochem. a. Biophys. Res.* 214:94-101.

- Kadmon, G., A. Kowitz, P. Altevogt, and M. Schachner. 1990 b. Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate-dependent. *J. Cell Biol.* 0110:209-218.
- Kadmon, G., A. Kowitz, P. Altevogt, and M. Schachner. 1990 a. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* 110:193-208.
- Kallunki, P., G.M. Edelman, and F.S. Jones. 1997. Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. *J Cell Biol.* 138:1343-54.
- Kalus, I., B. Schnegelsberg, N.G. Seidah, R. Kleene, and M. Schachner. 2003. The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem.* 278:10381-8.
- Kamiguchi, H. 2003. The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1. *Mol Neurobiol.* 28:219-28.
- Kamiguchi, H., and V. Lemmon. 1997. Neural cell adhesion molecule L1: Signaling pathways and growth cone motility. *J. Neurosci. Res.* 49:1-8.
- Kamiguchi, H., and V. Lemmon. 1998 . A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J. Neurosci.* 18:3749-3756.
- Kamiguchi, H., and V. Lemmon. 2000. Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J. Neurosci.* 20:3676-3686.
- Kamiguchi, H., K.E. Long, M. Pendergast, A.W. Schaefer, I. Rapoport, T. Kirchhausen, and V. Lemmon. 1998. The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J. Neurosci.* 18:5311-5321.
- Kamiguchi, H., and F. Yoshihara. 2001. The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J. Neurosci.* 21:9194-9203.
- Katayama, M., A. Iwamatsu, H. Masutani, K. Furuue, K. Takeda, H. Wada, T. Masuda, and K. Ishii. 1997. Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct Funct.* 22:511-6.
- Kenwrick, S., A. Watkins, and E. De Angelis. 2000. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum. Mol. Gen.* 9:879-886.
- Kiselyov, V.V., G. Skladchikova, A.M. Hinsby, P.H. Jensen, N. Kulahin, V. Soroka, N. Pedersen, V. Tsetlin, F.M. Poulsen, V. Berezin, and E. Bock. 2003. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure (Camb).* 11:691-701.

- Kolkova, K., V. Novitskaya, N. Pedersen, V. Berezin, and E. Bock. 2000. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 20:2238-2246.
- Kruse, J., R. Mailhammer, H. Wernecke, A. Faissner, I. Sommer, C. Goidis, and M. Schachner. 1984. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature.* 311:153-5.
- Kuhn, T.B., M.F. Schmidt, and S.B. Kater. 1995. Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron.* 14:275-85.
- Kuhn, T.B., E.T. Stoeckli, M.A. Condrau, F.G. Rathjen, and P. Sonderegger. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol.* 115:1113-26.
- Kunimoto, M. 1995. A neuron-specific isoform of brain ankyrin, 440-kD ankyrinB, is targeted to the axons of rat cerebellar neurons. *J Cell Biol.* 131:1821-9.
- Kunimoto, M., T. Adachi, and M. Ishido. 1998. Expression and localization of brain ankyrin isoforms and related proteins during early developmental stages of rat nervous system. *J Neurochem.* 71:2585-92.
- Kunz, B., R. Lierheimer, C. Rader, M. Spirig, U. Ziegler, and P. Sonderegger. 2002. Axonin-1/TAG-1 mediates cell-cell adhesion by a cis-assisted trans-interaction. *J Biol Chem.* 277:4551-7.
- Kunz, S., U. Ziegler, B. Kunz, and P. Sonderegger. 1996. Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NgCAM during neurite fasciculation. *J Cell Biol.* 135:253-67.
- Lemmon, V., S.M. Burden, H.R. Payner, G.J. Elmslie, and M.L. Hlavin. 1992. Neurite growth on different substrates: Permissive versus instructive influence and the role of adhesive strength. *J. Neurosci.* 12:818-826.
- Lemmon, V., K.L. Farr, and C. Lagenaur. 1989. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron.* 2:1597-603.
- Letourneau, P.C., and T.A. Shattuck. 1989. Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones. *Development.* 105:505-519.
- Lin, D.M., R.D. Fetter, C. Kopczynski, G. Grenningloh, and C.S. Goodman. 1994. Genetic analysis of fasciclin II in *Drosophila*: defasciculation, refasciculation, and altered fasciculation. *Neuron.* 13:1055-1069.
- Lindner, J., F.G. Rathjen, and M. Schachner. 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature.* 305:427-30.

