

**Untersuchungen zu Funktionen definierter
cytosolischer Epitope des neuronalen
Zelladhäsionsmoleküls NCAM**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Tobias Goschzik
aus
Hannover

Bonn, 2009

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Brigitte Schmitz

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 11.12.2009

Erscheinungsjahr: 2009

Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Brigitte Schmitz für die Betreuung meiner Doktorarbeit, den zahlreichen Diskussionen und der Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre danken.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Jörg Höhfeld für die Übernahme des Amtes als Zweitgutachter.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Patricia Maness für die Betreuung meines Forschungsaufenthalts an der University of North Carolina.

Inhaltsverzeichnis

	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
	Abkürzungsverzeichnis	IX
	Verzeichnis der Aminosäuren	XI
Kapitel 1	Einleitung	1
1.1.	Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM	2
1.1.1.	Struktur von NCAM	2
1.1.2.	Vorkommen von NCAM	5
1.1.3.	Interaktionspartner von NCAM	6
1.1.4.	NCAM-induzierte Signaltransduktionen	8
1.2.	Zellmigration	12
1.3.	Neuritenwachstum	15
1.4.	Die Extrazellulärmatrix	17
1.5.	Endocytose und „Shedding“	18
1.6.	Aufgabenstellung der Arbeit	20
Kapitel 2	Material und Methoden	23
2.1.	Material	23
2.1.1.	Chemikalien	23
2.1.2.	Einwegartikel und Arbeitsmaterial	24
2.1.3.	Geräte	24
2.1.4.	Nukleinsäurestandard	24
2.1.5.	Proteinstandard	25
2.1.6.	Vektoren	25
2.1.7.	Antikörper	26
2.1.7.1.	Antikörper-Verdünnungen	27
2.1.8.	Eukaryotische Zelllinien	27
2.1.9.	Bakterienstamm	27
2.1.10.	Lösungen und Puffer	28
2.1.10.1.	Lösungen für die Bakterienkultur	28
2.1.10.2.	Lösungen für die Nukleinsäureanalytik	28
2.1.10.3.	Lösungen für die Proteinanalytik	29
2.1.10.4.	Lösungen für Immunfluoreszenz und Endocytose-Versuch	31
2.1.10.5.	Lösungen für die Zelllyse und Immunpräzipitation	31

2.1.10.6.	Lösungen für „Shedding“-Experimente	32
2.1.10.7.	Lösungen für die Zellkultur	32
2.2.	Methoden	33
2.2.1.	Herstellung der NCAM140/180- Δ ENESKA-Mutanten	33
2.2.2.	Transformation	34
2.2.3.	Präparative Plasmid-Isolierung	34
2.2.4.	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.5.	Zellkultur	35
2.2.6.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
2.2.7.	Transfektion	36
2.2.7.1.	Transiente Transfektion	36
2.2.7.2.	Stabile Transfektion	37
2.2.8.	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	38
2.2.9.	Herstellung von Zelllysaten	38
2.2.10.	Immunpräzipitation	39
2.2.11.	Proteinbestimmung	39
2.2.12.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.13.	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	40
2.2.14.	Western Blot (Semi-Dry-Verfahren)	40
2.2.15.	Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen	41
2.2.16.	Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	41
2.2.17.	Eluierung von Antikörpern von Nitrocellulosemembranen	41
2.2.18.	Untersuchungen zur Endocytose von NCAM	42
2.2.19.	Untersuchungen zum „Shedding“ von NCAM140-eGFP in B35-Zellen	43
2.2.20.	„Shedding“ von NCAM140/180- Δ ENESKA in B35-Zellen	44
2.2.21.	Markierung von B35-Zellen mit DiI	45
2.2.22.	Bestimmung von Neuritenlänge und -anzahl von B35-Zellen	45
2.2.23.	Untersuchungen zur Migration von B35-Zellen	46
2.2.23.1.	Haptotaktische Zellmigrationsversuche	46
2.2.23.2.	Timelapse-Migrationsversuche	47
2.2.24.	Untersuchungen zur Phosphorylierung des Threonins 803 von NCAM140	49
2.2.24.1.	Nachweis von freiem Phosphat mit Biomol Green TM nach Freisetzung aus Phosphoproteinen mit Phosphatase	49

2.2.24.2.	Färbung von Phosphoproteinen mit Pro-Q Diamond™	50
2.2.25.	Statistische Auswertung	50
Kapitel 3	Ergebnisse	52
3.1.	Untersuchungen zur Bedeutung der T803A- und T803D-Mutationen von NCAM140 für Neuritenwachstum und Endocytose	52
3.1.1.	Vergleich des Neuritenwachstums auf COS-7- und L-Zellen	52
3.1.2.	Messung der Neuritenlängen nach Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126	56
3.1.3.	Endocytose von NCAM140-T803A und NCAM140-T803D	58
3.1.4.	Endocytose nach Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126	59
3.1.5.	Endocytose auf L-Zellen	62
3.2.	Untersuchungen zur Phosphorylierung des Threonins 803 von NCAM140	64
3.2.1.	Nachweis von freiem Phosphat mit Biomol Green™ nach Phosphatase-Behandlung	64
3.2.2.	Färbung von Phosphoproteinen mit Pro-Q Diamond™	64
3.3.	Untersuchungen der Bedeutung der Deletion des C-terminalen Hexapeptids ENESKA von NCAM auf Neuritenwachstum und Endocytose	67
3.3.1.	Messung der Neuritenlängen auf PLL	67
3.3.2.	Endocytose von NCAM140-ΔENESKA	71
3.4.	„Shedding“-Experimente	74
3.4.1.	„Shedding“ von NCAM140/180-eGFP	74
3.4.2.	„Shedding“ von NCAM140/180-ΔENESKA	83
3.5.	Untersuchungen der Zellmigration	86
Kapitel 4	Diskussion	98
4.1.	Funktionen des Threonins 803 von NCAM140 bei Endocytose, Neuritenwachstum und Zellmigration	98
4.2.	Migration und Neuritenwachstum der NCAM140/180-WT- und NCAM140/180-Y734F-exprimierenden B35-Zellen	105
4.3.	„Shedding“ von NCAM140/180-eGFP	107
4.4.	Untersuchungen zur Funktion des Hexapeptids ENESKA von NCAM140/180 auf „Shedding“, Endocytose, Neuritenwachstum und Zellmigration	112
Kapitel 5	Zusammenfassung	119

Literaturverzeichnis	121
Anhang	132
Vektorkarten	132
Aminosäuresequenzen von NCAM140 und NCAM180	133
Lebenslauf	134

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1.:	Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM	3
Abb. 1.2.:	NCAM-induzierte Signalwege	10
Abb. 1.3.:	Schematische Darstellung der drei Schritte der Zellmigration	13
Abb. 1.4.:	Hypothetische Beziehung zwischen Rückwärtsfluss, Zellmigrationsgeschwindigkeit und Adhäsionsstärke	15
Abb. 1.5.:	Mechanismen der Phagozytose und Pinocytose	19
Abb. 2.1.:	Schematischer Versuchsablauf der Untersuchungen zum „Shedding“ von NCAM140-eGFP in B35-Zellen	43
Abb. 3.1.:	Fluoreszenzaufnahmen von DiI-markierten NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803T-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von NCAM140-exprimierenden L-Zellen (L140) nach Behandlung mit dbcAMP	53
Abb. 3.2a.:	Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von NCAM140-WT-/-T803A-/-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS-7-/L-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung oder COS140-/L140-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung	55
Abb. 3.2b.:	Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von NCAM140-WT-/-T803A-/-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS-7-/L-Zellen oder COS140-/L140-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung	55
Abb. 3.3.:	Fluoreszenzaufnahmen von DiI-markierten NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen auf einem Monolayer von NCAM140-exprimierenden L-Zellen (L140-Zellen) nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP und Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126	57
Abb. 3.4.:	Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von NCAM140-WT-/-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS140- oder L140-Zellen nach Ausdifferenzieren mit dbcAMP und ohne (Kontrollen) oder mit Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126	58

Abb. 3.5.:	Untersuchungen der Endocytose ohne (A, C, E) oder mit Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 (B, D und F) von NCAM140-WT- (A und B), NCAM140-T803A- (C und D) und NCAM140-T803D- (E und F) exprimierenden B35-Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie	60
Abb. 3.6a.:	Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 und Behandlung mit 100 μ M U0126 auf PLL als Substrat	61
Abb. 3.6b.:	Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803A-transfizierten B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 und Behandlung mit 100 μ M U0126 auf PLL als Substrat	61
Abb. 3.7.:	Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 und Behandlung mit 100 μ M U0126 auf einem Monolayer von L-Zellen	62
Abb. 3.8.:	Pro-Q Diamond TM -Phosphoproteinfärbung der Immunpräzipitate von stabil mit NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- oder NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit dem 123C3-AK oder Kontrollen ohne 123C3; Silberfärbung	65
Abb. 3.9.:	Phasenkontrastaufnahmen von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA-, NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP	68
Abb. 3.10a.:	Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen \pm dbcAMP auf PLL als Substrat	69
Abb. 3.10b.:	Vergleich der durchschnittlichen Neuritenanzahl je Zelle \pm SEM sowie Verzweigungen 2. und 3. Grades von NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen \pm dbcAMP auf PLL als Substrat	69
Abb. 3.11a.:	Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM der NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat	71
Abb. 3.11b.:	Vergleich der durchschnittlichen Neuritenanzahl je Zelle \pm SEM sowie Verzweigungen 2. und 3. Grades von NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat	71
Abb. 3.12.:	Untersuchungen der Endocytose von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie	72
Abb. 3.13.:	Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140-	72

	T803A/ Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 auf PLL	
Abb. 3.14.:	Fluoreszenzaufnahmen von NCAM140-eGFP- und NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen; Kontrollen behandelt mit 25 μ m GM6001, mit 200 μ m Pervanadat oder mit Pervanadat und GM6001	75
Abb. 3.15.:	Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Behandlung mit Pervanadat (Pv) und dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 sowie der durchschnittlichen Kollokalisierung von NCAM140-eGFP und Lysosomen je Zelle \pm SEM	76
Abb. 3.16.:	Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Behandlung mit Pervanadat und dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 sowie der durchschnittlichen Kollokalisierung von NCAM180-eGFP und Lysosomen je Zelle \pm SEM	76
Abb. 3.17.:	Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-eGFP- und NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Behandlung mit Pervanadat und dem MEK-Inhibitor U0126 auf PLL als Substrat	78
Abb. 3.18a.:	„Shedding“-Untersuchungen von NCAM140-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Pervanadat-Behandlung bzw. Kontrollen in serumfreiem Medium mittels konfokaler Lasermikroskopie	80
Abb. 3.18b.:	„Shedding“-Untersuchungen von NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Pervanadat-Behandlung bzw. Kontrollen in serumfreiem Medium mittels konfokaler Lasermikroskopie	80
Abb. 3.19.:	„Shedding“-Untersuchungen von stabil mit NCAM140-WT transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Pervanadat-Behandlung bzw. Kontrollen in serumfreiem Medium mittels konfokaler Lasermikroskopie	81
Abb. 3.20.:	Western Blot Analyse der Lysate von transient mit NCAM140/180-WT- oder NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen nach 60-minütiger Behandlung mit Pervanadat oder Inkubation in serumfreiem Medium sowie von transient mit leerem pcDNA3-Vektor transfizierten B35-Zellen	84
Abb. 3.21.:	Western Blot Analyse der konzentrierten Medienüberstände von transient mit NCAM140/180-WT oder NCAM140/180- Δ ENESKA transfizierten B35-Zellen nach 60-minütiger Behandlung mit Pervanadat (+) oder Inkubation in serumfreiem Medium (-) sowie von transient mit leerem pcDNA3-Vektor transfizierten B35-Zellen	85
Abb. 3.22.:	Haptotaktische Migrationsversuche von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140- Δ ENESKA/T803A-transfizierten B35-Zellen auf mit Fibronectin oder einem ECM-Gemisch beschichteten Transwell-Kammern	86
Abb. 3.23.:	Haptotaktische Migrationsversuche von NCAM140/180-WT- und NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen auf mit Laminin	87

beschichteten Transwell-Kammern

Abb. 3.24a.:	Timelapse-Aufnahmen von NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen auf PLL	89
Abb. 3.24b.:	Timelapse-Aufnahmen von NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen auf Laminin	89
Abb. 3.25.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT-exprimierenden B35-Zellen und parentalen B35-Zellen (B35-par) auf PLL	90
Abb. 3.26.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf PLL und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen	91
Abb. 3.27.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf PLL und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen	92
Abb. 3.28.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-Y734F-exprimierenden B35-Zellen auf PLL und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen	92
Abb. 3.29.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen auf PLL und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen	93
Abb. 3.30.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM180-WT- und NCAM180-Y734F-exprimierenden B35-Zellen auf PLL und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen	94
Abb. 3.31a.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 5 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen	95
Abb. 3.31b.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen	95
Abb. 3.32a.:	Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 5 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen und parentalen B35-Zellen (B35-par) auf PLL und Laminin	96
Abb. 3.32b.:	Timelapse-Untersuchungen in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen und parentalen B35-Zellen (B35-par) auf PLL und Laminin	96

Tabelle 2.1.:	Transfektion mit Lipofectamin Plus™	37
Tabelle 2.2.:	Transfektion mit Lipofectamin™ 2000	37
Tabelle 2.3.:	Zusammensetzung der Gel-Lösungen für die SDS-PAGE	40
Tabelle 2.4.:	Beschichtung der Transwell-Kammern für haptotaktische Zellmigrationsversuche	46
Tabelle 2.5.:	Beschichtungen der 24-Well-Platten für Timelapse-Migrationsversuche	48
Tabelle 3.1.:	Übersicht der durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM nach Behandlung mit dbcAMP oder Kontrollen mit entsprechender Menge DMSO von NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf PLL als Substrat	53
Tabelle 3.2.:	Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM nach Behandlung mit dbcAMP oder nur mit der entsprechenden Menge DMSO (Kontrollen) von NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS-7-/L-Zellen und COS140/L140-Zellen	56
Tabelle 3.3.:	Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP und Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 oder nur mit der entsprechenden Menge DMSO (Kontrollen) von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS140- oder L140-Zellen	58
Tabelle 3.4.:	Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM von NCAM140-WT-, NCAM140-ΔENESKA- und NCAM140-T803A/ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat	70
Tabelle 3.5.:	Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM von NCAM180-WT-, NCAM180-ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) und mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat	70
Tabelle 3.6.:	Übersicht der durchschnittlichen Vesikelanzahl ± SEM von NCAM140-eGFP- und NCAM180-eGFP-exprimierenden B35-Zellen nach Behandlung mit Pervanadat und dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 auf Fibronektin als Substrat	77
Tabelle 3.7.:	Übersicht der durchschnittlichen Vesikelanzahl ± SEM von NCAM140-eGFP- und NCAM180-eGFP-exprimierenden B35-Zellen nach Behandlung mit Pervanadat und dem MEK-Inhibitor U0126 auf PLL als Substrat	78

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AK	Antikörper
apCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül von Aplysia
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua demin.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAM	cell adhesion molecule
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent kinase
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CHD	CAM-homologe Domäne
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CREB	cAMP response-element binding protein
C-terminal	Carboxy-terminal
Cy2	Carbocyanin
Cy3	Indocarbocyanin
d. h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
dbcAMP	dibutyryl-cAMP
DMEM-H	Dulbecco`s Modified Eagle Medium (high glucose)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
DTAF	Fluorescein Dichlorotriazine
ECM	Extrazellulärmatrix
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Dinatriumsalz-2-hydrat der Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitril)-tetraessigsäure
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
evtl.	eventuell
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fötales Kälberserum
FGFR	fibroblast growth factor receptor, Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor

FN	Fibronectin
g	Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
GAP-43	growth associated protein-43
GDNF	glial derived neurotrophic factor
ggbf.	gegebenenfalls
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBSS ⁻	Hank`s Balanced Salt Solution ohne Calcium- und Magnesiumionen
Ig	Immunglobulin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
Kbp	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
L	Liter
LANP	leucine-rich acidic nuclear protein
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molar
mA	Milliampère
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP-Kinase-Kinase
mg	Milligramm
mL	Milliliter
MLCK	myosin light-chain kinase
mm	Millimeter
mM	millimolar
MTOC	microtubule-organizing center
NCAM	neural cell adhesion molecule
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP _{2/3}	Phosphatidylinositol-bis/-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-Lysin
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PSA	polysialic acid
Pv	Pervanadat
RMS	rostral migratory stream
RT	Raumtemperatur
s.	siehe

SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit Tween 20
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
üN	über Nacht
usw.	und so weiter
V	Volt
v/v	volume/volume
VASE	variable domain alternatively spliced exon
w/v	weight/volume
WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
°C	Grad Celsius

Verzeichnis der Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
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

Kapitel 1

Einleitung

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM wurde erstmals 1974 von Jorgensen und Bock beschrieben. Es war das erste Zelladhäsionsmolekül, welches proteinchemisch vollständig charakterisiert wurde (Hoffmann et al., 1982), und heute ist es eines der am besten untersuchten Adhäsionsmoleküle. NCAM wird eine zentrale Rolle bei der embryonalen Entwicklung des Nervensystems sowie seiner Regeneration und der synaptischen Plastizität, die im adulten Gehirn mit Lernen und Gedächtniskonsolidierung assoziiert ist, zugeschrieben. Damit eine Nervenzelle von ihrem Entstehungsort zu ihrem Zielort wandern kann bzw. diesen überhaupt findet, muss die Zelle die dazu notwendigen Informationen von der sie umgebenden Extrazellulärmatrix (ECM) oder von benachbarten Zellen erhalten. Mit Hilfe ihrer extrazellulären Domänen können NCAM und andere Adhäsionsmoleküle oder Zelloberflächenrezeptoren mit der Matrix und benachbarten Zellen interagieren und Informationen über den Umgebungszustand ins Zellinnere weiterleiten. Mittels verschiedener Signaltransduktionskaskaden erfolgt die Informationsweitergabe an den Zellkern oder andere subzelluläre Kompartimente, so dass die Zelle im Folgenden auf den Umgebungszustand reagieren kann, indem sie z. B. die Migration der Zelle in eine bestimmte Richtung veranlasst oder den Wachstumskegel des Axons zur Ausbildung eines synaptischen Kontaktes zu einem Dendriten leitet.

Für diese Aufgaben benötigen Zelladhäsionsmoleküle sowohl im intrazellulären als auch im extrazellulären Bereich Domänen für die hetero- oder homophile Bindung anderer Moleküle. Für NCAM wurden im extrazellulären Bereich diverse solcher Domänen charakterisiert und deren Bindungspartner identifiziert. Hingegen sind erst in den letzten Jahren vermehrt Informationen über intrazelluläre Bindungspartner bekannt geworden.

Des weiteren enthält der intrazelluläre Bereich von NCAM diverse potentielle Phosphorylierungsstellen, deren Funktionen aber noch weitestgehend ungeklärt sind. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente durchgeführt, in denen die Funktionen definierter intrazellulärer Epitope von NCAM, nämlich einer potentiellen Phosphorylierungsstelle sowie des cytosolischen C-terminalen Hexapeptids ENESKA, untersucht werden sollten.

1.1. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

NCAM ist ein Zelloberflächenglykoprotein, welches hauptsächlich von Zellen des Nervensystems exprimiert wird. Aufgrund seiner ca. 70-100 Aminosäuren umfassenden fünf Immunglobulin- (Ig-) ähnlichen Domänen im extrazellulären Bereich gehört es zu der Ig-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle. Die mehr als 100 Mitglieder dieser Familie, zu der unter anderem auch das Adhäsionsmolekül L1 oder der Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR) gehören, vermitteln Ca^{2+} -unabhängige Zelladhäsion.

1.1.1. Struktur von NCAM

NCAM wird von einem singulären Gen kodiert, welches sich auf Chromosom 11 befindet. Es umfasst mehr als 85 Kilobasen und enthält mindestens 26 Exons (Colwell et al., 1992). Durch alternatives Spleißen entstehen die drei Hauptisoformen (s. Abb. 1.1.). So enthält Exon 15 ein Stoppcodon, wodurch NCAM120 entsteht. Diese kürzeste der drei Hauptisoformen besitzt keine cytosolische Domäne, ist aber über einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker mit der Membran verbunden. Das Spleißen von Exon 15 führt zur Expression der beiden Transmembranvarianten NCAM140 und NCAM180, die sich durch verschieden lange cytosolische Domänen unterscheiden. So enthält NCAM180 ein 261 Aminosäuren langes Insert, welches von Exon 18 kodiert wird. Die Bezeichnungen NCAM120, -140 und -180 wurden aufgrund ihrer apparenten Molekulargewichte in Kilodalton (kDa) gewählt.

Die extrazelluläre Domäne, die bei allen drei Formen identisch ist, enthält fünf Ig-ähnliche Domänen. Verschiedene Arten von Ig-Domänen werden auf Grund ihrer Homologie mit den variablen oder konstanten Ig-Domänen der Immunglobuline unterschieden und in die Typen V, C1 und C2 sowie I (Intermediate) eingeteilt (Williams und Barclay, 1988; Vaughn und Bjorkman, 1996). NCAM enthält ausschließlich Domänen vom Typ C2. Eine solche Domäne bildet zwei β -Faltblattstrukturen, die einen hydrophoben Kern einschließen und außerdem zwei charakteristische Cysteinreste im Abstand von 55-75 Aminosäuren enthalten, die über eine Disulfidbrücke die Struktur stabilisieren (Williams et al., 1989). Zwischen den Ig-

ähnlichen Domänen und der einzelnen Transmembranhelix bzw. dem GPI-Anker (NCAM120) befinden sich außerdem zwei Fibronektin Typ III- (FNIII-) Domänen. Auch diese Domänen kommen bei den meisten Mitgliedern der Ig-Superfamilie vor und bestehen aus ca. 90 Aminosäuren (Main et al., 1992). Die Sequenzen dieser Fibronektin Typ III-Domänen ähneln denen der Ig-Domänen vom Typ C2, werden jedoch nicht über Disulfidbrücken stabilisiert (Brümmendorf und Rathjen, 1993).

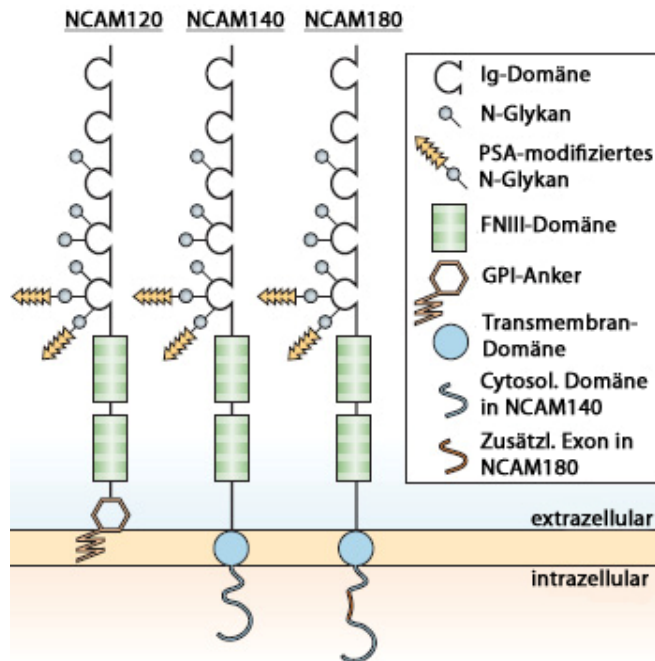


Abb. 1.1.: Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM
(Kleene und Schachner, 2004)

Durch alternative, seltenere Spleißvorgänge entstehen weitere 18 Isoformen, die gewebespezifisch und/oder abhängig vom Entwicklungsstadium sowie dem Zelltyp exprimiert werden (Santoni et al., 1989; Jørgensen, 1995). So kann z.B. optional innerhalb der vierten Ig-Domäne das 30 Basenpaare (bp) umfassende VASE-Exon (variable domain alternatively spliced exon) exprimiert werden (s. auch Kapitel 1.1.2.). Dadurch ändert sich die vierte Ig-Domäne von einem C2-Typ zu einem variablen V-Typ (Small und Akeson, 1990).

Eine weitere seltene Variante ist eine sezernierte Form von NCAM, welche ein apparentes Molekulargewicht von 110-115 kDa aufweist und im Gehirn sowie im Skelettmuskel identifiziert wurde (Gower et al., 1988).

Des Weiteren werden die NCAM-Isoformen posttranslational modifiziert. So kann NCAM z. B. mit dem Kohlenhydrat-Epitop HNK-1 (Schachner und Martini, 1995) oder Polysialinsäure (PSA) glykosyliert werden. PSA, ein Homopolymer aus α -2,8-verknüpfte Sialinsäure, wird mittels zweier PSA-Transferasen an N-Glykane der fünften Ig-Domäne gebunden (Nelson et al., 1995; Rutishauser und Landmesser, 1996). In NCAM Knock-out-

Mäusen ist PSA um 85 % reduziert (Cremer et al., 1994), so dass davon ausgegangen werden kann, dass PSA nahezu ausschließlich auf NCAM zu finden ist, da die verbliebenen 15 % hauptsächlich auf die Autopolysialylierung der Transferasen selbst zurückzuführen ist.

Weitere posttranslationale Modifikationen von NCAM sind Palmitoylierungen (Little et al., 1998) oder Phosphorylierungen. Obwohl Mackie et al. bereits 1989 herausgefunden hatten, dass die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3) und die Caseinkinase-1 (CK-1) Serin- und Threoninreste in der cytosolischen Domäne von NCAM phosphorylieren können, ist bislang wenig darüber bekannt, welche Aminosäuren tatsächlich phosphoryliert werden. Allerdings konnten Diestel et al. (2004) zeigen, dass der einzige Tyrosinrest innerhalb der cytosolischen Domäne von NCAM180 phosphoryliert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NCAM in PC12-Zellen während neuronaler Differenzierung phosphoryliert werden kann und dass die Proteinkinase C (PKC) dabei eine Rolle spielt. Außerdem ist NCAM ein Substrat für die Proteinphosphatase 1 (Matthias und Horstkorte, 2006).

Ebenfalls wurde von Diestel et al. 2007 herausgefunden, dass NCAM in der Plasmamembran mono-ubiquitiniert werden kann. Welcher oder welche Lysin-Reste in der cytosolischen Domäne ubiquitiniert werden können und welche Ubiquitin-Ligase daran beteiligt ist, konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

PEST-Sequenzen und PDZ-Bindungsmotiv

In der cytosolischen Domäne befindet/n sich eine (NCAM140) bzw. zwei (NCAM180) PEST-Sequenz/en (s. Anhang). Diese Polypeptidsequenzen, die besonders reich an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind, sollen Signale für eine rapide, intrazelluläre Proteolyse darstellen (Rogers et al., 1986). Für die PEST-Sequenz von NCAM140 konnte mit Hilfe des Computerprogramms PESTfind ein hoher PEST-Indexwert von 20,1 ermittelt werden. Bei NCAM180 wird diese Sequenz durch das Einfügen des 261 Aminosäuren umfassenden Inserts unterbrochen und verändert, so dass eine neue, unterschiedliche PEST-Sequenz entsteht, die einen etwas niedrigeren PEST-Indexwert von 14,85 aufweist. Auch die andere PEST-Sequenz innerhalb des NCAM180-Inserts weist mit 8,44 ebenfalls einen Wert auf, der deutlich geringer ist als der der PEST-Sequenz von NCAM140.

Für apCAM, das NCAM-Homolog in *Aplysia*, konnte gezeigt werden, dass ein Threonin innerhalb einer PEST-Sequenz von der MAP-Kinase phosphoryliert werden kann (Bailey et al., 1997; Michael et al., 1998) und dass dies eine Voraussetzung für die Endocytose von apCAM darstellt (s. auch Kapitel 1.5.).

Sowohl bei NCAM140 als auch bei NCAM180 findet sich am extremen C-Terminus ein PDZ-Bindemotiv (ESKA), welches hoch konserviert bei NCAM-Homologen von diversen

Spezies zu finden ist. Die Aminosäuren -X-[S/T]-X-[V/A] (X steht dabei für eine beliebige Aminosäure) repräsentieren ein Klasse I PDZ-Bindemotiv (Polo-Parada et al., 2005). Das Serin/Threonin (NCAM hat an dieser Position einen Serinrest) innerhalb dieses Bereiches stellt darüber hinaus eine potentielle Phosphorylierungsstelle dar.

Solche PDZ-Bindemotive können von Proteinen erkannt und gebunden werden, die PDZ-Domänen enthalten und auf diese Weise spezifische Proteine in großen molekularen Komplexen („Scaffolds“) an definierten Orten innerhalb einer Zelle versammeln (Kim und Sheng, 2004; Feng und Zhang, 2009). Solche Proteine sind z. B. die neuronale MAGUK („membrane-associated guanylate kinase“) PSD-95, das „Septate junction“-Protein Discs large aus *Drosophila melanogaster* oder das „Tight junction“-Protein Zonula occludentes-1. Die Anfangsbuchstaben dieser drei Proteine haben dieser Domäne ihren Namen gegeben.

Bislang ist jedoch nichts darüber bekannt, ob NCAM tatsächlich über dieses PDZ-Bindemotiv von anderen Proteinen, die eine PDZ-Domäne enthalten, erkannt und in „Scaffolds“ gebunden wird.

1.1.2. Vorkommen von NCAM

Außer im Nervensystem, in dem NCAM besonders stark und sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen exprimiert wird, wurde NCAM auch auf Skelettmuskelzellen (Rutishauser et al., 1983), embryonalen Endothelzellen (Thiery et al., 1982), natürlichen Killerzellen (Lanier et al., 1991) oder Zellen des Pankreas (Naito et al., 2006) gefunden.

Die Expression von NCAM im Nervensystem beginnt bereits im frühen Stadium der Embryonalentwicklung und wird bis ins Erwachsenenalter von Neuronen und Gliazellen fortgeführt. Während NCAM180 jedoch nur von Neuronen, NCAM120 hingegen nur von Gliazellen exprimiert wird, ist NCAM140 auf beiden Zelltypen zu finden (Noble et al., 1985). NCAM140 wird vorwiegend von sich entwickelnden Neuronen gebildet und ist dort in den Dendriten und Axonen sowie deren Wachstumskegeln zu finden. NCAM180 hingegen wird vor allem von ausdifferenzierten Neuronen exprimiert und akkumuliert an Stellen stabiler Zell-Zell-Kontakte sowie im postsynaptischen Bereich von Synapsen. Der Kontakt mit anderen Zellen führt zur Herunterregulierung von NCAM140 und zur Heraufregulierung von NCAM180 (Pollerberg et al., 1985; 1986; 1987).

Das in Kapitel 1.1.1. erwähnte VASE-Exon wird während der embryonalen und frühpostnatalen Entwicklungsphase gar nicht exprimiert. Im adulten Organismus lässt sich jedoch, mit Ausnahme von Arealen mit hoher Plastizität wie dem olfaktorischen Trakt, dessen Neuronen sich durch lebenslange Regenerationsfähigkeit auszeichnen, eine starke Zunahme

der Expression beobachten (Small et al., 1988; Walsh et al., 1992). Reziprok dazu wird PSA-NCAM vor allem in der frühen Entwicklungsphase stark exprimiert. Im adulten Gehirn ist es hingegen lediglich noch im olfaktorischen Trakt oder dem Hippocampus zu finden, also in Regionen, die einen hohen Grad an Plastizität behalten (Seki und Arai, 1993). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Abnahme von PSA-NCAM sowie die zunehmende Expression des VASE-Exons im Laufe der Entwicklung des Nervensystems NCAM derart verändert, dass es von einem plastizitätsfördernden zu einem stabilitätsfördernden Molekül wird (Rutishauser und Landmesser, 1996; Rønn et al., 2000).

NCAM120 ist wie andere GPI-verankerte Proteine in den „lipid rafts“ zu finden. Diese Membrankompartimente, die auch DRM's („detergent-resistant microdomains“) genannt werden, zeichnen sich durch hohe Konzentrationen an Cholesterol und Sphingolipiden aus. NCAM140 und NCAM180 sind hingegen sowohl außerhalb als auch innerhalb der „lipid rafts“ zu finden. Voraussetzung für die „lipid raft“-Lokalisierung ist allerdings anscheinend die Palmitoylierung von vier nahe der Transmembrandomäne lokalisierten Cysteinresten (Niethammer et al., 2002).

1.1.3. Interaktionspartner von NCAM

NCAM besitzt sowohl homophile als auch heterophile Bindungseigenschaften. Die homophile NCAM-NCAM-Bindung kann dabei mit Molekülen auf benachbarten Zellen (*trans*-Interaktion) als auch zwischen NCAM-Molekülen auf derselben Zelloberfläche (*cis*-Interaktion) stattfinden. Nachdem in den letzten Jahren verschiedene Modelle dieser homophilen Bindungen vorgeschlagen wurden, finden diese nach dem momentanen Stand der Forschung derart statt, dass bei einer *cis*-Interaktion zwei parallel angeordnete NCAM-Moleküle über die jeweils ersten beiden N-terminalen Ig-Domänen (Ig1 und Ig2) verknüpft werden. Bei einer *trans*-Interaktion kann es entweder zu einer antiparallelen Verknüpfung zwischen den Ig2- und Ig3-Domänen zweier gegenüberliegender NCAM-Moleküle („flat-zipper“) oder einer Verknüpfung zwischen den Ig1- mit den Ig3-Domänen sowie den beiden Ig2-Domänen („compact-zipper“) kommen (Kiselyov et al., 2005). Im Falle einer Polysialylierung soll allerdings die homophile Bindung von NCAM vermindert sein, da die PSA-Ketten ein relativ großes Volumen einnehmen, so dass die enge NCAM-NCAM-Interaktion nicht mehr möglich sein kann (Sadoul et al., 1983; Yang et al., 1992). Die Expression des VASE-Exons, obwohl innerhalb der vierten Ig-Domäne lokalisiert, führt hingegen zu einer stärkeren homophilen Affinität der betroffenen Zellen (Chen et al., 1994).

NCAM kann darüber hinaus sowohl extra- als auch intrazellulär heterophile Bindungen eingehen. Extrazelluläre Bindungspartner sind unter anderem der Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor (FGFR), der „glial derived neurotrophic factor“ (GDNF) oder das Zelladhäsionsmolekül L1. Die Bindung an den FGFR erfolgt dabei über die beiden FNIII-Domänen von NCAM mit der Ig2- und Ig3-Domäne des FGFR, die Bindung an L1 über die Ig4-Domäne an oligomannosidische Kohlenhydrate, die von L1 exprimiert werden (Kiselyov et al., 2003; Horstkorte et al., 1993). PSA-NCAM ist darüber hinaus involviert in die Regulierung der Effekte des „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) und des „platelet-derived growth factor“ (PDGF) (Vutskits et al., 2001; Zhang et al., 2004). Auch ATP ist ein direkter Bindungspartner von NCAM und es konnte gezeigt werden, dass NCAM über eine ecto-ATPase-Aktivität verfügt (Dzhandzhugazyan und Bock, 1993; 1997; Skladchikova et al., 1999). Des Weiteren kann NCAM an Bestandteile der ECM wie Kollagene (Probstmeier et al., 1989), Heparansulfat (Burg et al., 1995), Chondroitinsulfatproteoglykane (z. B. Phosphacan und Neurocan) (Margolis et al., 1996) oder Agrin (Storms und Rutishauser, 1998) binden. Außerdem konnten auch Bindungen von NCAM an das Prion-Protein gezeigt werden, welches anscheinend an der Lokalisation von NCAM in den „lipid rafts“ beteiligt ist (Santuccione et al., 2005).

Über intrazelluläre Bindungspartner von NCAM140/180 war lange Zeit relativ wenig bekannt. In den letzten Jahren konnten jedoch diverse Proteine identifiziert werden, die an beide Transmembranformen oder auch nur an NCAM140 oder NCAM180 binden.

Ein intrazellulärer Bindungspartner von NCAM140 ist die zur Src-Familie gehörende Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase p59^{fyn} (Beggs et al., 1997). Allerdings könnte zur Aktivierung von p59^{fyn} auch ein drittes Protein notwendig sein, welches einen Komplex mit NCAM140 und p59^{fyn} bildet. In den letzten Jahren wurde die Rezeptor-Protein Tyrosinphosphatase α (RPTP α) als möglicher Kandidat eines Linkerproteins und Aktivators von p59^{fyn} ermittelt.

Ein weiterer Bindungspartner ist das Cytoskelettprotein Spektrin. Es zeigt eine besonders hohe Affinität zu NCAM180 (Pollerberg et al., 1986; 1987), aber auch eine schwache Interaktion mit NCAM140 konnte festgestellt werden (Leshchyn'ska et al., 2003). Trotz des Fehlens der intrazellulären Domäne konnte sogar eine Co-Immunpräzipitation mit NCAM120 nachgewiesen werden. Vermutlich liegt in diesem Fall keine direkte Interaktion vor; ein heterodimerer Komplex mit einer der Transmembranformen von NCAM ist denkbar (Leshchyn'ska et al., 2003).

Sowohl NCAM140 als auch NCAM180 können außerdem mit α - und β -Tubulin, den Hauptkomponenten der Mikrotubuli, sowie weiteren Bestandteilen des Cytoskeletts wie

α -Actinin oder dem Mikrotubuli-assoziierten Protein MAP1A (nur NCAM180) interagieren (Büttner et al., 2003). Außerdem konnte die gleiche Arbeitsgruppe weitere Bindungspartner wie das „leucine-rich acidic nuclear protein“ LANP, Syndapin oder die Serin-/Threoninphosphatase PP1 für NCAM140 und NCAM180 identifizieren (Büttner et al., 2005).