- Linnemann, D., K. Edvardsen, and E. Bock. 1988. Developmental study of the cell adhesion molecule L1. *Dev Neurosci.* 10:34-42.
- Long, K.E., H. Asou, M.D. Snider, and V. Lemmon. 2001. The role of endocytosis in regulation L1-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 276:1285-1290.
- Luthi, A., J.P. Laurent, A. Figurov, D. Muller, and M. Schachner. 1994. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature.* 372:777-9.
- Mechtersheimer, S., P. Gutwein, N. Agmon-Levin, A. Stoeck, M. Oleszewski, S. Riedle, R. Postina, F. Fahrenholz, M. Fogel, V. Lemmon, and P. Altevogt. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol.* 155:661-73.
- Milev, P., D.R. Friedlander, T. Sakurai, L. Karthikeyan, M. Flad, R.K. Margolis, M. Grumet, and R.U. Margolis. 1994. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol.* 127:1703-15.
- Miura, M., H. Asou, M. Kobayashi, and K. Uyemura. 1992. Functional expression of a full-length cDNA coding for rat neural cell adhesion molecule L1 mediates homophilic intercellular adhesion and migration of cerebellar neurons. *J Biol Chem.* 267:10752-8.
- Miura, M., M. Kobayashi, H. Asou, and K. Uyemura. 1991. Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing. *FEBS Lett.* 289:91-5.
- Montgomery, A.M., J.C. Becker, C.H. Siu, V.P. Lemmon, D.A. Cheresh, J.D. Pancook, X. Zhao, and R.A. Reisfeld. 1996. Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol.* 132:475-85.
- Needham, L.K., K. Thelen, and P.F. Maness. 2001. Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J. Neurosci.* 21:1490-1500.
- Nishimura, T., Y. Fukata, K. Kato, T. Yamaguchi, Y. Matsuura, H. Kamiguchi, and K. Kaibuchi. 2003. CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat Cell Biol.* 5:819-26.
- Nishimura, K., Yoshihara F., Tojima T., Ooashi N., Yoon W., Mikoshiba k., Bennett V., Kamiguchi H. 2003. L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol.* 5: 1077-1088
- Ohno, H., M.C. Fournier, G. Poy, and J.S. Bonifacino. 1996. Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem.* 271:29009-15.

- Patel, K., F. Kiely, F. Rathjen, and J. Kemshead. 1990. Monoclonal antibody UJ127.11 recognizes the human homologue of mouse L1 cell adhesion molecule. *Biochem Soc Trans.* 18:274.
- Perron, J.C., and J.L. Bixby. 1999. Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation. *Mol Cell Neurosci.* 13:362-78.
- Persohn, E., and M. Schachner. 1987. Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. *J Cell Biol.* 105:569-76.
- Pesheva, P., A.F. Horwitz, and M. Schachner. 1987. Integrin, the cell surface receptor for fibronectin and laminin, expresses the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures shared by adhesion molecules. *Neurosci Lett.* 83:303-6.
- Poltorak, M., R. Sadoul, G. Keilhauer, C. Landa, T. Fahrig, and M. Schachner. 1987. Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J Cell Biol.* 105:1893-9.
- Rader, C., B. Kunz, R. Lierheimer, R.J. Giger, P. Berger, P. Tittmann, H. Gross, and P. Sonderegger. 1996. Implications for the domain arrangement of axonin-1 derived from the mapping of its NgCAM binding site. *Embo J.* 15:2056-68.
- Rathjen, F.G., and M. Schachner. 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *Embo J.* 3:1-10.
- Rathjen, F.G., J.M. Wolff, S. Chang, F. Bonhoeffer, and J.A. Raper. 1987. Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell.* 51:841-9.
- Reid, R.A., and J.J. Hemperly. 1992. Variants of human L1 cell adhesion molecule arise through alternate splicing of RNA. *J Mol Neurosci.* 3:127-35.
- Ren, R., Mayer B.J., Cicchetti, O. and Baltimore, D. 1993. *Science* 259: 1157-1161.
- Rivas, R.J., D.W. Burmeister, and D.J. Goldberg. 1992. Rapid effects of laminin on the growth cone. *Neuron.* 8:107 - 115.
- Roberts, C., N. Platt, A. Streit, M. Schachner, and C.D. Stern. 1991. The L5 epitope: an early marker for neural induction in the chick embryo and its involvement in inductive interactions. *Development.* 112:959-70.
- Rosenthal, A., M. Jouet, and S. Kenwrick. 1992. Aberrant splicing of neural cell adhesion molecule L1 mRNA in a family with X-linked hydrocephalus. *Nat Genet.* 2:107-12.