Beide Transmembranformen von NCAM können darüber hinaus an Clathrin und AP-2 binden und dadurch in einem Clathrin-abhängigen Weg endocytisiert werden (Minana et al., 2001). Aber auch eine Co-Immünpräzipitation mit Caveolin konnte gezeigt werden (He und Meiri, 2002) (s. auch Kapitel 1.5.).

Da NCAM keine bekannten intrazellulären katalytischen Aktivitäten besitzt, die Signalkaskaden auslösen könnten, aktiviert NCAM diese Signalwege über die beschriebenen extra- und intrazellulären Bindungspartner. Die Signaltransduktionsprozesse über den FGFR sowie über p59^{fyn} werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

1.1.4. NCAM-induzierte Signaltransduktionen

NCAM hat entgegen früherer Vorstellungen nicht nur die Fähigkeit, Zelladhäsion zu vermitteln, sondern kann durch die zuvor beschriebenen homo- und heterophilen Interaktionspartner ein komplexes Netzwerk intrazellulärer Signalkaskaden aktivieren. Diese Kaskaden leiten die NCAM-vermittelten Signale in die Zelle, die daraufhin entsprechend z. B. mit gerichteter Migration, neuronaler Differenzierung oder Proliferation reagieren kann. Die am besten untersuchte Reaktion von Nervenzellen auf NCAM-vermittelte Signale ist jedoch das Neuritenwachstum¹. Hierbei wurden durch eine Vielzahl von Studien Signaltransduktionswege charakterisiert, welche im Folgenden vorgestellt werden.

FGFR-abhängiger Weg

Die Bindung eines Liganden an NCAM, speziell eine homophile NCAM-NCAM-*trans*-Interaktion, führt zu einer direkten Interaktion von NCAM mit dem FGFR (Kiselyov et al., 2003; 2005). Auf diese Bindung folgt eine Dimerisierung des FGFR, die wiederum eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten in der cytosolischen Domäne der FGFR-Moleküle bewirkt und die unabhängig von der Bindung des Liganden FGF erfolgt. Wie in Abb. 1.2. zu sehen ist, führt diese Aktivierung des FGFR zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) durch die Phospholipase C γ - (PLC γ -) induzierte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) (Saffell et al., 1997). Aus DAG wird anschließend Arachidonsäure (AA) freigesetzt, welche vermutlich spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle öffnet und so für einen Ca²⁺-Einstrom in

¹ In dieser Arbeit wird Neurit als Oberbegriff für Dendriten und Axone verwendet, da in Zellkulturen zumeist nicht zwischen diesen unterschieden werden kann.

die Zelle sorgt (Kiryushko et al., 2006). Darüber hinaus sind die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und das Einströmen von Ca^{2+} durch nichtselektive Kationenkanäle an der NCAM-vermittelten Zunahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration beteiligt (Rønn et al., 2002; Kiryushko et al., 2006). Das Neuritenwachstum wird im Folgenden über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren stimuliert. Impey et al. haben 1998 gezeigt, dass die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über cAMP und die Proteinkinase A (PKA) zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „cAMP response element-binding protein“ (CREB) und c-Fos führt (s. auch Jessen et al., 2001). Auch die NCAM-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B ist auf eine PLC γ -abhängige Ca^{2+} -Erhöhung und die anschließende Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Kinase II (CaMKII) zurückzuführen (Krushel et al., 1999; Choi et al., 2001).

Des Weiteren kann auch die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) durch cGMP zu einem NCAM-induzierten Neuritenwachstum führen, was vermutlich ebenfalls über CREB geschieht (Ditlevsen et al., 2007). cGMP wiederum wird durch die Guanylatzyklase nach Stimulierung von Stickstoffmonoxid (NO) gebildet. Da freies Ca^{2+} ein wichtiger Regulator der NO-Synthase im Nervensystem ist (Knowles et al., 1989), wird vermutet, dass Ca^{2+} die Verbindung zwischen NCAM und der NO-Synthase darstellt. Auch der MAP-Kinase-Signalweg ist über eine NCAM-induzierte Aktivierung des FGFR am Neuritenwachstum beteiligt. Dieser Weg über das GTP-Bindungsprotein Ras, die Serin/Threoninkinasen Raf und MAP-Kinase-Kinase (MEK) sowie die MAP-Kinase ERK führt wie die schon zuvor beschriebenen Kaskaden zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (Schmid et al., 1999). Nach derzeitigem Stand der Forschung scheinen die Adapterproteine Frs2, Grb2 und ShcA an dem NCAM-induzierten Neuritenwachstum beteiligt zu sein, indem sie eine Verbindung zwischen der NCAM-vermittelten FGFR-Aktivierung und dem Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg herstellen (Hinsby et al., 2004).

FGFR-unabhängiger Weg

Dieser Weg, der die Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase p59^{fyn} und die Fokale Adhäsionskinase (FAK) einschließt, kann wie der zuvor beschriebene FGFR-abhängige Weg den MAP-Kinase-Signalweg aktivieren und so zu NCAM-induziertem Neuritenwachstum führen (s. Abb. 1.2.) (Schmid et al., 1999). Der Komplex von NCAM140, p59^{fyn} und FAK sowie RPTP α (s. Kapitel 1.1.3.) wird dabei vermutlich durch Spektrin stabilisiert, wodurch dieser Komplex gleichzeitig zu den „lipid rafts“ geleitet wird (Bodrikov et al., 2005). Außerdem scheint die NCAM180-Spektrin-Assoziation wichtig für die Organisation von Signal-Komplexen in „lipid rafts“ in der gesamten neuronalen Membran sowie in den postsynaptischen Bereichen

Domäne von NCAM verbunden werden kann und dadurch zu den „lipid rafts“ geleitet wird (Leshchyns'ka et al., 2003).

Neben den zwei genannten Signalkaskaden, die nach NCAM-Aktivierung zum Neuritenwachstum führen, konnten Studien auch die Beteiligung von GAP-43 und des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweges zeigen.

GAP-43 wird stark in Neuronen des sich entwickelnden Nervensystems exprimiert, in denen es vor allem in „lipid rafts“ der Wachstumskegel zu finden ist (He und Meiri, 2002). Es bindet und modifiziert Aktin, wodurch es an der cytoskelettalen Dynamik, die für die Bewegung der Wachstumskegel verantwortlich ist, beteiligt ist (s. auch Kapitel 1.3.). Eine NCAM-Aktivierung führt zu einer Steigerung der Phosphorylierung von GAP-43 durch die Caseinkinase II (CKII) oder die PKC, was wiederum mit NCAM-induziertem Neuritenwachstum korreliert (Meiri et al., 1998). Korshunova et al. (2007) haben vorgeschlagen, dass GAP-43 als ein Schalter zwischen NCAM140- und NCAM180-induzierten Signalen fungiert. Dabei soll in der Gegenwart von GAP-43 das NCAM-induzierte Neuritenwachstum hauptsächlich von NCAM180 abhängen, wohingegen in Abwesenheit von GAP-43 NCAM140 dafür verantwortlich sein soll.

Die Unterschiede in der Aktivierung der Signalkomplexe durch NCAM140 oder NCAM180 scheinen somit zumindest zum Teil durch Unterschiede in den Assoziationen mit GAP-43, aber auch mit p59^{fyn} oder Spektrin sowie den unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb oder außerhalb der „lipid rafts“ bedingt zu sein.

Die Beteiligung von PI3K und der Serin/Threoninkinase Akt an NCAM-induziertem Neuritenwachstum konnte zuerst 2003 von Ditlevsen et al. gezeigt werden. Über welchen Mechanismus NCAM diesen Weg aktiviert, ist noch nicht bekannt. Verschiedene Möglichkeiten sind in Abb. 1.2. dargestellt.

Für die Aktivierung der NCAM-induzierten Signalkaskaden spielen auch die in den Kapiteln 1.1.1. und 1.1.2. beschriebenen posttranslationalen Modifikationen mit PSA oder die alternative Spleißvariante des VASE-Exons eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Neuronen, die NCAM mit dem VASE-Exon exprimieren trotz der zuvor erwähnten stärkeren homophilen Affinität eine geringere Steigerung des Neuritenwachstums aufweisen als Zellen, die NCAM ohne VASE exprimieren (Walsh et al., 1992). Im Gegensatz dazu wird angenommen, dass das Vorhandensein von PSA auf NCAM, welches die homophilen Interaktionen abschwächt und die Entstehung von eindimensionalen „flat zippern“ fördern

soll (s. Kapitel 1.1.3.), eine NCAM-induzierte FGFR-Aktivierung und somit das Neuritenwachstum begünstigt (Kiselyov et al., 2005).

1.2. Zellmigration

Zellmigration findet vorwiegend während der Embryonalentwicklung statt, damit Zellen von ihrem Entstehungsort zu ihren verschiedenen Bestimmungsorten gelangen können. Während der Entwicklung des Nervensystems wandern z. B. neuronale Vorläuferzellen von der inneren Seite des Neuralrohres zu ihren finalen Bestimmungsorten, wo sie anschließend ausdifferenzieren.

Aber auch im adulten Organismus findet z. B. bei der Erneuerung von Haut- oder Darmepithelzellen sowie der Gewebereparatur Zellmigration statt. Bei Immunreaktionen oder pathologischen Prozessen wie der Metastasierung von Krebszellen ist ebenfalls eine Migration der beteiligten Zellen zu beobachten. Auch im Nervensystem findet im adulten Organismus noch Zellmigration statt. So entstehen in der subventrikulären Zone des Gehirns das ganze Leben neuronale Vorläuferzellen, die anschließend entlang des „rostral migratory stream“ (RMS) zum Riechkolben („olfactory bulb“) wandern und dort ausdifferenzieren.

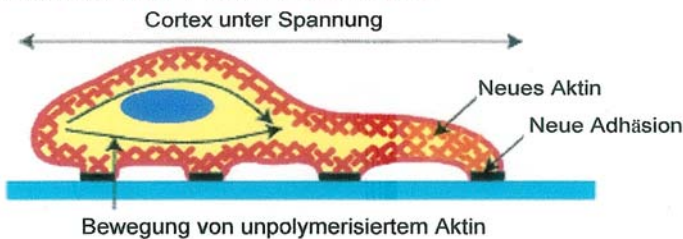
Mit der Ausnahme von manchen Zellen des Immunsystems, die sich mit Hilfe des Blut- oder Lymphstromes fließend fortbewegen, migrieren Zellen im menschlichen Organismus kriechend. Dieser Vorgang, der sich in drei Schritte gliedert, ist schematisch in Abb. 1.3. dargestellt. Dabei sucht die Zelle zu Beginn die Umgebung ab und bildet erste Ausstülpungen aus. Notwendig hierzu ist eine Polarisation innerhalb der Zelle. Dies bedeutet, dass sich die molekularen Prozesse am vorderen und hinteren Ende einer migrierenden Zelle unterscheiden. Die Ausstülpungen können entweder große, breite Lamellipodien oder Finger-ähnliche Filopodien sein. Die Lamellipodien bestehen dabei aus verzweigten Aktin-Filamenten, die ein Netzwerk bilden, während in den Filopodien parallel angeordnete Aktin-Bündel zu finden sind (Welch und Mullins, 2002). Diese Ausstülpungen bilden sich auf ein äußeres Signal hin, welches von Rezeptoren oder Adhäsionsmolekülen wie z. B. NCAM erkannt wird, durch eine Polymerisation von Aktin-Filamenten, die durch den Arp2/3-Komplex ausgelöst werden. Dieser Komplex wird von Mitgliedern der WASP/WAVE-Familie aktiviert, welche ihrerseits von den GTPasen Rac und Cdc42 aktiviert werden. An der Elongation der Aktin-Filamente sind außerdem z. B. Capping-Proteine sowie Phosphatidylinositol-(3,4,5)-Trisphosphat (PIP3) regulatorisch beteiligt, wohingegen u. a. α -Actinin durch Verbinden der Filamente das gesamte Netzwerk stabilisiert. Allerdings wird vermutet, dass nicht die Polymerisation an sich

die Membran nach außen drückt, sondern das „Geradebiegen“ der zunächst gekrümmten Aktin-Filamente die eigentliche treibende Kraft darstellt (Pollard und Borisy, 2003).

1. Ausstülpung der Zellvorderseite



2. Adhäsion an der Zellvorderseite



Deadhäsion an der Zellrückseite



3. Bewegung des Zellkörpers



Abb. 1.3.: Schematische Darstellung der drei Schritte der Zellmigration (modifiziert nach Ananthakrishnan und Ehrlicher, 2007) Erläuterungen s. Text.

Die Hauptkomponente des Cytoskeletts, das Aktin, ist ein semiflexibles Polymer, das aus Dimeren von globulären Aktin-Monomeren gebildet wird. Die Aktin-Filamente besitzen ein schnell wachsendes Plus-Ende und ein langsam wachsendes Minus-Ende, so dass die Verlängerung, die abhängig von der Verfügbarkeit von Aktin-Monomeren ist, asymmetrisch abläuft. Neben dem Aktin besteht das Cytoskelett darüber hinaus aus starren, stangenförmigen Mikrotubuli sowie den intermediären Filamenten, die ein fibröses Netzwerk bilden und den Zellkern mit der Membran verbinden. Auch Spektrin, welches mit Aktin assoziieren kann und bereits in Kapitel 1.1.3. als Bindungspartner von NCAM erwähnt wurde, gehört zu den Bestandteilen des Cytoskeletts.

Um zu verhindern, dass auch im hinteren Teil der Zelle weitere Ausstülpungen entstehen, werden dort für die Aktin-Polymerisation wichtige Moleküle inhibiert oder inaktiviert. So ist

während der Zellmigration eine weitere GTPase, Rho, vor allem an den Seiten sowie im hinteren Teil der Zelle aktiv und wirkt dort als Antagonist zu Rac (Evers et al., 2000; Xu et al., 2003). Außerdem führt eine Dephosphorylierung von PIP3 durch die PIP3-Phosphatase PTEN zu dessen Inaktivierung in den von der Ausstülpung entfernten Membranregionen (Merlot und Firtel, 2003).

Neben diesen genannten Mechanismen spielt auch die GTPase Cdc42 eine wichtige Rolle für die Polarisation einer migrierenden Zelle. Neben ihrer bereits erwähnten Funktion als Aktivator von WASP/WAVE im vorderen Teil der Zelle („leading edge“) ist sie an der Lokalisierung des „microtubule-organizing center“ (MTOC) sowie des Golgi-Apparates vor dem Zellkern in Richtung der Ausstülpung beteiligt (Rodriguez et al., 2003).

Die neuentstandenen Ausstülpungen werden anschließend durch die Ausbildung neuer Adhäsionen an benachbarten Zellen oder der ECM stabilisiert. Hierbei spielen vor allem Integrine eine Schlüsselrolle, indem sie über ihre großen extrazellulären Domänen an ECM-Proteine oder benachbarte Zellen binden und über Adapterproteine den Kontakt zu Aktin-Filamenten im Inneren der Zelle herstellen. Integrine stellen wie die Mitglieder der Ig-Superfamilie eine Familie von Zelladhäsionsmolekülen dar. Es sind transmembranäre Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, die eine Ca^{2+} -abhängige Zelladhäsion vermitteln (Takada et al., 2007). Aber auch andere Adhäsionsmoleküle wie NCAM sind an der Ausbildung neuer Adhäsionen beteiligt.

Rac und Cdc42 rekrutieren Integrine zum vorderen Teil der Zelle und leiten die neuen Adhäsionen ein, die zu Beginn Fokalkomplexe genannt werden. An der Aktivierung der Integrine sind darüber hinaus PKC- und PI3K-vermittelte Signalwege beteiligt. Über das Linkerprotein Talin, dessen Bindung ebenfalls zur Integrin-Aktivierung beiträgt, sowie weiteren Adapterproteinen wie Vinculin oder α -Actinin werden Integrine mit dem Cytoskelett verbunden. Nach der Ausbildung der Fokalkomplexe können sich diese durch Rac-reguliertes „Clustern“ weiter verstärken, woraufhin von fokalen Adhäsionen gesprochen wird (Ridley et al., 2003).

Am hinteren Ende der Zelle findet gleichzeitig eine Deadhäsion statt, die durch Signalwege kontrolliert wird, die FAK, MAP-Kinase oder die Protease Calpain einschließen. Calpain wird u. a. durch Ca^{2+} aktiviert, welches sich durch die Öffnung dehnungs-aktivierter Ca^{2+} -Kanäle („stretch-activated Ca^{2+} -channels“) erhöht. Diese Protease kann in aktivierter Form eine Reihe von Proteinen spalten, die an der Adhäsion beteiligt sind, wie z. B. Integrine, Talin oder Vinculin (Hendey et al., 1992; Glading et al., 2002).

Der letzte Schritt der Zellmigration ist die Translokation des Zellkörpers und das „Nachziehen“ des hinteren Teils der Zelle. Dieser Prozess wird durch das Gleiten von Myosin-Motoren wie Myosin II oder Ic entlang von Aktin-Bündeln generiert (Jay et al., 1995; Eddy et al., 2000). Die Aktivität von Myosin II wird dabei durch die Phosphorylierung der Myosin light chain (MLC) reguliert, die von der Rho-Kinase (ROCK) oder der Myosin light chain-Kinase (MLCK) durchgeführt wird. Letztere wird wiederum von der MAP-Kinase aktiviert (Klemke et al., 1997).

Da NCAM ebenfalls wie in Kapitel 1.1.4. beschrieben die MAP-Kinase aktivieren kann, wird vermutet, dass NCAM durch Interaktion mit Integrinen auf diesem Weg die Zellmigration regulieren kann (Prag et al., 2002; Diestel et al., 2005).

Da die Myosin-Motoren allerdings auch im vorderen Teil der Zelle aktiv sind, wird vermutet, dass sie an der Ausbildung eines sogenannten Rückwärtsflusses („retrograde flow“) beteiligt sind. Dieser Term bedeutet die Bewegung des Aktins in Richtung der Zellmitte gegen die Vorwärtsbewegung der Zelle (Lin et al., 1996). Wie in Abb. 1.4. zu erkennen ist, steigt die Zellmigrationsgeschwindigkeit, je niedriger der Rückwärtsfluss ist. Dazu muss außerdem die Adhäsionsstärke optimal sein, da zu starke fokale Adhäsionen eine Vorwärtsbewegung der Zelle verhindern können. Aber auch zu schwache Fokalkomplexe wirken sich negativ auf die Migration aus, da sie die neuen Ausstülpungen nicht stabilisieren können und diese sich wieder zurückziehen können. DiMilla et al. (1993) konnten ebenfalls zeigen, dass die Migration glatter Muskelzellen bei mittlerer Adhäsionsstärke maximal war.

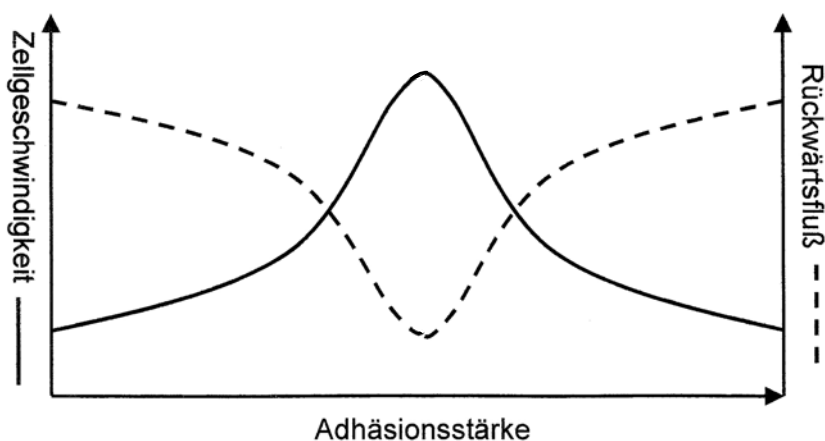


Abb. 1.4.: Hypothetische Beziehung zwischen Rückwärtsfluss, Zellmigrationsgeschwindigkeit und Adhäsionsstärke (modifiziert nach Jurado et al., 2005)

1.3. Neuritenwachstum

Nachdem die Neuronen ihren Bestimmungsort im Nervensystem erreicht haben, beginnen sie mit der Ausbildung der Neuriten, was u. a. durch die in Kapitel 1.1.4. beschriebenen NCAM-

induzierten Signalwege ausgelöst wird. Der Vorgang des Neuritenwachstums verläuft entlang spezifischer, vorgegebener Bahnen und ist in vielen Punkten ähnlich dem der Zellmigration (s. Kapitel 1.2.). Ein einzelne Nervenfaser kann dabei bis zu einem Meter lang werden, bevor sie mit einer passenden Zielstruktur Kontakt aufnimmt.

Wie eine migrierende Zelle erkennt der Wachstumskegel, der sich am vorderen Ende sowohl von Axonen als auch Dendriten befindet, Signale aus der Umgebung. Diese können entweder fördernd (Chemoattraktion) oder hemmend (Chemorepulsion) sein und entweder aus der unmittelbaren Umgebung oder auch aus großer Entfernung kommen (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996). Die bislang am besten untersuchten solcher Leitmoleküle kommen aus den hochkonservierten Familien der Netrine, Slits, Semaphorine und Ephrine, die an spezielle Rezeptoren in der Zellmembran binden und Signalkaskaden auslösen können, welche wiederum die cytoskelettale Dynamik regulieren und auf diese Weise den Wachstumskegel lenken (Review, s. Dickson, 2002). Darüber hinaus erhalten die Wachstumskegel aber auch von diversen anderen Bestandteilen der ECM (s. Kapitel 1.4.) sowie von Proteinen auf den Oberflächen benachbarter Zellen Informationen.

Wachstumskegel besitzen genau wie die Ausstülpungen einer migrierenden Zelle breite, flache Lamellipodien, die sich in Wachstumsrichtung voranschieben, oder Filopodien, die ständig im Auswachsen oder Retrahieren begriffen sind. Während jedoch die Filopodien typischerweise auf Wachstumskegeln von Nervenzellen zu finden sind, die ein ihre Umgebung erforschendes Verhalten aufweisen (Mallavarapu and Mitchison, 1999), kommen Lamellipodien seltener auf Wachstumskegeln vor. Wie bei der Zellmigration sind auch hier (De-)Polymerisationsvorgänge des Aktins für die Vor- oder Rückwärtsbewegungen der Filopodien bzw. des gesamten Wachstumskegels verantwortlich und sowohl bei der Neuritogenese als auch bei der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien in Wachstumskegeln spielt der Arp2/3-Komplex für die Polymerisation der Aktin-Filamente eine entscheidende Rolle (Korobova und Svitkina, 2008). Bei der Weiterleitung der externen Stimuli in den Kern und zum Aktin-Cytoskelett sind vor allem GTPasen der Rho-Familie beteiligt (Luo, 2000).

Im bereits etablierten Neuriten sind hingegen verstärkt Mikrotubuli und Intermediärfilamente konzentriert, die diesem Stabilität geben und für den Transport von Vesikeln oder ganzen Zellorganellen vom Zellkörper zum Wachstumskegel sorgen.

Adhäsionsmoleküle wie NCAM sorgen neben ihrer Funktion als Rezeptoren vor allem für das Stabilisieren der Filopodien bzw. des gesamten neuen Neuriten und bilden die Verbindungsstelle zwischen dem Cytoskelett und dem Substrat. Darüber hinaus hat wie bei

der Zellmigration Myosin die Funktion, den Rückwärtsfluss der Aktin-Moleküle zu regulieren.

1.4. Die Extrazellulärmatrix

Unter dem Begriff Extrazellulärmatrix (ECM) werden alle Makromoleküle zusammengefasst, die von Zellen sezerniert werden und im Extrazellulärraum durch Interaktion mit anderen Molekülen immobilisiert werden. Sie gibt Geweben und Organen ihr Gerüst und ihre Festigkeit und hat Einfluss auf die embryonale Entwicklung sowie die Zellmigration und bindet wichtige Wachstumsfaktoren (Pollard und Earnshaw, 2008).

Die ECM unterscheidet sich innerhalb der verschiedenen Gewebe in ihrer Zusammensetzung, um den Anforderungen der Gewebe zu entsprechen. Die Makromoleküle der ECM werden dabei hauptsächlich von Zellen des entsprechenden Gewebes exprimiert und über Exocytose sekretiert. Im Folgenden sollen in diesem Kapitel lediglich die Hauptbestandteile der ECM des Gehirns näher beschrieben werden.

Der Extrazellulärraum des adulten Gehirns nimmt ca. 20 % des Gesamtvolumens ein (Nicholson und Sykova, 1998) und ähnelt in seiner Zusammensetzung der des Knorpelgewebes. Jedoch ist im Gegensatz zum Knorpelgewebe im Gehirn kein Kollagen vorhanden (Rauch, 2007).

Die ECM besteht zum Einen aus Glukosaminglykanen und zum Anderen aus fibrösen Proteinen. Zur ersten Gruppe gehören u. a. Chondroitinsulfate, Heparansulfate und Hyaluronan. Mit der Ausnahme von Hyaluronan sind diese Polysaccharide an Proteine gebunden (Proteoglykane). Zur zweiten Gruppe gehören z. B. Fibronectin, Laminin oder Elastin, die neben ihren strukturellen Eigenschaften auch adhäsive Eigenschaften aufweisen.

Hyaluronan (früher: Hyaluronsäure) besteht aus bis zu 25.000 nichtsulfatierten Disaccharid-Einheiten (bestehend aus Glucuronsäure und N-Acetylneuraminsäure). Im Gegensatz zu den meisten anderen ECM-Molekülen wird es nicht exocytiert, sondern von einem in der Zellmembran gelegenen Enzymkomplex synthetisiert und direkt in den Extrazellulärraum abgegeben. Hyaluronan hat ein sehr großes Wasserbindungsvermögen und kann daher sehr große zellfreie Räume ausbilden, in die andere Zellen anschließend hinein migrieren können. Aufgrund dieser Eigenschaften spielt es eine große Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems oder bei Reparaturvorgängen (Alberts et al., 2008). Außerdem bildet Hyaluronan Komplexe mit vielen anderen Molekülen der ECM. So findet über Mitglieder der Link Protein Familie wie HAPLN2 und HAPLN4 die Bindung an Neurocan oder Brevican statt (Spicer et al., 2003). Diese Chondroitinsulfatproteoglykane, ebenso wie

Heparansulfatproteoglykane (z. B. Agrin), haben einen Kohlenhydratanteil von bis zu 95 %, der zumeist in Form von langen, unverzweigten Glukosaminglykan-Ketten vorliegt, und sind durch Sulfatierung stark negativ geladen.

Laminine sind Glykoproteine, die Bindungsstellen für Membranproteine (z. B. Integrine) oder andere Proteoglykane der ECM besitzen. Ein typisches Laminin-Molekül besteht aus drei Polypeptidketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind (Mecham, 1991).

Fibronektine sind große Dimere, deren Untereinheiten aus drei verschiedenen, sich wiederholenden Domänen (FNI, FNII und FNIII) bestehen. Wie Laminine binden Fibronektine diverse Liganden auf Zelloberflächen oder in der ECM und bilden auf diese Weise fibrilläre Netzwerke aus.

Weitere Faktoren in der ECM des Zentralnervensystems sind z. B. Reelin, dem eine wichtige Funktion bei der neuronalen Migration zugeschrieben wird (D’Arcangelo et al., 1995; Rice und Curran, 2001), verschiedene Tenascine (Tenascin-R, -C und -N), Vitronektin, aber auch Wachstumsfaktoren wie BDNF, EGF, FGF oder GDNF.

1.5. Endocytose und “Shedding”

Wie bereits erwähnt, wird NCAM eine zentrale Rolle bei Lernvorgängen und Gedächtniskonsolidierung zugeschrieben. Diese kognitiven Fähigkeiten sind nach aktuellem Forschungsstand sehr wahrscheinlich assoziiert mit synaptischer Plastizität. Dieser Term bedeutet im eigentlichen Sinne die Änderung der Effektivität synaptischer Übertragungen an bereits existierenden Synapsen, wird aber auch für die Fähigkeit verwendet, selbst im adulten Gehirn vorhandene Synapsen zu lösen und wieder neu zu verknüpfen (Malenka, 2002). Das Lösen von synaptischen Kontakten verlangt allerdings das Entfernen von Adhäsionsmolekülen, welche die Präsynapse und die Postsynapse verbinden. Dell’Acqua et al. (2006) konnten zeigen, dass die Stabilität/Plastizität eines synaptischen Kontaktes durch die Endocytose von cytoskelettal assoziierten Zelloberflächenproteinen reguliert zu sein scheint. Ebenso ist das Entfernen von Adhäsionsmolekülen bei den zuvor beschriebenen Mechanismen der Zellmigration und des Neuritenwachstums von großer Bedeutung. So sind neben der in Kapitel 1.2. beschriebenen Spaltung von Adhäsionsmolekülen im hinteren Teil einer migrierenden Zellen durch Proteasen wie Calpain auch Endocytose-Vorgänge denkbar, um NCAM oder andere Adhäsionsmoleküle schnell von der Zelloberfläche zu entfernen. Eine weitere Alternative stellen enzymatische Spaltungen in der extrazellulären Domäne von Transmembranproteinen dar, die dazu führen, dass der extrazelluläre Teil dieser Proteine in den Extrazellulärraum abgegeben wird. Dieser Vorgang wird als „Shedding“ bezeichnet.

Die Clathrin-abhängige Endocytose ist der am besten untersuchte Mechanismus der Endocytose, allerdings sind auch Caveolin- oder „lipid raft“-abhängige Mechanismen bekannt, um Zelloberflächenmoleküle herunterzuregulieren oder Signaltransduktionen auszulösen. Die Aufnahme größerer Partikel in die Zelle findet hingegen überwiegend durch Phagozytose oder Makropinocytose statt (s. Abb. 1.5.).

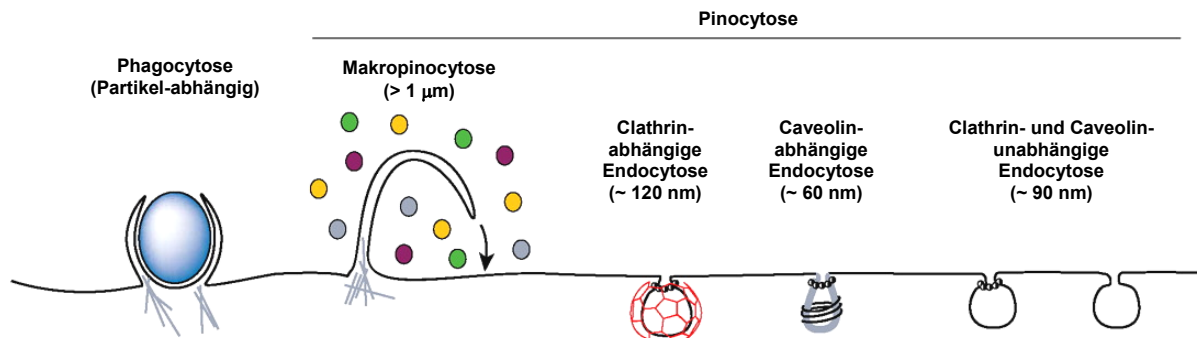


Abb. 1.5.: Mechanismen der Phagozytose und Pinocytose
(modifiziert nach Conner und Schmid, 2003)

Die Clathrin-abhängige Endocytose stellt die schnellste Form der Rezeptor-vermittelten Endocytose dar und beginnt mit der Einstülpung eines „coated pit“. Dabei bildet Clathrin ein dichtes Gitterwerk auf der Cytosolseite, wodurch am Ende ein Vesikel entsteht, der sich von der Membran abschnürt. Bei diesen Prozessen spielen neben Clathrin noch eine Vielzahl weiterer Moleküle wie dem Adaptermolekül AP2, β -Arrestin oder Dynamin (notwendig zur Abschnürung des Vesikels von der Membran) eine Rolle (Review s. Mousavi et al., 2004). Des Weiteren ist auch die durch den Arp2/3-Komplex ausgelöste Aktin-Polymerisation für die Abschnürung und Fortbewegung der Vesikel von Bedeutung (Carreno et al., 2004). Nach dem Abschnüren verlieren die Vesikel schnell ihre Clathrin-Hülle und verschmelzen mit Endosomen.

Caveolae sind sackförmige Einbuchtungen der Plasmamembran und stellen eine besondere Form der „lipid rafts“ dar. Ihren Namen haben sie durch das Protein Caveolin, welches das wichtigste Strukturelement der Caveolae ist und diese stabilisiert (Le et al., 2002). Die Endocytose der Caveolae ist meistens induziert und führt in der Regel zur Bildung von Caveosomen.

Während die Fracht der Caveosomen vermutlich direkt zum endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Golgi-Apparat gelangt, findet nach der Clathrin-abhängigen Endocytose in den frühen Endosomen ein Sortierprozess statt. Die internalisierten Moleküle können von dort aus entweder zurück an die Zelloberfläche gebracht werden (Rezyklisierung), über die späten

Endosomen zum Abbau in die Lysosomen gelangen oder ebenfalls zum Golgi-Apparat und ER transportiert werden (Review, s. Johannes und Lamaze, 2002).

Von Minana et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass NCAM in Astrozyten Clathrin-abhängig endocytiert wird. Dieser Mechanismus konnte zuvor bereits für das Zelladhäsionsmolekül L1 (Kamiguchi et al., 1998) oder das NCAM-Homolog in *Aplysia*, apCAM (Bailey et al., 1992), gezeigt werden. Diestel et al. (2007) zeigten darüber hinaus, dass NCAM in Neuronen und B35-Zellen nach Induktion mit einem NCAM-spezifischen Antikörper sowohl Clathrin- als auch Caveolae-abhängig endocytiert werden kann und der größte Teil des internalisierten NCAMs rezykliert wird. Für das Adhäsionsmolekül L1 wurde auch nachgewiesen, dass die Rezyklisierung von L1 für die Motilität des Wachstumskegels von Bedeutung ist (Kamiguchi und Lemmon, 2000). Des Weiteren zeigten Diestel et al. (2007), dass die Endocytose von NCAM nach Überexpression von Ubiquitin erhöht war und vermuten daher, dass eine Mono-Ubiquitinierung von NCAM an der Plasmamembran ein Endocytose-Signal für NCAM darstellt.

Ob aber, wie für apCAM gezeigt (s. Kapitel 1.1.1.), eine Phosphorylierung innerhalb der PEST-Sequenz(en) neben der Ubiquitinierung ebenfalls eine Voraussetzung für die Endocytose von NCAM ist, konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Aktivität sehr vieler Proteine, die am oben beschriebenen Endocytose-Prozess beteiligt sind, über Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert wird und dass reversible Phosphorylierung ein Mechanismus zur Kontrolle der Clathrin-abhängigen Endocytose darstellt (Itoh und Takenawa, 2004).

Die komplette extrazelluläre Domäne von NCAM kann „gesheddet“ und als lösliches Fragment abgegeben werden (Vawter et al., 2001; Diestel et al., 2005; Hübschmann et al., 2005). Diese enzymatische Spaltung wird vermittelt durch ADAM- (*a disintegrin and metalloprotease*) Familien von Metalloproteasen (Hinkle et al., 2006).

Abnormal hohe Konzentrationen dieses die komplette extrazelluläre Domäne enthaltenden löslichen NCAM-Fragments wurden in der Gehirnflüssigkeit von Patienten mit Schizophrenie gefunden (van Kammen et al., 1998; Vawter, 2000), wobei die Schwere der Krankheit mit der Konzentration korrelierte (Lyons et al., 1988).

1.6. Aufgabenstellung der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit ging es darum, frühere Ergebnisse meiner Diplomarbeit (Goschzik, 2004) zu verifizieren. Ergebnisse mit den NCAM-Mutanten NCAM140-T803A und -T803D, bei denen ein Threonin an Position 803 innerhalb der PEST-Sequenz einmal gegen

Alanin und einmal gegen Aspartat ausgetauscht ist, sollten bestätigt werden. Diese Versuche wurden mit stabil mit den mutierten cDNAs transfizierten B35-Rattenneuroblastom-Zellen durchgeführt. Außerdem sollten weitere Experimente durchgeführt werden, die Aufschluss über Funktionen des Threonins 803 von NCAM140 bzgl. des Neuritenwachstums sowie der Endocytose von NCAM geben sollten.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war, weitere Mutanten von NCAM140 und NCAM180 herzustellen, bei denen die letzten sechs C-terminalen Aminosäuren fehlen sollten, die eine PDZ-bindende Domäne darstellen (Δ ENESKA). Mit daraufhin erneut stabil mit diesen mutierten cDNAs transfizierten B35-Zellen sollten ebenfalls Neuritenmessungen und Endocytose-Versuche durchgeführt werden.