- Ruppert, M., S. Aigner, M. Hubbe, H. Yagita, and P. Altevogt. 1995. The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol.* 131:1881-91.
- Saad, B., D.B. Constam, R. Ortmann, M. Moos, A. Fontana, and M. Schachner. 1991. Astrocyte-derived TGF-beta 2 and NGF differentially regulate neural recognition molecule expression by cultured astrocytes. *J Cell Biol.* 115:473-84.
- Sadoul, K., R. Sadoul, A. Faissner, and M. Schachner. 1988. Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem.* 50:510-21.
- Sadoul, R., F. Kirchhoff, and M. Schachner. 1989. A protein kinase activity is associated with and specifically phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 53:1471 - 1478.
- Saffell, J.L., E.J. Williams, I.J. Mason, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1997. Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron.* 18:231-242.
- Schaefer, A.W., Y. Kamei, H. Kamiguchi, E.V. Wong, I. Rapoport, T. Kirchhausen, C.M. Beach, G. Landreth, S.K. Lemmon, and V. Lemmon. 2002. L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J. Cell Biol.* 157:1223-232.
- Schaefer, A.W., H. Kamiguchi, E.V. Wong, C.M. Beach, G. Landreth, and V. Lemmon. 1999. Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J. Biol. Chem.* 274:37965-37973.
- Schmid, R.S., R.D. Graff, M.D. Schaller, S. Chen, M. Schachner, J.J. Hemperly, and P.F. Maness. 1999. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol.* 38:542-58.
- Schmid, R.S., W.M. Pruitt, and P.F. Maness. 2000. A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J. Neurosci.* 20:4177-4188.
- Schmitz, B., J. Peter-Katalinic, H. Egge, and M. Schachner. 1993. Monoclonal antibodies raised against membrane glycoproteins from mouse brain recognize N-linked oligomannosidic glycans. *Glycobiology.* 3:609-17.
- Schmitz, B., M. Schachner, Y. Ito, T. Nakano, and T. Ogawa. 1994. Determination of structural elements of the L2/HNK-1 carbohydrate epitope required for its function. *Glycoconj J.* 11:345-52.
- Schubert, D., S. Heinemann, W. Carlisle, H. Tarikas, B. Kimes, J. Patrick, J.H. Steinbach, W. Culp, and B.L. Brandt. 1974. Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature.* 249:224-227.