Neben den Experimenten zur Endocytose von NCAM sollte außerdem das „Shedding“ als eine weitere Möglichkeit untersucht werden, wie NCAM von der Zelloberfläche entfernt werden kann. Zu diesem Zweck sollten mit NCAM transfizierte B35-Zellen mit Pervanadat behandelt werden, wodurch eine enzymatische Abspaltung der extrazellulären Domäne von NCAM ausgelöst werden kann. Diese Versuche sollten zunächst mit transient transfizierten Zellen durchgeführt werden, welche nichtmutiertes NCAM140 bzw. NCAM180 exprimieren, deren C-Termini jedoch mit eGFP modifiziert wurden. Hier sollten mittels Fluoreszenzmikroskopie die Auswirkungen der Pervanadat-Behandlung auf die Anzahl NCAM-eGFP-haltiger intrazellulärer Vesikel untersucht werden. Im Folgenden sollte darüber hinaus eine mögliche Funktion des C-Terminus mit Hilfe der Δ ENESKA-Mutanten beim Pervanadat-induzierten „Shedding“ erforscht werden. Dies sollte durch Untersuchungen der Zelllysate sowie der Medienüberstände von stabil mit NCAM140/180-Wildtyp und Δ ENESKA transfizierten B35-Zellen nach Auftrennung im SDS-Gel und anschließender Western Blot Analyse erfolgen.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich die zuvor erwähnten Mutationen von NCAM auf das Migrationsverhalten der stabil transfizierten B35-Zellen auswirken. Mittels Timelapse-Analyse sollten dazu neben den NCAM140-T803A- und -T803D- und den NCAM140- und NCAM180- Δ ENESKA-Mutanten noch weitere früher in unserem Institut hergestellte NCAM-Mutanten getestet werden. Dabei handelt es sich zum einen um eine Mutante, bei der sowohl das Threonin 803 gegen Alanin ausgetauscht worden war und bei der zusätzlich die ENESKA-Domäne fehlt (NCAM140-T803A/ Δ ENESKA; s. Quade, 2004) und zum anderen Mutanten, bei denen ein Tyrosinrest innerhalb der cytosolischen Domäne von NCAM140 bzw. NCAM180 gegen Phenylalanin ausgetauscht

wurde (NCAM140/180-Y734F; s. Diestel et al., 2004). Auch von diesen Mutanten standen stabil transfizierte B35-Zellen zur Verfügung.

Außerdem sollte die Zellwanderung der stabil mit NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen in haptotaktischen Migrationsversuchen durch auf der Unterseite unterschiedlich beschichtete Membranen mit definierter Porengröße in sogenannten Transwell-Kammern untersucht werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Firma
ACN	Riedel-de Haën, Seelze
Acrylamid	Merck, Darmstadt
Agar-Agar	Otto Nordwald, Hamburg
Agarose	Roche, Grenzach-Wyhlen
AgNO ₃	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
APS	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bis-Acrylamid	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Bromphenolblau	LKB Bromma, SWE
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Calyculin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
dbcAMP	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM-H-Medium	Invitrogen, UK
DMSO Hybri-Max	Sigma, Taufkirchen
dNTPs	Promega, USA
EDTA	Merck, Darmstadt
Entwickler	Kodak, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidumbromid-Stammlösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach
Fixierer	Kodak, USA
G418	Biochrom AG, Berlin
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
GM6001	Chemicon, USA
Hefe-Extrakt	Otto Nordwald, Hamburg
Hepes	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Firma
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Lysotracker	Invitrogen, UK
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
NaF	Sigma-Aldrich, Steinheim
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Na ₂ S ₂ O ₃	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka, CH
OptiMEM	Invitrogen, UK
Pen/Strep	PAA Laboratories, AU
Permafluor	Immunotech, FR
Pferdeserum	CC-Pro, Neustadt
Phenolrot	GE Healthcare, UK
PLL	Sigma-Aldrich, Steinheim
PMSF	CC-Pro, Neustadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein G-Sepharose	Amersham Biosc., SWE
SDS	Roth, Karlsruhe
Super Signal [®] West	Pierce, Bonn
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA	CC-Pro, Neustadt
Trypton	Otto Nordwald, Hamburg
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield	Vector Laboratories, USA

2.1.2. Einwegartikel und Arbeitsmaterialien

Einwegartikel und Arbeitsmaterialien	Bezugsquelle
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg; Eppendorf, Köln
Pipetten	Eppendorf, Köln; Labsystems, Egelsbach
Einwegartikel für die Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht; Falcon, USA
LowBind-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Köln
Multiwell-Schalen; 60 mm-Schalen	Becton Dickinson and Company, USA
Deckglas 12 mm	Menzel, Braunschweig
Cryoröhrchen	Nunc, DK
Mat-Tek-Schalen	MatTek Corporation, USA
Amicon YM-30	Millipore, USA
Filterpapiere (3MM) für Western-Blot-Analysen	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham Biosciences, SWE
Röntgenfilm CL-X Posure™ Film	Pierce, Bonn
Gelkammern/Elektrophorese-Apparatur für SDS-PAGE	Bio-Rad, München
96-Well-Assay-Platten	Falcon, USA

2.1.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Bio-Photometer	Bio-Rad, München
ELISA-Reader Titertek PLUS MS2	ICN, Meckenheim
Kamera AxioCam MRc	Zeiss, Göttingen
Kamera AxioCam MRc5	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss, Göttingen
Kamera DFC 350 FX	Leica, GB
Mikroskop DMIRE2	Leica, GB
Konfokales Lasermikroskop LSM 510 Meta	Zeiss, Göttingen
PCR-Gerät MiniCycler™	MJ Research, USA
Trans-Blot® Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Köln
Zentrifuge Labofuge 200	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Super T 21	Sorvall, USA
Zentrifuge Sigma 2K15	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4. Nukleinsäurestandard

Standard	Fragmentgrößen in bp (Konzentration)
DNA Molecular Weight Marker III (Roche, Grenzach-Wyhlen)	21.226 (109,5 ng/μL); 5.148 (26,5 ng/μL); 4.973 (25,8 ng/μL); 4.268 (22 ng/μL); 3.530 (18,3 ng/μL); 2.027 (10,5 ng/μL); 1.904 (9,8 ng/μL); 1.584 (8,3 ng/μL); 1.375 (7 ng/μL); 947 (4,8 ng/μL); 831 (4,3 ng/μL); 564 (3 ng/μL)
Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Rot)	10.000; 8.000; 6.000; 5.000; 4.000; 3.500; 3.000; 2.500; 2.000; 1.500; 1.200; 1.031; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100

2.1.5. Proteinstandard

Standard	Proteingrößen (in kDa)
Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, München)	250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15; 10
PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	200; 150; 120; 100; 85; 70; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 10

2.1.6. Vektoren

Vektor	Eigenschaften
pcDNA3	5446 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz
pcDNA3/NCAM140-WT (Human) (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	8008 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz (s. Diestel et al., 2004; 2005)
pcDNA3/NCAM180-WT (Human) (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	8750 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz (s. Diestel et al., 2004; 2005)
pcDNA3/NCAM180-WT (Ratte) (zur Verfügung gestellt von Dr. L. Hinkle)	8750 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz
pcDNA3/NCAM140-T803A (Human)	8008 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz
pcDNA3/NCAM140-T803D (Human)	8008 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz
pcDNA3/NCAM180 Δ ENESKA (Human) (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	8750 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz
pcDNA3/NCAM140-Y734F (Human) (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	8008 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz (s. Diestel et al., 2004)
pcDNA3/NCAM180-Y734F (Human) (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	8750 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz (s. Diestel et al., 2004)
pcDNA3/eGFP (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	6145 bp, Ampicillin-Resistenz, G418-Resistenz
pEGFP-N1/NCAM140 (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	7262 bp, Kanamycin-Resistenz, G418-Resistenz (s. Diestel et al., 2007)
pEGFP-N1/NCAM180 (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Diestel)	8039 bp, Kanamycin-Resistenz, G418-Resistenz (s. Diestel et al., 2007)
erk2/pCMV5 (zur Verfügung gestellt vom Dept. of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, USA)	5780 bp, Ampicillin-Resistenz

2.1.7. Antikörper

Primärer Antikörper	Beschreibung	Quelle
123C3 (anti-NCAM120/140/180)	monoklonaler Mausantikörper (erkennt humanes NCAM)	Hybridomazellen von R. Michalides (Amsterdam), aufgereinigt über Protein G
OB11 (anti-NCAM140/180)	monoklonaler Mausantikörper Maus-Aszites Fluid (erkennt humanes, Maus- und Ratten-NCAM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5B8 (anti-NCAM140/180)	monoklonaler Mausantikörper (erkennt humanes, Maus- und Ratten-NCAM)	Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, USA
H-300 (anti-NCAM120/140/180)	polyklonaler Kaninchenantikörper (erkennt humanes, Maus- und Ratten-NCAM)	Santa Cruz Biotechnologies, USA
anti-Aktin 1501	monoklonaler Mausantikörper	Chemicon, USA

Sekundärer Antikörper	Beschreibung	Konzentration	Quelle
anti-Maus-Cy3	polyklonaler Ziegenantikörper, Carbocyanin 3-gekoppelt	1,4 mg/mL	Dianova, Hamburg
anti-Maus-POD	polyklonaler Ziegenantikörper, Peroxidase-gekoppelt	0,8 mg/mL	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen-POD	polyklonaler Ziegenantikörper, Peroxidase-gekoppelt	0,8 mg/mL	Dianova, Hamburg
anti-Maus-DTAF	polyklonaler Ziegenantikörper, Fluorescein-gekoppelt	1,4 mg/mL	Dianova, Hamburg
anti-Maus-Cy2	polyklonaler Ziegenantikörper, Carbocyanin 2-gekoppelt	1,7 mg/mL	Dianova, Hamburg
anti-Maus-IgG	polyklonaler Kaninchenantikörper	2,7 mg/mL	Dako, DK

2.1.7.1. Antikörper-Verdünnungen

Antikörper	Immunfluoreszenz	Western-Blot
123C3	1:100	1:1.000-2.000
OB11	-	1:1.000
5B8	1:100	1:2.000
H-300	-	1:500
anti-Aktin 1501	-	1:5.000
anti-Maus-Cy3	1:1.000	-
anti-Maus-POD	-	1:10.000-20.000
anti-Kaninchen-POD	-	1:10.000
anti-Maus-DTAF	1:150	-
anti-Maus-Cy2	1:1.000	-
anti-Maus-IgG	1:11	-

2.1.8. Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
B35 (zur Verfügung gestellt von P. Manness, University of North Carolina, Chapel Hill) Referenz: Schubert et al., 1974	Ratten-Neuroblastomzelllinie mit neuronalen Eigenschaften
B35/NCAM140-WT (zur Verfügung gestellt von S. Diestel, Universität Bonn)	B35-Zelllinie, exprimiert humanes NCAM140, resistent gegen G418
B35/NCAM140-T803A	B35-Zelllinie, exprimiert mutiertes humanes NCAM140, resistent gegen G418
B35/NCAM140-T803D	B35-Zelllinie, exprimiert mutiertes humanes NCAM140, resistent gegen G418
COS-7	Affennieren-Zellen mit Fibroblasten-Morphologie
COS140 (zur Verfügung gestellt von R. Gerardy-Schahn (Universität Hannover)	COS-7-Zelllinie, exprimiert humanes NCAM140
L	Fibroblasten-Zelllinie
L140 (zur Verfügung gestellt von P. Maness, University of North Carolina, Chapel Hill)	Fibroblasten-Zelllinie, exprimiert Ratten-NCAM140

2.1.9. Bakterienstamm

E. coli XL1-blue Genotype: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, Δ (mcr)A183,
 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173, supE44, relA1,
lac[F`proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r 12,5 μ g/mL)]

2.1.10. Lösungen und Puffer

2.1.10.1. Lösungen für die Bakterienkultur

LB-Medium

1 % (w/v) NaCl
 1 % (w/v) Trypton
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 in Aqua demin., pH 7,0
 Autoklavierung

LB-Agarplatten

LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5 %
 (w/v) Agar-Agar versetzen, bei Bedarf nach
 Abkühlung auf ca. 50°C Selektionsantibiotikum
 hinzufügen;
 Gießen der Platten

Ampicillin-Stammlösung (50 mg/mL)

250 mg Ampicillin in 5 mL Aqua demin.,
 Sterilfiltrierung, Lagerung bei -20°C
 Endkonzentration: 50 µg/mL

Kanamycin-Stammlösung (100 mg/mL)

500 mg Kanamycin in 5 mL Aqua demin.
 Sterilfiltrierung, Lagerung bei -20°C
 Endkonzentration: 30 µg/mL

2.1.10.2. Lösungen für die Nukleinsäureanalytik

DNA-Probenpuffer (6-fach konz.)

(Loading Dye Solution)
 0,2 % Bromphenolblau
 0,2 % Xylencyanol
 60 % Glycerin
 60 mM EDTA

TBE-Puffer (10-fach konz.)

1 M Tris
 0,83 M Borsäure
 10 mM EDTA

Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/mL)

1 % (w/v) Ethidiumbromid
 lichtgeschützte Lagerung bei RT

TE-Puffer

10 mM Tris
 1 mM EDTA
 mit HCl auf pH 8,0 einstellen
 Sterilfiltrierung, Lagerung bei RT

2.1.10.3. Lösungen für die Proteinanalytik

Allgemeine Lösungen

PBS (10-fach konz.)

1,37 M NaCl
27 mM KCl
81 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
15 mM KH₂PO₄
pH 7,2 mit HCl einstellen

DPBS (10-fach konz.)

PBS (10-fach konz.) mit Zusatz von
7 mM CaCl₂ x 2 H₂O
5 mM MgCl₂ x 6 H₂O

TBS (10-fach konz.)

1,37 M NaCl
0,2 M Tris
pH 7,4 mit HCl einstellen

TBS-T (0,05 %)

100 mL TBS (10-fach konz.)
500 µL Tween-20
mit Aqua demin. auf 1 L auffüllen

Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Probenpuffer (4-fach konz.)

50 mM Tris (pH 6,8)
6 % (v/v) Glycerin
1,5 % (w/v) SDS
0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,01 % (v/v) Bromphenolblau
in Aqua demin.

Acrylamid/Bis-Lösung

30 % (w/v) Acrylamid
0,8 % (w/v) Bis-Acrylamid
in Aqua demin.

Tris-HCl-Lösungen

1 M Tris in Aqua demin., pH 6,8
1,5 M Tris in Aqua demin., pH 8,8
pH-Werte mit HCl einstellen

Laufpuffer (10-fach konz.)

144 g/L Glycin
30 g/L Tris
10 g/L SDS
in Aqua demin.

SDS-Lösung

10 % (w/v) SDS in Aqua demin.

APS-Lösung

10 % (w/v) APS in Aqua demin.

Pro-Q Diamond™-Färbung für SDS-Polyacrylamid-Gele**Fixierlösung**

50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in Aqua demin.

Entfärbelösung

25 mL 1 M Natriumacetat (pH 4,0)
 100 mL ACN
 mit Aqua demin. auf 500 mL auffüllen

Lösungen für die Silberfärbung**Fixierlösung**

30 % (v/v) Ethanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in Aqua demin.

Waschlösung

20 % (v/v) Ethanol
 in Aqua demin.

Sensitivierungslösung

40 µL Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (500 mg/mL)
 in 100 mL Aqua demin.

Färbelösung

200 mg Ag NO₃
 75 µL Formaldehyd (37 %)
 in 100 mL Aqua demin.

Entwicklerlösung

6 g Na₂CO₃
 1 µL Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (500 mg/mL)
 50 µL Formaldehyd (37 %)
 in 100 mL Aqua demin.

Stopplösung

5 % (v/v) Essigsäure
 in Aqua demin.

Transferpuffer für den Western Blot (12,5-fach konz.)

36,6 g/L Glycin
 72,7 g/L Tris
 4,7 g/L SDS
 in Aqua demin., Lagerung bei 4 °C

vor Gebrauch 10 mL 12,5-fach konz.
 Transferpuffer mit Aqua demin. auf 100 mL
 auffüllen und 25 mL (20 %) Methanol
 hinzufügen

Ponceau S-Färbelösung

0,2 % (w/v) Ponceau S in 3 %iger Essigsäure-Lösung

Lösung für die Eluierung von Antikörpern von Nitrocellulosemembranen (pH 2,5)

0,5 M Essigsäure

0,5 M NaCl

in Aqua demin.

2.1.10.4. Lösungen für Immunfluoreszenz und Endocytose-Versuch**Fixierungslösung (Immunfluoreszenz)**

4 % (v/v) Formaldehyd in DPBS

Blockierungslösung (Immunfluoreszenz)

5 % Pferdeserum in DPBS

Fixierungslösung (Endocytose)

8 % (v/v) Formaldehyd in Hepes (200 mM)

Blockierungslösung (Endocytose)

1 % oder 3 % BSA in TBS

pH 7,2 – 7,4 mit NaOH einstellen

2.1.10.5. Lösungen für die Zellysierung und Immunpräzipitation**Ripa Lyse-Puffer (CC-Pro, Neustadt)**

Tris 6057,00 mg/L

NP40 10.000,00 mg/L

Natriumdeoxycholat 2500,00 mg/L

NaCl 8766,00 mg/L

NaF 41,99 mg/L

Na₃VO₄ 183,90 mg/L

EGTA 380,35 mg/L

Aprotinin 1,00 mg/L

Leupeptin 1,00 mg/L

Pepstatin 1,00 mg/L

PMSF (erst kurz vor Verwendung zufügen) 34,84 mg/L

Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,2)10 mM Na₂HPO₄10 mM NaH₂PO₄

in Aqua demin.

Ripa-Waschpuffer (pH 7,2)

1 M NaCl

10 mM EDTA

40 mM NaF

1 mL/L (0,2 %) Triton X-100

in Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,2),

Lagerung bei 4°C

2.1.10.6. Lösungen für „Shedding“-Experimente

Natrium-Orthovanadat

10 mM Na_3VO_4 pH 10 mit NaOH einstellen, dann 3-5 Minuten kochen;
in 100 mL Aqua demin. nach Abkühlen pH überprüfen, ggf. erneut einstellen
Vorgang so oft wiederholen, bis pH stabil ist, dann bei
-80°C einfrieren

Pervanadat

Äquimolare Mengen von 10 mM Na_3VO_4 und 35 %igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) werden kurz vor Gebrauch gemischt.

2.1.10.7. Lösungen für die Zellkultur

Kulturmedium

DMEM-H (Glucose-Konz.: 4500 mg/mL)

10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert)

100 U/mL Penicillin

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin

Selektionsmedium

DMEM-H (Glucose-Konz.: 4500 mg/mL)

10 % (v/v) FCS (hitzeinaktiviert)

100 U/mL Penicillin

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin

500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 (B35-/COS-7-Zellen)

250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 (L-Zellen)

HBSS⁻

5,4 mM KCl

0,44 mM KH_2PO_4

136,9 mM NaCl

4,62 mM Na_2HPO_4

5,5 mM D-Glucose

0,03 mM Phenolrot

in Aqua demin., pH 7,2 - 7,4

Poly-L-Lysin- (PLL-) Stammlösung

1 mg/mL in Aqua demin.