- Scotland, P., D. Zhou, H. Benveniste, and V. Bennett. 1998. Nervous system defects of Ankyrin<sub>B</sub> (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kD Ankyrin<sub>B</sub> in premyelinated axons. *J. Cell Biol.* 143:1305-1315.
- Serville, F., S. Lyonnet, A. Pelet, M. Reynaud, C. Louail, A. Munnich, and M. Le Merrer. 1992. X-linked hydrocephalus: clinical heterogeneity at a single gene locus. *Eur J Pediatr.* 151:515-8.
- Silletti, S., F. Mei, D. Sheppard, and A.M. Montgomery. 2000. Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol.* 149:1485-502.
- Simon, H., S. Klinz, T. Fahrig, and M. Schachner. 1991. Molecular association of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the surface membrane of neuroblastoma cells is shown by chemical cross-linking. *Eur. J. of Neurosci.* 3:634-640.
- Skubitz, A.P., P.C. Letourneau, E. Wayner, and L.T. Furcht. 1991. Synthetic peptides from the carboxy-terminal globular domain of the A chain of laminin: their ability to promote cell adhesion and neurite outgrowth, and interact with heparin and the beta 1 integrin subunit. *J Cell Biol.* 115:1137-48.
- Streit, A., A. Faissner, B. Gehrig, and M. Schachner. 1990. Isolation and biochemical characterization of a neural proteoglycan expressing the L5 carbohydrate epitope. *J Neurochem.* 55:1494-506.
- Streit, A., C.T. Yuen, R.W. Loveless, A.M. Lawson, J. Finne, B. Schmitz, T. Feizi, and C.D. Stern. 1996. The Le(x) carbohydrate sequence is recognized by antibody to L5, a functional antigen in early neural development. *J Neurochem.* 66:834-44.
- Suter, D.M., and P. Forscher. 1998. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8:106-116.
- Takeda, Y., H. Asou, Y. Murakami, M. Miura, M. Kobayashi, and K. Uyemura. 1996. A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis. *J Neurochem.* 66:2338-49.
- Thelen, K., V. Kedar, A.K. Panicker, R.-S. Schmid, B.T. Midkiff, and P.F. Maness. 2002. The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J. Neurosci.* 22:4918-4931.
- Traub, L.M. 2003. Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J Cell Biol.* 163:203-8.
- Ulloa, L., J. Diaz-Nido, and J. Avila. 1993. Depletion of casein kinase II by antisense oligonucleotide prevents neuritogenesis in neuroblastoma cells. *Embo J.* 12:1633-40.

- Van Camp, G., E. Fransen, L. Vits, G. Raes, and P.J. Willems. 1996. A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion molecule L1CAM (Xq28). *Hum Mutat.* 8:391.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-98.
- Viollet, C., and P. Doherty. 1997. CAMs and the FGF receptor: an interacting role in axonal growth. *Cell Tissue Res.* 290:451-5.
- Vits, L., G. Van Camp, P. Coucke, E. Fransen, K. De Boule, E. Reyniers, B. Korn, A. Poustka, G. Wilson, C. Schrandt-Stumpel, and et al. 1994. MASA syndrome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM. *Nat Genet.* 7:408-13.
- Vogt, L., R.J. Giger, U. Ziegler, B. Kunz, A. Buchstaller, W. Hermens, M.G. Kaplitt, M.R. Rosenfeld, D.W. Pfaff, J. Verhaagen, and P. Sonderegger. 1996. Continuous renewal of the axonal pathway sensor apparatus by insertion of new sensor molecules into the growth cone membrane. *Curr Biol.* 6:1153-8.
- Walsh, F.S., and P. Doherty. 1997. Neural cell adhesion molecules of the Immunoglobulin superfamily: Role in Axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:425-56.
- Weller, S., and J. Gartner. 2001. Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat.* 18:1-12.
- Williams, E.J., B. Mittal, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1995. A  $Ca^{2+}$ /calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Mol. Cell. Neurosci.* 6:69-79.
- Wong, E.V., S. Kenwrick, P. Willems, and V. Lemmon. 1995. Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *TINS.* 18:168-171.
- Wong, E.V., A.W. Schaefer, G. Landreth, and V. Lemmon. 1996 a. Casein kinase II phosphorylated the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 66:779-786.
- Wong, E.V., A.W. Schaefer, G. Landreth, and V. Lemmon. 1996 b. Involvement of p90<sup>rsk</sup> in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 271:18217-18223.
- Yamasaki, M., P. Thompson, and V. Lemmon. 1997. CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics.* 28:175-8.
- Zhao, X., and C.H. Siu. 1995. Colocalization of the homophilic binding site and the neuritogenic activity of the cell adhesion molecule L1 to its second Ig-like domain. *J Biol Chem.* 270:29413-21.