Endkonzentration: 0,02 mg/mL

1 mL Stammlösung mit Aqua demin. auf

50 mL auffüllen

Isotonische Glucoselösung (0,3 M)

54,05 g/L Glucose

in Aqua demin., sterilfiltrieren

DiI-Stammlösung

10 mM DiI (D-282;

Molecular Probes, USA)

in DMSO

DiI-Markierungslösung

DiI-Stammlösung 1:1.000

in isotonischer Glucose-
lösung verdünnen

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung der NCAM140/180- Δ ENESKA-Mutanten

Die Mutanten, bei denen die letzten sechs C-terminalen Aminosäuren von NCAM140/180 (ENESKA) fehlen, wurden mit Hilfe des QuickChangeTM site-directed mutagenesis kit (Stratagene, USA) unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Hierzu wird die in einen pcDNA3-Vektor eingebaute NCAM140/180-cDNA mit Hilfe spezieller Primer (Eurofins MWG Operon, Martinsried) mutiert, so dass ein Stoppcodon am sechstletzten Basentriplett der cDNA entsteht. Für NCAM140 und NCAM180 kann das gleiche Primerpaar verwendet werden.

Primer für die Δ ENESKA-Mutanten (verändertes Basentriplett kursiv gedruckt):

anti-sense: 5'- GCT CTC GTT *CTA* CTT TGT CTG TGT GGC – 3'

sense: 5'- GCC ACA CAG ACA AAG *TAG* AAC GAG AGC - 3'

Verschiedene Mengen der Plasmid-DNA (0,5; 5; 25 und 50 ng) werden mit jeweils 1 μ L des anti-sense- sowie des sense-Primers (Primerkonzentrationen: 20 pmol/ μ L in TE-Puffer) vermischt. Außerdem wird 1 μ L eines Desoxynukleotid-Triphosphat-Gemisches (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Konzentration jeweils 25 mM) zugefügt. Dazu wird 1 μ L *Pfu Turbo* DNA-Polymerase (2,5 U/ μ L) und 5 μ L 10-fach konzentrierter Polymerase-Puffer (beides von Stratagene, USA) gegeben und mit Aqua demin. auf 50 μ L aufgefüllt.

PCR-Schritte:

Schritt 1 (Initiale Denaturierung)	95°C	1 Minute
Schritt 2 (Denaturierung)	95°C	30 Sekunden
Schritt 3 (Primer-Anlagerung)	61°C	1 Minute
Schritt 4 (Polymerisation)	72°C	18 Minuten (NCAM140)
	68°C	18 Minuten (NCAM180)
Schritt 5 (15 x zurück zu Schritt 2)		
Schritt 6 (Finale Polymerisation)	72°C	10 Minuten
Schritt 7 (Ende)	4°C	

Im Anschluss an die PCR wird die parentale, unmutierte Plasmid-DNA mit Hilfe des Enzyms DpnI (Stratagene, USA) aus dem PCR-Produkt entfernt. Der Verdau mit diesem Enzym, welches nur methylierte DNA verdaut, wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die mutierte Plasmid-DNA wird zur Vermehrung in Bakterien transformiert (s. Kapitel 2.2.2.) und anschließend wieder mit Hilfe der präparativen Plasmid-Isolierung (s. Kapitel 2.2.3.) gewonnen.

Jeweils 100 ng der DNA werden darauf mit 10 U/ μ L der Restriktionsendonuklease BamHI (Roche, Grenzach-Wyhlen) für 2 Stunden bei 37°C verdaut, um das NCAM140/180-Insert

aus dem Plasmid auszuschneiden. Nach der Auftrennung der entstandenen Fragmente im Agarose-Gel (s. Kapitel 2.2.4.) wird das NCAM140/180-Insert aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert. Das so gewonnene NCAM140/180-Insert wird im Überschuss zu neuem, zuvor ebenfalls mit BamHI verdautem pcDNA3-Vektor gegeben, welcher nicht während einer PCR eventuell eingeführte unerwünschte Mutationen enthält, und mit T4-DNA-Ligase (Roche, Grenzach-Wyhlen) über Nacht bei 16°C ligiert.

Zur Überprüfung, ob die erwünschte Mutation tatsächlich in die NCAM140/180-cDNA eingebaut wurde und keine weiteren, unerwünschten Mutationen erfolgten, werden die gesamten Sequenzen der NCAM140/180-Inserts analysiert.

Die Sequenzanalysen dieser Arbeit wurden von Eurofins MWG Operon (Martinsried) durchgeführt.

2.2.2. Transformation

Der verwendete kompetente Bakterienstamm *E. coli* XL-1 blue wird auf Eis aufgetaut und 50 µL der Bakteriensuspension nach Zugabe von ca. 25-50 ng der Plasmid-DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden und sofortige Abkühlung auf Eis für 2 Minuten. Zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz, die mit dem Plasmid aufgenommen wurde, werden 450 µL Nährmedium (LB-Medium) zu den Bakterien gegeben und diese für 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran werden 50-200 µL der Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthalten, ausgestrichen und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.3. Präparative Plasmid-Isolierung

Eine Einzelkolonie transformierter Bakterien wird von der LB-Agarplatte in 50 mL antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend werden 25 mL der Suspension bei Raumtemperatur (RT) für 15 Minuten bei 1620 x g zentrifugiert. Für die Plasmid-Isolierung wird das Plasmid Midi Kit von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Trocknung der Plasmid-DNA und anschließender Aufnahme in 150 µL TE-Puffer wird die Konzentration (Absorption bei 260 nm, bei der eine optische Dichte (OD) von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL entspricht) sowie die Reinheit (Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm) der DNA

photometrisch bestimmt. Eine reine DNA-Probe hat einen OD_{260}/OD_{280} -Quotienten von 1,8-2,0.

2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach gewünschter Konzentration des Gels wird die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg/mL zugegeben und vor dem Erstarren des Gels wird die Flüssigkeit in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels wird dieses in die Elektrophoresekammer gestellt und mit TBE-Puffer bedeckt. Darauf wird der Kamm entfernt und die mit entsprechender Menge 6-fach konzentriertem Probenpuffer (Loading Dye Solution) versetzten Proben in die entstandenen Taschen pipettiert. Die Proben sowie ein ebenfalls mit Probenpuffer versetzter Molekulargewichtsmarker werden nun bei 80-100 V für ca. 1,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Auswertung und Dokumentation werden die Gele auf einen UV-Transilluminator gelegt und fotografiert.

2.2.5. Zellkultur

Die Arbeiten zur Kultivierung der Zellen wurden in Steril-Bänken mit Laminar-Luftstrom-Prinzip durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C im Inkubator in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert.

Die verschiedenen Zelllinien werden in T75-Kulturflaschen kultiviert. Bei den B35-Zellen werden die Flaschen zunächst mit Poly-L-Lysin (PLL) in einer Konzentration von 0,02 mg/mL für mindestens 30 Minuten bei RT beschichtet. COS-7-Zellen und L-Zellen werden ohne PLL in den Flaschen kultiviert.

Alle verwendeten Zelllinien werden in DMEM-H-Medium mit Zusatz von 10 % FCS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin (Kulturmedium) kultiviert. Bei den stabil transfizierten B35- sowie COS-7-Zellen wird dem Medium zum Selektionsdruck zusätzlich noch 500 µg/mL G418 (Geneticin) zugesetzt. Die stabil transfizierten L-Zellen erhalten lediglich 250 µg/mL G418. Ein Medienwechsel erfolgt alle 2-3 Tage.

Die Zellen werden bei einer Konfluenz von ca. 90 % passagiert. Dazu wird zunächst zweimal mit HBSS⁻ gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 mL Trypsin-EDTA je T75-Flasche die Zellen vom Boden gelöst. Die Zellen werden mit 5 mL Medium vom Flaschenboden abgespült und die Zellsuspension bei 180 x g für 7 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die sedimentierten Zellen in neuem Medium

resuspendiert und in den gewünschten Verdünnungen in neue Kulturgefäße mit vorgelegtem Medium überführt. Die verwendeten Zellen werden nach dem Auftauen maximal achtmal passagiert.

2.2.6. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wird zunächst wie beim Passagieren verfahren. Nach der Zentrifugation wird das Zellpellet mit 1,8 mL Kulturmedium (immer ohne G418) resuspendiert und dieses gleichmäßig in zwei Cryoröhrchen aufgeteilt. Nach Zugabe von je 100 µL DMSO werden die Röhrchen zügig bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitaufbewahrung werden die Cryoröhrchen einen Tag später in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wird 37°C warmes G418-freies Kulturmedium auf die gefrorene Zellsuspension gegeben und der dadurch aufgetaute Anteil direkt in 9 mL Kulturmedium überführt, um die DMSO-Konzentration zu verdünnen. Dies wird so oft wiederholt, bis die gesamte Zellsuspension aufgetaut ist. Um das DMSO zu entfernen, wird die Suspension für 7 Minuten bei 180 x g und RT zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet anschließend mit G418-freiem Kulturmedium resuspendiert und in T75-Kulturflaschen überführt. Nach 24 Stunden im Inkubator erfolgt ein Medienwechsel. Die stabil transfizierten Zellen erhalten nun wieder Selektionsmedium.

2.2.7. Transfektion

2.2.7.1. Transiente Transfektion

Für die transienten Transfektionen in dieser Arbeit wurde entweder Lipofectamin PlusTM oder LipofectaminTM 2000 (beides Invitrogen, UK) verwendet.

Die Zellen werden 1-2 Tage vor der Transfektion auf Petrischalen oder Multiwell-Schalen so ausplattiert, dass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-80 % erreicht wird.

Bei den Transfektionen mit Lipofectamin PlusTM wird zunächst die Plasmid-DNA mit serumfreiem DMEM-H (Medium A, entsprechende Mengen je Kulturschale sind in Tabelle 2.1. angegeben) vermischt und dieses nach weiterer Zugabe von Plus-Reagenz für 15 Minuten bei RT inkubiert. Außerdem wird Lipofectamin (2 mg/mL) ebenfalls mit serumfreiem DMEM-H (gleiche Mengen von Medium A je Kulturschale in Tabelle 2.1.) vermischt und dies nach Ablauf der Inkubationszeit mit dem DNA/Plus-Reagenz-Ansatz vermischt und 25 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf die zuvor zweimal mit serumfreiem Medium gewaschenen Zellen, auf die daraufhin serumfreies DMEM-H (Mengen

von Medium B je Kulturschale in Tabelle 2.1.) vorgelegt wurde, pipettiert. Nach dreistündiger Inkubation der Zellen bei 37°C im Inkubator erfolgt ein Medienwechsel zu Kulturmedium.

Kultur-schale	DNA (µg)	Plus-Reagenz (µL)	Lipofectamin (µL)	Medium A (µL)	Medium B (mL)
24-Well	0,34	0,24	0,33	17	0,18
12-Well	0,68	0,48	0,66	34	0,36
60 mm	3,6	2,6	3,5	180	1,44
100 mm	10,8	7,8	10,5	540	4,32

Tabelle 2.1.: Transfektion mit Lipofectamin Plus™

Die Mengen an Medium A (serumfreies DMEM-H) werden einmal mit den entsprechenden Mengen DNA und Plus-Reagenz und einmal mit der entsprechenden Menge Lipofectamin vermischt. Die Mengen an Medium B (ebenfalls serumfreies DMEM-H) werden vor Zugabe des DNA/Plus-Reagenz/Lipofectamin-Gemisches auf die in den entsprechenden Kulturschalen ausplattierten Zellen gegeben.

Bei den Transfektionen mit Lipofectamin™ 2000 wird das Transfektionsreagenz in OptiMEM (Medium A, entsprechende Mengen je Kulturschale sind in Tabelle 2.2. angegeben) für 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die Plasmid-DNA, die zuvor ebenfalls in OptiMEM (gleiche Mengen von Medium A in Tabelle 2.2.) verdünnt wurde, hinzugefügt. Diese Mischung wird bei RT für weitere 20 Minuten inkubiert und dann auf die bereits in DMEM-H mit 10 % FCS (Mengen von Medium B je Kulturschale in Tabelle 2.2.) kultivierten Zellen pipettiert, die anschließend im Inkubator bei 37°C inkubiert werden. Ein Medienwechsel zum Kulturmedium erfolgt 16 Stunden nach der Transfektion.

Kultur-schale	DNA (µg)	Lipofectamin™ 2000 (µL)	Medium A (µL)	Medium B (mL)
24-Well/ Mat-Tek	0,15	0,3	50	0,2
12-Well	0,3	0,6	100	0,4
60 mm	1,5	3	500	2

Tabelle 2.2.: Transfektion mit Lipofectamin™ 2000

Die Mengen an Medium A (OptiMEM) werden einmal mit der entsprechenden Menge DNA und einmal mit der entsprechenden Menge Lipofectamin™ 2000 vermischt. Das DNA/Lipofectamin™ 2000-Gemisch wird auf die in den Kulturschalen ausplattierten Zellen gegeben, die bereits in den entsprechenden Mengen an Medium B (DMEM-H mit 10 % FCS) kultiviert werden.

2.2.7.2. Stabile Transfektion

Die stabilen Transfektionen in dieser Arbeit wurden mit Lipofectamin Plus™ durchgeführt.

Die Zellen werden 24 Stunden vor der Transfektion auf 60 mm-Schalen ausplattiert und wie in Kapitel 2.2.7.1. beschrieben transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion werden die transfizierten Zellen in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50 und 1:100) auf 100 mm-Schalen ausplattiert. Nach einem weiteren Tag erfolgt die Selektion durch Zugabe

von G418 (500 µg/mL Kulturmedium). Nach ca. 2 Wochen, in denen das Selektionsmedium alle 3-4 Tage gewechselt wurde, können einzelne Klone mit einer Pipettenspitze abgeschabt, aufgesaugt und in Vertiefungen einer 48-Well-Schale überführt werden. Die Klone werden anschließend weiterkultiviert und bei Erreichen einer 90-100 %igen Konfluenz in eine größere Kulturschale überführt, bis eine ausreichende Zellmenge zum Einfrieren oder zum Durchführen von Experimenten erreicht wird.

2.2.8. Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Die zu untersuchenden Zellen werden auf sterilen Deckgläschen kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS (4°C) werden die Zellen für 10 Minuten mit 4 %igem Formaldehyd (in DPBS, 4°C) fixiert. Die Fixierlösung wird anschließend entfernt und die Zellen einmal mit DPBS (4°C) und zweimal mit Blockierungslösung (5 %iges Pferdeserum in DPBS, 4°C) gewaschen, bevor für 10 Minuten bei RT blockiert wird. Sollen intrazelluläre Proteine analysiert werden, folgt eine Permeabilisierung für 30 Minuten bei RT mit 0,5 % Triton X-100 in DPBS bei 4°C, welches im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit Blockierungslösung wieder entfernt wird. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper (Verdünnungen s. Kapitel 2.1.7.1.) erfolgt bei RT für 30 Minuten ebenfalls in Blockierungslösung. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung wird der Zweit-Antikörper in Blockierungslösung (s. Kapitel 2.1.7.1.) auf die Zellen gegeben und im Dunkeln bei RT für 30 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit DPBS und einmal mit Aqua demin. gewaschen und mit Permafluor auf einem Objektträger eingedeckelt.

2.2.9. Herstellung von Zellysaten

Die Zellen werden nach zwei Tagen Subkultivierung auf 60 mm- oder 100 mm-Kulturschalen bei einer Konfluenz von ca. 80-100 % lysiert. Bei transient transfizierten Zellen erfolgt die Lyse zwei Tage nach der Transfektion. Vor der Lyse werden die Zellen zweimal mit DPBS (4°C) gewaschen und anschließend wird je nach Konfluenz 150-200 µL (60 mm-Schale) bzw. 600-800 µL (100 mm-Schale) Ripa Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben. Nach sofortiger Überführung der Zellen in ein ausreichend großes Reaktionsgefäß wird das Lysat 20 Minuten auf Eis inkubiert, wobei mehrfach gründlich gemischt wird. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 18.000 x g für 30 Minuten. Der die Proteine enthaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.10. Immunpräzipitation

Zunächst wird wie bei der Herstellung von Zellysaten verfahren (s. Kapitel 2.2.9.). Nach der Zentrifugation wird der Überstand zu einem Gemisch aus Antikörper (AK) (anti-NCAM AK 123C3) und Protein G-Sepharose gegeben, welches zuvor für 30 Minuten bei 4°C auf einem Rotator in einem LowBind-Reaktionsgefäß vorinkubiert wurde. Für eine 60 mm-Schale werden 5 µg 123C3-AK und 20 µL Protein G-Sepharose verwendet, je 100 mm-Schale 10 µg 123C3-AK und 30 µL Sepharose. Das Lysat wird über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wird bei 2800 x g für 2 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Sepharose-Pellet wird dreimal mit je 500 µL Ripa-Waschpuffer und einmal mit Aqua demin. (beides 4°C) gewaschen und zwischendurch jeweils für 2 Minuten bei 3300 x g (Ripa-Waschpuffer) bzw. 3800 x g (Aqua demin.) und 4°C zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wird das Pellet trockengesaugt und mit 20 µL 2-fach konzentriertem SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt. Nach kurzem Mischen auf dem Vortexer wird die Probe für 5 Minuten im Wasserbad auf 100°C erhitzt und nach erneutem vortexen bei RT für 2 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird entweder direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen oder in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

2.2.11. Proteinbestimmung

Eine Standardreihe wird mit bovinem Serumalbumin (BSA) hergestellt, welches in dem gleichen Puffer gelöst wird wie die Zellysate. Von den 10 verschiedenen BSA-Ansätzen mit Konzentrationen von 10 mg/mL bis 19,03 µg/mL, einem Nullwert, der nur Puffer enthält, sowie der zu untersuchenden Probe werden jeweils 5 µL in 3 Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert (Dreifachbestimmung). In jedes Well werden anschließend 25 µL der Reagenzien S und A des D_C Protein Assay (Bio-Rad, München) gegeben, die zuvor im Verhältnis 1:50 gemischt wurden. Nach weiterer Zugabe von 200 µL der Reagenz B und der folgenden Inkubation bei RT für 15 Minuten werden die Absorptionen bei 690 nm mit einem ELISA-Reader gemessen.

2.2.12. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine werden 1,5 mm dicke Gele mit entweder 6, 8 oder 10 % Polyacrylamid hergestellt (s. Tabelle 2.3.). Für die Elektrophorese wird das Minigel-System von Bio-Rad (München) verwendet.

Die Proben werden auf Eis aufgetaut und vor dem Auftragen mit 4-fach konzentriertem SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 100°C inkubiert. Zur Größenbestimmung der Proteine wird ein Molekulargewichtsstandard mit aufgetragen. Zunächst wandern die Proteine bei 35 mA im Sammelgel bis zur Grenze zwischen Sammel- und Trenngel. Anschließend erfolgt die Auftrennung bei 40 mA im Trenngel.

	6 % Trenngel	8 % Trenngel	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
Aqua demin.	10,6 mL	9,3 mL	7,9 mL	4,1 mL
Acrylamid-Lösung	4 mL	5,3 mL	6,7 mL	1,0 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	5 mL	5 mL	5 mL	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	-	750 µL
10 % (w/v) SDS	200 µL	200 µL	200 µL	60 µL
10 % (w/v) APS	200 µL	200 µL	200 µL	60 µL
TEMED	16 µL	12 µL	8 µL	6 µL

Tabelle 2.3.: Zusammensetzung der Gel-Lösungen für die SDS-PAGE

2.2.13. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Alle Schritte werden auf der Wippe bei RT durchgeführt. Das Gel wird für mindestens 20 Minuten in Fixierungslösung inkubiert und anschließend zweimal für 30 Minuten mit einer Waschlösung gewaschen. Danach erfolgt eine einminütige Behandlung des Geles mit einer Natriumthiosulfatlösung (Sensitivierungslösung), gefolgt von 3 Waschschritten für jeweils 20 Sekunden mit Aqua demin. Die Färbelösung wird für 20 Minuten auf das Gel gegeben und anschließend erneut dreimal für 20 Sekunden mit Aqua demin. abgewaschen. Dann wird das Gel so lange in die Entwicklerlösung gelegt, bis die Proteine als bräunliche Banden sichtbar werden. Durch Überführen des Geles in Stopplösung wird die Entwicklung beendet. In der Stopplösung wird das Gel für 10 Minuten belassen, bevor es dreimal für mehrere Minuten mit Aqua demin. gewaschen wird und zur Aufbewahrung bzw. Auswertung in Folie eingeschweißt werden kann.

2.2.14. Western Blot (Semi-Dry-Verfahren)

Das Trenngel wird nach der Elektrophorese für 20 Minuten in Transferpuffer gelegt. Auf die Anodenplatte der Blotkammer werden drei 3MM-Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran gelegt, die auch zuvor kurz in den Transferpuffer gelegt wurden. Auf die Membran wird das Gel gelegt und darüber erneut drei mit Transferpuffer getränkte

Filterpapiere. Dieser Blotstapel wird durch das Auflegen der Kathodenplatte geschlossen und der Transfer erfolgt bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 für 90 Minuten.

2.2.15. Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Die Membran wird für 30-60 Sekunden in Ponceau S-Färbelösung gelegt und anschließend so lange mit Aqua demin. gewaschen, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar sind. Nun werden die Markerbanden mit einem Bleistift markiert. Durch Waschen mit PBS und gleichzeitigem leichten Erwärmen wird die Membran wieder entfärbt.

2.2.16. Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Vor der AK-Behandlung wird die Nitrocellulosemembran mit 5 % Milchpulver (in TBS-T (TBS mit 0,05 % Tween-20)) für 1 Stunde bei RT auf der Wippe blockiert. Danach erfolgt die Inkubation mit dem primären AK (in 5 % Milchpulver/TBS-T) μN bei 4°C auf der Wippe. Die Membran wird darauf dreimal kurz und dreimal für 5-10 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären AK (in TBS-T) für 1 Stunde bei RT auf der Wippe erfolgt. Es wird erneut dreimal kurz und dreimal für 5-10 Minuten mit TBS-T und zusätzlich zweimal 5-10 Minuten mit TBS gewaschen, um unspezifisch gebundene AK zu entfernen.

Der Nachweis der AK-Bindung erfolgt durch die Peroxidase-gekoppelte Chemilumineszenzreaktion. Je nach erwarteter Signalstärke wird entweder das Super Signal West Pico oder Dura oder eine Mischung von beiden nach Herstellerangaben verwendet. Je Membran (6 x 9 cm) wird 250 μL Chemilumineszenzlösung benötigt. Das emittierte Licht wird auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Das Auflegen des Films erfolgt unter Lichtausschluss für wenige Sekunden bis mehrere Stunden. Anschließend wird der Film sofort für 30 Sekunden in Entwicklerlösung gelegt, kurz in Wasser geschwenkt und ca. 2 Minuten in Fixierlösung gelegt.

2.2.17. Eluierung von Antikörpern von Nitrocellulosemembranen

Für die Wiederverwendung einer Membran für weitere AK-Inkubationen wird die Membran zunächst für 5 Minuten bei RT auf der Wippe in TBS-T inkubiert. Dann wird die Membran für 10 Minuten in Eluierungslösung geschwenkt und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Darauf kann die Membran wie unter 2.2.16. beschrieben erneut blockiert und mit einem anderen AK behandelt werden.

2.2.18. Untersuchungen zur Endocytose von NCAM

Die B35-Zellen werden in einer Zelldichte von ca. 5×10^4 Zellen je Well einer 24-Well-Platte ausplattiert, so dass nach zwei Tagen eine Konfluenz von 50-60 % erreicht wird. Dies geschieht entweder auf sterilen, mit PLL beschichteten 12 mm Deckgläschen oder auf einem 24 Stunden zuvor ausplattierten Monolayer von L-Zellen. Einen Tag nach dem Ausplattieren werden die B35-Zellen einmal mit vorgewärmtem HBSS⁻ gewaschen und dann für 24 Stunden mit dbcAMP (4 μ L dbcAMP (250 mM) je mL OptiMEM) zu einem neuronalen Phänotyp ausdifferenziert. Nach erneutem Waschen mit HBSS⁻ wird die Endocytose mit Hilfe des gegen die extrazelluläre Domäne von NCAM gerichteten AK 123C3 induziert. Hierzu werden 500 μ L OptiMEM mit 2,5 μ g 123C3-AK je mL OptiMEM in jedes Well gegeben. Die Induktion der Endocytose findet für 30 oder 60 Minuten im Inkubator statt. Bei Kontrollen ohne Induktion werden die Zellen für die 30 oder 60 Minuten nur mit OptiMEM inkubiert.

Bei den Versuchen mit dem MEK-Inhibitor U0126 (Promega, USA) wird dieser gemeinsam mit dem AK in einer Konzentration von 100 μ M dem OptiMEM zugefügt. Die Kontrollen erhalten die gleiche Menge an DMSO, dem Lösungsmittel von U0126.

Anschließend werden die Zellen dreimal mit kaltem DMEM-H gewaschen und mit 8 %iger Formaldehydlösung (in 200 mM HEPES, pH 7,4) für 30 Minuten auf Eis fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit kaltem TBS werden die Membran-assoziierten NCAM-123C3-Komplexe mit einem Cy3-gekoppelten sekundären AK (anti-Maus-Cy3) markiert, der in Blockierungslösung (1 % BSA in TBS) für 30 Minuten bei RT auf die Zellen gegeben wird. Um sämtliche primäre NCAM-AK auf der Zelloberfläche abzusättigen, werden die Zellen nach erneutem zweimaligen Waschen mit TBS für 30 Minuten bei RT mit anti-Maus-Immunglobulinen (Endkonzentration: 0,25 mg/mL Blockierungslösung) inkubiert. Die Zellen werden anschließend einmal mit TBS gewaschen und noch einmal für 5 Minuten mit 8 %iger Formaldehydlösung auf Eis nachfixiert. Nach einmaligem Waschen mit TBS erfolgt die Permeabilisierung mit 0,5 % Triton X-100 (in 3 % BSA in TBS) für 30 Minuten bei RT. Das Triton X-100 wird durch dreimaliges Waschen mit TBS wieder entfernt, bevor der zweite sekundäre AK zur Detektion der internalisierten NCAM-123C3-Komplexe auf die Zellen gegeben wird. Dieser anti-Maus-Cy2 oder anti-Maus-DTAF (in Blockierungslösung) wird ebenfalls für 30 Minuten bei RT mit den Zellen inkubiert. Am Ende werden die Zellen dreimal mit TBS und einmal mit Aqua demin. gewaschen, bevor sie mit Permafluor auf Objektträgern fixiert werden.

Die Analyse erfolgt am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta). Die Auswertung erfolgt durch Auszählen der intrazellulären, grün fluoreszierenden Vesikel.

2.2.19. Untersuchungen zum „Shedding“ von NCAM140-eGFP in B35-Zellen

B35-Zellen werden auf Mat-Tek-Schalen oder sterilen 12 mm-Deckgläschen ausplattiert, so dass am folgenden Tag zur Transfektion eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht wird (ca. 10^5 Zellen). Die Mat-Tek-Schalen bzw. Deckgläschen werden zuvor mit PLL (0,1 mg/mL) beschichtet. Die Transfektion erfolgt wie in Kapitel 2.2.7.1. beschrieben mit der cDNA für NCAM140-eGFP. 2 Tage nach der Transfektion werden die Zellen einmal mit vorgewärmtem HBSS⁻ gewaschen und das „Shedding“ wird für 40 Minuten durch Zugabe von 20 μ L 10 mM Pervanadate je mL (Endkonz.: 200 μ M) in serumfreiem DMEM-H bei 37°C im Inkubator induziert. Kontrollzellen werden ohne Pervanadat in serumfreiem Medium für 40 Minuten kultiviert.

Da der Metalloprotease-Inhibitor GM6001 bereits 1 Stunde vor der Pervanadat-Behandlung zur Vorinkubation in einer Endkonzentration von 25 μ M zu dem Zellmedium gegeben wird, werden auch die Kontrollzellen sowie die nur mit Pervanadat behandelten Zellen bereits 60 Minuten vor Zugabe des Pervanadates einmal mit HBSS⁻ gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium kultiviert. Das Medium wird dann entfernt und die Zellen 40 Minuten mit 25 μ M GM6001 oder 200 μ M Pervanadat oder GM6001 und Pervanadat in DMEM-H inkubiert. Die Kontrollzellen werden in serumfreiem Medium gehalten.

20 Minuten vor Ende der Inkubation mit den Inhibitoren wird außerdem zu allen Zellen Lysotracker in einer Endkonzentration von 120 nM zur Anfärbung der Lysosomen hinzugefügt.

Die Versuche in Gegenwart von 10 μ M MEK-Inhibitor U0126 werden wie zuvor für GM6001 beschrieben durchgeführt (s. Abb. 2.1.).

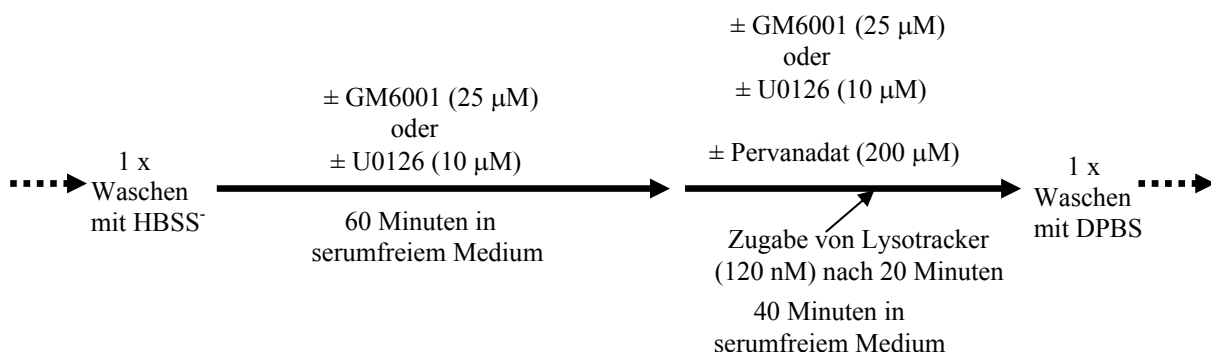


Abb. 2.1.: Schematischer Versuchsablauf der Untersuchungen zum „Shedding“ von NCAM140-eGFP in B35-Zellen

Cycloheximid (Sigma-Aldrich, Steinheim), ein Translations-Inhibitor, wird 30 Minuten vor Beginn der Pervanadat-Behandlung und während der gesamten 40-minütigen Pervanadat-Behandlung in einer Endkonzentration von 70 μM zu den Zellen gegeben.

Anschließend werden die Zellen einmal mit DPBS (4°C) gewaschen und für 30 Minuten im Dunkeln mit 4 %iger Formaldehydlösung (in DPBS) auf Eis fixiert. Eine weitere eventuelle AK-Behandlung erfolgt wie bei der indirekten Immunfluoreszenz (s. Kapitel 2.2.8.). Die Zellen werden am Ende mit Vectashield oder Permafluor eingedeckelt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen erfolgen an einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Plan-NEOFLUAR 100x/1,30 bzw. einem Plan-NEOFLUAR 63x/1,25 Öl-Objektiv oder mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (alle Mikroskope von Zeiss, Göttingen). Die Auswertung erfolgt durch Auszählen der intrazellulären, grün fluoreszierenden Vesikel sowie der rot fluoreszierenden Lysosomen. Außerdem wird die Anzahl der Vesikel je Zelle bestimmt, die sowohl grün (NCAM) als auch rot (Lysosomen) fluoreszieren.

2.2.20. „Shedding“ von NCAM140/180- Δ ENESKA in B35-Zellen

Die NCAM-negativen parentalen B35-Zellen werden so auf 60 mm-Schalen ausplattiert, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 70-80 % erreichen. Dann werden die Zellen (je 2 Schalen) mit der cDNA von NCAM140- und NCAM180-Wildtyp (NCAM140/180-WT) sowie NCAM140- und NCAM180- Δ ENESKA transfiziert (s. Kapitel 2.2.7.1.). Außerdem werden Zellen (ebenfalls 2 Schalen) mit leerem pcDNA3-Vektor transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion werden die Zellen zweimal mit HBSS⁻ gewaschen und in 2 mL serumfreiem Medium je Schale inkubiert. Je Transfektionsansatz werden Zellen einer Schale für 60 Minuten mit 200 μM Pervanadat inkubiert (s. Kapitel 2.2.19.). Die jeweils andere Schale dient als Kontrolle und wird für diese 60 Minuten in serumfreiem Medium kultiviert.

Nach Ablauf der Pervanadat-Behandlung wird das Medium der Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführt und EDTA (2 μL einer 0,5 M EDTA-Lösung je mL Medium) sowie PMSF (5 μL einer 0,2 M PMSF-Lösung je mL Medium) hinzugefügt. Um tote Zellen aus dem Medium zu entfernen, wird dieses sofort für 10 Minuten bei 4°C und 180 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend ebenfalls bei 4°C mit Hilfe von Amicon YM-30 Filtern nach Anleitung des Herstellers von 2 mL auf 50-60 μL konzentriert. Das Konzentrat wird bei -80°C eingefroren.

Die Zellen werden vorsichtig einmal mit kaltem DPBS gewaschen und anschließend mit Ripa-Lyse-Puffer lysiert (s. Kapitel 2.2.9.). Die Lysate werden ebenfalls bei -80°C eingefroren.

Die Medienkonzentrate und die Lysate werden auf Eis aufgetaut und durch SDS-PAGE aufgetrennt (s. Kapitel 2.2.12.). Anschließend wird das Gel wie in Kapitel 2.2.14. beschrieben auf Nitrocellulose transferiert und NCAM bzw. dessen Fragmente mit Hilfe der anti-NCAM AK 123C3, OB11 oder H-300 und entsprechenden POD-gekoppelten Zweit-AK detektiert. (s. Kapitel 2.2.16. und 2.2.17.).

2.2.21. Markierung von B35-Zellen mit DiI

Die Markierung von B35-Zellen, die auf einem Monolayer von COS-7- oder L-Zellen bzw. COS140 oder L140-Zellen ausplattiert werden, mit DiI erfolgt in T75-Flaschen bei einer Konfluenz ca. 90 %. Vor Zugabe von 5 mL DiI-Markierungslösung werden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem HBSS⁻ gewaschen. Nach ca. 15-20 Minuten werden die Zellen zweimal mit warmer isotonischer Glucoselösung gewaschen und weiter wie in Kapitel 2.2.5. beschrieben trypsinisiert, zentrifugiert und mit neuem Kulturmedium (ohne G418) resuspendiert. Die gewünschte Menge an Zellen wird nun auf 60 mm-Schalen ausplattiert, auf die bereits am Tag vorher die COS-7- oder L-Zellen ausgesät wurden.

2.2.22. Bestimmung von Neuritenlänge und –anzahl von B35-Zellen

Die B35-Zellen werden so auf Monolayern von COS-7- oder L-Zellen oder auf mit PLL beschichteten 60 mm-Schalen ausplattiert, dass nach 2 Tagen noch einzelne Zellen zu erkennen sind, die keinen Kontakt zu Nachbarzellen haben (ca. 10^5 Zellen/Schale). Werden die B35-Zellen auf Monolayern ausplattiert, geschieht dies sowohl bei den COS-7- wie auch bei den L-Zellen derart, dass die Zellen einmal auf untransfizierten und einmal auf stabil mit NCAM140-WT-transfizierten COS-7-/L-Zellen (COS140-/L140-Zellen) ausplattiert werden. Einen Tag nach dem Ausplattieren werden die Zellen einmal mit vorgewärmtem HBSS⁻ gewaschen und anschließend mit dbcAMP (4 μL dbcAMP (250 mM) je mL OptiMEM) für 22-24 Stunden ausdifferenziert. Zur Kontrolle wird von jeder untersuchten Zelllinie eine Schale außerdem mit 4 μL DMSO (dem Lösungsmittel von dbcAMP) je mL OptiMEM behandelt.

Bei den Versuchen mit dem MEK-Inhibitor U0126 wird dieser dem Kulturmedium 3 Stunden nach dem Ausplattieren in einer Endkonzentration von 10 μM zugefügt. Nach dem Medienwechsel (OptiMEM mit dbcAMP bzw. DMSO) wird U0126 erneut in der gleichen

Konzentration für die gesamten 22-24 Stunden zugeben. Die Kontrollen erhalten über den gleichen Zeitraum die entsprechende Menge DMSO.

Die ausdifferenzierten Zellen sowie die nicht differenzierten Kontrollzellen werden am Fluoreszenz- bzw. Lichtmikroskop (Axiovert 200, LD Plan-NEOFLUAR 20x/0,4 Objektiv; Zeiss, Göttingen) untersucht und mit einer AxioCam MRc (Zeiss, Göttingen) fotografiert. Die Auswertung der Neuritenlängen erfolgt mit der KS100-Software (Version 3.0) von Zeiss. Außerdem werden die Neuritenanzahl sowie die sekundären, tertiären usw. Verzweigungen aller Neuriten je Zelle bestimmt.

2.2.23. Untersuchungen zur Migration von B35-Zellen

2.2.23.1. Haptotaktische Zellmigrationsversuche

Mit Hilfe sogenannter Transwell-Kammern kann die Zellmigration durch eine Membran mit definierter Porengröße untersucht werden. Die Unterseite der Membran wird mit verschiedenen Extrazellulärmatrix- (ECM-) Proteinen beschichtet, zu denen die Zellen hinwandern.