Zisch, A.H., and E.B. Pasquale. 1997. The Eph family: a multitude of receptors that mediate cell recognition signals. *Cell Tissue Res.* 290:217-26.

Zisch, A.H., W.B. Stallcup, L.D. Chong, K. Dahlin-Huppe, J. Voshol, M. Schachner, and E.B. Pasquale. 1997. Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: Implication of the eph kinase CeK5. *J. Neurosci. Res.* 47:655-665.

## 8 Anlage

### A) m-RNA von humanem L1

Homo sapiens Zelladhäsionsmolekül L1 (L1CAM) mRNA (complete cds, M77640), die codierende Region von L1CAM ist schwarz gekennzeichnet.

```

1  ccgcggtgccc gccgggaaaag atggtcgtgg cgctgcggta cgtgtggcct ctctctctct
61 gcagcccctg cctgcttatac cagatccccg aggaatatga aggacacat  gtgatggagc
121 cacctgtcat cacggaacag tctccacggc gcctggttgt cttccccaca gatgacatca
181 gcctcaagtg tgaggccagt ggcaagcccg aagtgcagtt ccgctggacg agggatggtg
241 tccacttcaa acccaaggaa gagctgggtg tgaccgtgta ccagtcgccc cactctggct
301 ccttcacat  cacgggcaac aacagcaact ttgctcagag gttccagggc atctaccgct
361 gctttgccag caataagctg ggcaccgcca tgtcccatga gatccggctc atggccgagg
421 gtgcccccaa gtggccaaaag gagacagtga agcccgtgga ggtggaggaa ggggagtcag
481 tggttctgcc ttgcaaccct ccccccaagtg cagagcctct ccggatctac tggatgaaca
541 gcaagatctt gcacatcaag caggacgagc gggtgacgat gggccagaac ggcaacctct
601 actttgcaa  tgtgctcacc tccgacaacc actcagacta catctgccac gccacttcc
661 caggcaccag gaccatcatt cagaaggaac ccattgacct ccgggtcaag gccaccaaca
721 gcatgattga caggaagccg cgctgtctct tccccaccaa ctccagcagc cacctggtagg
781 ccttgcaagg gcagccattg gtccctggagt gcatcgccga gggctttccc acgccacca
841 tcaaatggct gcgccccagt ggccccatgc cagctgaccg tgtcacctac cagaaccaca
901 acaagaccct gcagctgctg aaagtgggcg aggaggatga tggcgagtac cgctgcctgg
961 ccgagaactc actgggcagt gccggcatg cgtactatgt caccgtggag gctgccccgt
1021 actggctgca caagccccag agccatctat atgggcccagg agagactgcc cgctggact
1081 gccaaagtcca gggcaggccc caaccagagg tcacctggag aatcaacggg atccctgtgg
1141 aggagctggc caaagaccag aagtaccgga ttcagcgtgg cgccctgac  ctgagcaacg
1201 tgcagcccag tgacacaatg gtgacccaat gtgaggcccc caaccggcac gggctcttgc
1261 ttgccaatgc ctacatctac gttgtccagc tgcagccaa gatcctgact gggacaatc
1321 agacgtacat ggctgtccag ggcagcactg cctaccttct gtgcaaggcc ttcggagcgc
1381 ctgtgcccag tgttcagtgg ctggacgagg atgggacaac agtgcttcag gacgaacgct
1441 tcttccccta tgccaatggg accctgggca ttcgagacct ccaggccaat gacaccggac
1501 gctacttctg cctggctgcc aatgaccaa acaatgttac catcatggct aacctgaagg
1561 ttaaagatgc aactcagatc actcaggggc cccgcagcac aatcgagaag aaaggttcca
1621 gggtgacctt cacgtgccag gcctcctttg acccctcctt gcagcccagc atcacctggc
1681 gtggggacgg tcgagacctc caggagcttg gggacagtga caagtacttc atagaggatg
1741 ggcgcctggt catccacagc ctggactaca gcgaccaggg caactacagc tgcgtggcca
1801 gtaccgaact ggatgtggtg gagagtaggg cacagctctt ggtggtgggg agccctgggc
1861 cggtgccacg gctgggtgctg tccgacctgc acctgctgac gcagagccag gtgcgcgtgt
1921 cctggagtcc tgcagaagac cacaatgcc ccattgagaa atatgacatt gaatttgagg
1981 acaaggaaat ggcgcctgaa aaatggtaca gtctgggcaa ggttccaggg aaccagacct
2041 ctaccacctt caagctgtcg ccctatgtcc actacacctt tagggttact gccataaaca
2101 aatatggccc cggggagccc agccccgtct ctgagactgt ggtcacacct gaggcagccc
2161 cagagaagaa ccctgtggat gtgaaggggg aaggaaatga gaccaccaat atggtcatca
2221 cgtggaagcc gctccggtgg atggactgga acgccccca ggttcagtac cgctgcagt
2281 ggcgcctca  ggggacacga gggccctggc aggagcagat agtcagcagc cccttctctg
2341 ttgtgtccaa cacgtccacc ttcgtgcctt atgagatcaa agtccaggcc gtcaacagcc
2401 agggcaaggg accagagccc caggtcacta tcggctactc tggagaggac tacccccagg
2461 caatccctga gctggaaggc attgaaatcc tcaactcaag tgccgtgctg gtcaagtggc
2521 ggccggtgga cctggcccag gtcaagggcc acctccgagg atacaatgtg acgtactgga
2581 gggagggcag tcagaggaag cacagcaaga gacatatcca caaagacat  gtggtggtgc
2641 ccgccaacac caccagtgtc atcctcagtg gcttgccggc ctatagctcc taccacctgg
2701 aggtgcaggc cttaaacggg cgaggatcgg ggcccggcag cgagttcacc ttcagcacc
2761 cagagggagt gcctggccac cccgaggcgt tgcacctgga gtgccagtcg aacaccagcc
2821 tgctgctgcg ctggcagccc ccaactcagc acaacggcgt gctcaccggc tacgtgctct
2881 cctaccaccc cctggatgag gggggcaagg ggcaactgtc cttcaacctt cgggaccccc

```

2941 aacttcggac acacaacctg accgatctca gccccacct gcggtaccgc ttccagcttc  
3001 aggccaccac caaagagggc cctggtgaag ccatcgtacg ggaaggaggc actatggcct  
3061 tgtctgggat ctcaatcttt ggcaacatct cagccacagc gggtgaaaac tacagtgtcg  
3121 tctcctgggt ccccaaggag ggccagtgca acttcaggtt ccatactttg ttcaaagcct  
3181 tgggagaaga gaaggggtgg gcttcccttt cgccacagta tgtcagctac aaccagagct  
3241 cctacacgca gtgggacctg cagcctgaca ctgactacga gatccacttg ttttaaggaga  
3301 ggatgttccg gcaccaaagt gctgtgaaga ccaatggcac aggccgcgtg aggtccctc  
3361 ctgctggctt cgccactgag ggctggttca tcggctttgt gagtgccatc atctcctgc  
3421 tcctcgtcct gctcatcctc tgcttcatca agcgcagcaa gggcggcaaa tactcagtga  
3481 aggataagga ggacaccag gtggactctg aggcccgacc gatgaaagat gagaccttcg  
3541 gcgagtacag gtccctggag agtgacaacg aggagaaggc ctttggcagc agccagccat  
3601 cgctcaacgg ggacatcaag cccctgggca gtgacgacag cctggccgat tatgggggca  
3661 gcgtggatgt tcagttcaac gaggatggtt cgttcattgg ccagtacagt ggcaagaagg  
3721 agaaggaggc ggcagggggc aatgacagct cagggggccac ttccccatc aaccctgccg  
3781 tggccctaga atagtggagt acggacagga gatgctgtgc cccctggcct tgggatccag  
3841 gcccctccct ctccagcagg cccatgggag gctggagttg gggcagagga gaacttgctg  
3901 cctcggatcc ccttctacc acccgggtccc cactttattg ccaaaacca gctgcacccc  
3961 ttctcgggca cacgctgctc tgcccagct tgggcagatc tcccacatgc caggggcctt  
4021 tgggtgctgt tttgccagcc catttgggca gagaggctgt ggtttggggg agaagaagta  
4081 ggggtggccc gaaaggtctc cgaaatgctg tctttcttgc tccctgactg gggcagaca  
4141 tgggtggggtc tcctcaggac caggggtggc acctcccc tccccagcc accactccag  
4201 cagcctggct gggactggga acagaactcg tgtccccacc atctgctgtc ttttctttgc  
4261 catctctgct ccaaccggga tggcagccgg gcaactggc cgcgggggca ggggaggcca  
4321 tctggagagc ccagagtccc cccactcca gcacgcact ctggcagcac cgctcttcc  
4381 cgccgcccag cccaccccat ggccggcttt caggagctcc atacacagc tgcttcggt  
4441 acccaccaca caacatccaa gtggcctccg tcactacctg gctgcggggc gggcacact  
4501 cctcccactg cccactggcc ggc

**B) Aminosäuresequenz von humanem L1**

Translation: MVVALRYVWPLLLCSPCLLIQIPEEYEGHHVMEPPVITEQSPRR  
LVVFPTDDISLKCEASGKPEVQFRWTRDGVHFKPKEELGVTVYQSPHSGSFTITGNNS  
NFAQRFQGIYRCFASNKLG TAMSHEIRLMAEGAPKWPKETVKPVEVEEGESVVLPCNP  
PPSAEPLRIYWMNSKILHIKQDERVTMGQNGNLYFANVLTSDNHSDYICHAHFPGTRT  
IIQKEPIDLRVKATNSMIDRKPRLLFPTNSSSHLVALQGQPLVLECIAEGFPTPTIKW  
LRPSGMPADRVTYQNHNKTLQLLKVGEEDDGEYRCLAENSLGSARHAYYVTVEAAPY  
WLHKPQSHLYGPGETARLDCQVQGRPQPEVTWRINGIPVEELAKDQKYRIQRGALILS  
NVQPSDTMVTQCEARNRHGLLLANAYIYVVQLPAKILTADNQT YMAVQGSTAYLLCKA  
FGAPVPSVQWLDEDGTTVLQDERFFPYANGTLGIRDLQANDTGRYFCLAANDQNNVTI  
MANLKVKDATQITQGRSTIEKKGSRVTFTCQASFDPSLQPSITWRGDGRDLQELGDS  
DKYFIEDGRLVIHSLDYSQGNYSVASTELDVVESRAQLLVVGSPPGPVRLVLSDLH  
LLTQSQVRVSWSPAEDHNAPIEKYDIEFEDKEMAPEKWYSLGKVPGNQTSTTLKLSPY  
VHYTFRVTAINKYGPGEPSVSETVVTPEAAPEKNPVDVKGEGNETTNMVITWKPLRW  
MDWNAPQVQYRVQWRPQGTRGPWQEQIVSDPFLVVSNTSTFVPEIKVQAVNSQGKGP  
EPQVTIGYSGEDYPQAIPELEGIEILNSSAVLVKWRPVDLAQVKGHLRGYNVTYWREG  
SQRKHSKRHIHKDHVVVPANTTSVILSGLRPYSSYHLEVQAFNGRGS GPASEFTFSTP  
EGVPGHPEALHLECQSNTSLLLRWQPPLSHNGVLTGYVLSYHPLDEGGKGQLSFNLRD  
PELRTHNLTDLSPHLR YRFQLQATTKEGPGEAIVREGGTMALSGISDFGNISATAGEN  
YSVVSWVPKEGQC NFRFHILFKALGEEKGGASLSPQYVSYNQSSYTQWDLQPDTDYEI  
HLFKERMFRHQMAVKTNGTGRVRLPPAGFATEGWFIGFVSAI ILLLLVLLILCFIKRS  
KGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETFGEYRSLES DNEEKAFGSSQPSLNGDIKPLGS  
DDSLADYGGSDVDVQFNEDGSFIGQYSGKKEKEAAGGNDSSGATSPINPAVALE

### C) Karten der verwendeten eukaryotischen Expressionsvektoren