Die Membranen der Transwell-Kammern (Corning Inc., USA, 8 µm Porendurchmesser) werden auf der Unterseite wie folgt beschichtet:

Beschichtung	Konzentration	Dauer/Temperatur
Fibronektin (Gibco, Karlsruhe)	20 µg/mL (in PBS) 100 µL je Membran	üN / 4°C
Laminin (Invitrogen, UK)	20 µg/mL (in serumfreiem Medium) 100 µL je Membran	üN / 4°C
ECM-Gemisch (Harbor Bio-Products, USA)	80 µg/mL (in Aqua demin.) 50 µL je Membran	2 Stunden / RT (eintrocknen lassen)

Tabelle 2.4.: Beschichtung der Transwell-Kammern für haptotaktische Zellmigrationsversuche

Nach der Beschichtung werden die Kammern 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten mit 2 %iger BSA-Lösung (in PBS) bei RT blockiert. Anschließend wird einmal für 5 Minuten mit serumfreiem Medium gewaschen und die Kammern danach in 500 µL serumfreies Medium gestellt. Während des Blockierens werden die Zellen mit 1 mL HBSS⁻/EDTA (5 mM) von den T75-Kulturflaschen gelöst und nach Zugabe von 5 mL serumfreiem DMEM-H bei 500 x g und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden in 6 mL serumfreiem Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe

eines Hemacytometers bestimmt. Anschließend werden 30.000 Zellen (in 100 μ L Medium) auf die Oberseite einer Transwell-Kammer pipettiert und diese für 20 Stunden in den Inkubator gestellt.

Nach den 20 Stunden werden die Zellen mit 4 % Formaldehyd (in DPBS) für 20 Minuten fixiert und anschließend dreimal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Zellen auf der Oberseite der Membran werden mit einem Wattestäbchen abgewischt, so dass nur noch die Zellen, die durch die Membran zu der beschichteten Unterseite migriert sind, übrig bleiben. Für jede untersuchte Zelllinie werden bei einer Transwell-Kammer die Zellen nicht von der Oberseite entfernt, um die Gesamtzahl der Zellen bestimmen zu können. Nach Bestimmung der Zellzahl auf der Oberseite der Membran werden sie entfernt und auch die durch diese Membran migrierten Zellen gezählt.

Die Anfärbung der Zellen erfolgt mit Gill's Formula Hematoxylin (Vector Laboratories, USA) für 10 Minuten, worauf die Kammern viermal für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen werden.

Die Kammern werden zur Auswertung mit der Membranunterseite auf einen Objektträger gestellt und mit einem 20x-Objektiv im Lichtmikroskop (Axiovert 200, Zeiss) untersucht. Je Membran werden entweder 4 willkürlich gewählte Sichtfelder oder die gesamte Fläche der Membran ausgezählt. Von den 4 Feldern wird anschließend der Mittelwert gebildet und die Mittelwerte der Zellzahlen der verschiedenen Zelllinien bzw. Bedingungen verglichen.

2.2.23.2. Timelapse-Migrationsversuche

Die zu untersuchenden B35-Zellen, die stabil mit NCAM140/180-WT oder verschiedenen NCAM-Mutanten transfiziert sind, werden 24 Stunden vor Beginn der Timelapse-Versuche auf 12-Well- oder 24-Well-Platten ausplattiert, nachdem sie zuvor mit HBSS/EDTA (5 mM) von den T75-Kulturflaschen abgelöst wurden. Je Vertiefung einer 12-Well-Platte werden ca. 15.000 Zellen ausplattiert, bei 24-Well-Platten ca. 7.000 Zellen.

Die 24-Well-Platten werden vorher mit PLL, ECM-Proteinen oder einem Monolayer von COS-7- bzw. COS140-Zellen wie in Tabelle 2.4. dargestellt beschichtet (bei Verwendung von 12-Well-Platten verdoppeln sich die Mengen):

Beschichtung	Konzentration/Menge	Dauer/Temperatur
PLL	20 µg/mL (in Aqua demin.) 0,5 mL je Well	30 Minuten / RT oder üN / 4°C
Laminin (Invitrogen, UK)	20 µg/mL (in serumfreiem Medium) 150 µL je Well	üN / 4°C
ECM-Gemisch (Harbor Bio-Products, USA)	80 µg/mL (in Aqua demin.) 150 µL je Well	2 Stunden / RT (eintrocknen lassen)
COS-7/COS140	3 x 10 ⁵ Zellen (in Kulturmedium) 0,5 mL je Well	24 Stunden / 37°C

Tabelle 2.5.: Beschichtungen der 24-Well-Platten für Timelapse-Migrationsversuche

Die Zellkerne werden ca. 2 Stunden vor Beginn der Versuche mit Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Steinheim) in einer Endkonzentration von 4 µM gefärbt. Hierzu werden die Zellen mit dem Farbstoff für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit HBSS⁻ gewaschen und mit frischem Kulturmedium versetzt. Werden die Zellen auf einem Monolayer von COS-7-/COS140-Zellen ausplattiert, erfolgt die Hoechst-Färbung bereits vor dem Ausplattieren.

Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes (Leica DMIRE2), bei dem die zu untersuchenden Zellen während der Betrachtungsperiode bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert werden können, werden in regelmäßigen Abständen Bilder von der selben Position einer Zellkulturschale aufgenommen. Mit Hilfe eines motorisierten Tisches und der Leica FW 4000 Software können in einem Versuch mehrere Positionen der Kulturschale immer wieder angesteuert werden. Auf den so entstehenden Filmen kann anschließend die Migration der Zellen ausgewertet werden.

24 Stunden nach dem Ausplattieren wird eine Position innerhalb eines Wells, auf dem möglichst viele Zellen ohne Kontakt zu Nachbarzellen zu erkennen sind, fotografiert. Anschließend wird die selbe Position über einen Zeitraum von 16 Stunden alle 30 Minuten fotografiert. Die Bilder werden mit einem 5x-Objektiv und einer DFC 350 FX-Kamera (Leica, GB) unter UV-Licht aufgenommen, so dass nur die gefärbten Zellkerne sichtbar sind.

Die Auswertung der Filme erfolgt mit dem Mtrack2-PlugIn der ImageJ-Software (entwickelt von W. Rasband, freie Software). Die Migration der einzelnen Zellen (= Bewegung der Zellkerne) wird von Bild zu Bild in Pixeln berechnet und am Ende werden alle 32 Werte addiert. Zellen, die das Sichtfeld des Objektivs verlassen oder innerhalb der 16 Stunden verblassen, werden nicht berücksichtigt.

2.2.24. Untersuchungen zur Phosphorylierung des Threonins 803 von NCAM140

2.2.24.1. Nachweis von freiem Phosphat mit Biomol GreenTM nach Freisetzung aus Phosphoproteinen mit Phosphatase

Die stabil mit NCAM140-WT, NCAM140-T803D und NCAM140-T803A transfizierten B35-Zellen werden auf 60 mm-Schalen ausplattiert und wie bei dem Endocytose-Versuch mit dbcAMP ausdifferenziert und mit dem anti-NCAM AK 123C3 für 60 Minuten inkubiert (s. Kapitel 2.2.18.). Je 60 mm-Schale werden 10 µg AK verwendet. Zur Kontrolle wird von jeder Zelllinie auch eine Schale ohne 123C3-AK kultiviert. Nach der AK-Behandlung werden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen und mit 200 µL Ripa Lyse-Puffer je Schale lysiert (s. Kapitel 2.2.9.). Anschließend wird eine Immunpräzipitation mit dem 123C3-AK durchgeführt (s. Kapitel 2.2.10.). Zur Proteinbestimmung werden dreimal 5 µL des Lysates eingesetzt (s. Kapitel 2.2.11.).

Das Präzipitat wird anders als in Kapitel 2.2.10. beschrieben nach der üN-Inkubation zweimal mit TBS und einmal mit Aqua demin. gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet mit 100 µL Phosphatase-Puffer, welcher vom Hersteller mitgeliefert wurde, versetzt und gut gemischt. Die Hälfte der Suspension wird zur Kontrolle abgenommen und die übrigen 50 µL mit 2 mM MnCl₂ sowie 100 U Lambda Proteinphosphatase (λ-PPase; New England Biolabs, USA) versetzt und sofort für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Sepharose wird anschließend bei RT und 10.000 x g abzentrifugiert und der Überstand (50 µL) in eine 96-Well-Platte überführt. Teilweise erfolgt eine weitere Verdünnung mit Phosphatase-Puffer, da in der unverdünnten Probe häufig eine milchige Trübung zu erkennen war. Nach Zugabe von 100 µL Biomol GreenTM (Biomol, Hamburg) erfolgt die Farbreaktion bei RT. Die Absorption im ELISA-Reader wird nach 30 Minuten bei 600 nm gemessen.

Die zur Kontrolle abgenommene Sepharose in Phosphatase-Puffer wird 5 Minuten gekocht, die Sepharose abzentrifugiert und 30 µL des Überstandes mit 10 µL 4-fach konzentriertem SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt. Ebenso wird die abzentrifugierte Sepharose (nach Phosphatase-Behandlung) in 2-fach konzentriertem SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten gekocht, erneut zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Diese und weitere Kontrollen (Lysat, Überstand nach der Immunpräzipitation) werden auf ein SDS-Gel aufgetragen und im Western-Blot mit dem 123C3-AK analysiert (s. Kapitel 2.2.12.).

2.2.24.2. Färbung von Phosphoproteinen mit Pro-Q Diamond™

Die stabil mit NCAM140-WT, NCAM140-T803D und NCAM140-T803A transfizierten B35-Zellen werden auf je vier 60 mm-Schalen ausplattiert. Nach einem Tag und Erreichen einer 60-70 %igen Konfluenz werden alle stabil transfizierten Zellen mit der cDNA für erk2 mit Lipofectamine Plus™ transfiziert (s. Kapitel 2.2.7.1.). Einen Tag nach der Transfektion werden die Zellen für 22-24 Stunden mit dbcAMP in OptiMEM ausdifferenziert und anschließend mit 10 µg 123C3-AK je 60-mm Schale für 60 Minuten inkubiert (s. Kapitel 2.2.18.). Die Kontrollzellen werden ebenfalls in OptiMEM kultiviert. Nach der AK-Behandlung werden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen und mit 200 µL Ripa Lyse-Puffer, welcher zusätzlich 0,2 µM Calyculin A und 40 mM NaF enthält, je Schale lysiert (s. Kapitel 2.2.9.) und anschließend wird mit dem 123C3-AK eine Immunpräzipitation durchgeführt (s. Kapitel 2.2.10.). Die Zellysate der zwei jeweils gleich behandelten Schalen werden dabei nach dem Lysieren für eine Immunpräzipitation vereint.

Die Präzipitate werden mit einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wird üN fixiert, wobei die Fixierungslösung (Zusammensetzungen der Lösungen s. Kapitel 2.1.10.3.) nach den ersten 30 Minuten einmal gewechselt wird. Anschließend wird das Gel dreimal für je 10 Minuten mit Aqua demin. gewaschen. Die Anfärbung erfolgt für 90 Minuten im Dunkeln auf der Wippe in einem mit absolutem Ethanol ausgespülten Plastikgefäß. Der Farbstoff Pro-Q Diamond™ (Molecular Probes, USA) wird vorher 1:4 mit Aqua demin. verdünnt. Für ein 9 x 6 cm großes Gel werden 40 mL Färbelösung benötigt. Um eine Hintergrundfluoreszenz zu verhindern, wird das Gel dreimal 30 Minuten im Dunkeln mit je 100 mL Entfärbelösung und zweimal 5 Minuten mit Aqua demin. gewaschen.

Die Fluoreszenz der Phosphoproteine wird in einem Typhoon Scanner (GE Healthcare, UK) sichtbar gemacht (Anregungswellenlänge: 532 nm; Emissionsfilter: 610 nm).

Anschließend wird das Gel zur Kontrolle mit Silber gefärbt (s. Kapitel 2.2.13.).

2.2.25. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung für den Vergleich zwischen mehreren Gruppen erfolgte mit dem Programm SPSS (SPSS GmbH Software, München) für Windows durch die Anwendung eines ungepaarten t-Tests. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen der Timelapse-Versuche wurden außerdem auf Normalverteilung getestet. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Die graphischen Darstellungen der Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, USA) erstellt. Dazu wurden die errechneten Mittelwerte mit dem SEM (standard error of the mean) dargestellt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur Bedeutung der T803A- und T803D-Mutationen von NCAM140 für Neuritenwachstum und Endocytose

Im Rahmen meiner Diplomarbeit „Einfluss von Aminosäuremutationen im cytosolischen Bereich von NCAM auf Neuritenlängenwachstum und Endocytose“ (Goschzik, 2004) wurden die beiden NCAM140-Mutanten hergestellt, bei denen das Threonin 803 (T803) innerhalb der cytosolischen Domäne von NCAM140 mittels zielgerichteter Mutagenese entweder gegen Alanin (NCAM140-T803A) oder gegen Aspartat (NCAM140-T803D) ausgetauscht wurde. B35-Neuroblastomzellen wurden anschließend stabil mit den mutierten cDNAs transfiziert und das Verhalten dieser Zellen bzgl. Neuritenwachstum und Endocytose von NCAM im Vergleich zu NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen untersucht.

Weitere Untersuchungen an diesen Mutanten sollen im Rahmen dieser Arbeit die zuvor erhaltenen Ergebnisse bestätigen und weitere Erkenntnisse über die Funktion des T803 ergeben.

3.1.1. Vergleich des Neuritenwachstums auf COS-7- und L-Zellen

In der oben genannten Diplomarbeit wurde bereits das Neuritenwachstum der beiden NCAM140-Mutanten im Verhältnis zu NCAM140-WT-exprimierenden B35-Zellen auf PLL sowie auf COS-7- und NCAM140-exprimierenden COS-7- (COS140-) Zellen untersucht.

Auf PLL zeigten beide Mutanten sowohl im ausdifferenzierten Zustand als auch ohne dbcAMP ein gegenüber dem Wildtyp verstärktes Neuritenwachstum (s. Tabelle 3.1.).

Um auszuschließen, dass zellspezifische Effekte für die Ergebnisse der Messungen auf Monolayern von COS-7-Zellen verantwortlich waren, wurden die Versuche auf L-Zellen, einer Fibroblasten-Zelllinie, wiederholt. Wie bei den COS-7/COS140-Monolayern wurden die B35-Zellen vor dem Ausplattieren auf L-Zellen bzw. NCAM140-exprimierenden L-Zellen (L140-Zellen) mit DiI angefärbt und entweder mit dbcAMP in einen stärker neuronal ausgeprägten Zelltyp (Schubert et al., 1974) ausdifferenziert oder zur Kontrolle mit der entsprechenden Menge an DMSO, dem Lösungsmittel von dbcAMP, behandelt (s. Kapitel 2.2.21./22.).

	NCAM140-WT	NCAM140-T803A	NCAM140-T803D
Kontrolle	42,4 ± 1,4	57,4 ± 2,3	63,8 ± 2,3
dbcAMP	57,4 ± 1,4	105,6 ± 3,1	88,6 ± 2,6

Tabelle 3.1.: Übersicht der durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM nach Behandlung mit dbcAMP oder Kontrollen mit entsprechender Menge DMSO von NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf PLL als Substrat (aus Goschzik, 2004)

Es wurden nur Neuriten in die Messung einbezogen, die mindestens 5 µm lang waren und die Zellen, deren Neuriten gemessen wurden, durften lediglich Kontakt zu dem Monolayer haben, jedoch nicht zu anderen B35-Zellen. Außerdem durften die Zellen keine lichtmikroskopisch sichtbaren Schädigungen der Membran oder von Zellkompartimenten aufweisen und, sofern dies erkennbar war, nur einen Zellkern aufweisen. Entartete Zellen sowie Zellen, bei denen

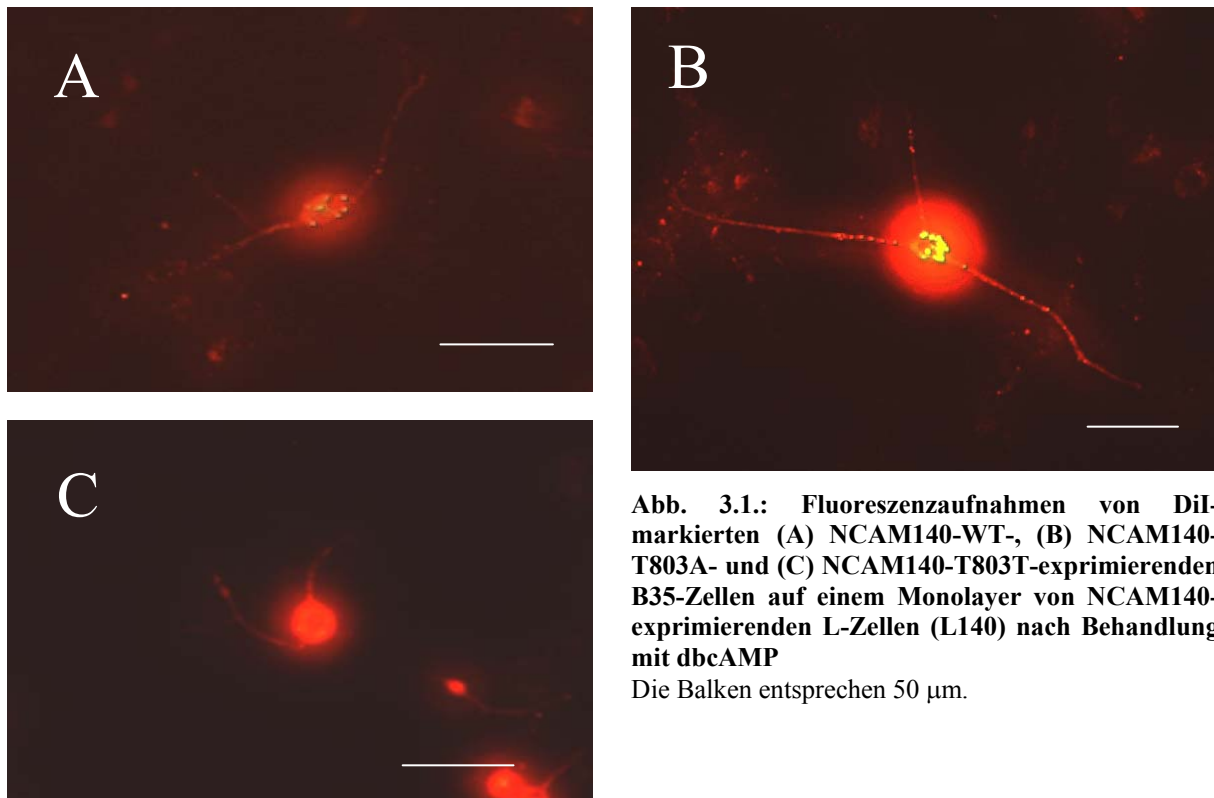


Abb. 3.1.: Fluoreszenzaufnahmen von DiI-markierten (A) NCAM140-WT-, (B) NCAM140-T803A- und (C) NCAM140-T803T-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von NCAM140-exprimierenden L-Zellen (L140) nach Behandlung mit dbcAMP

Die Balken entsprechen 50 µm.

Mitose-bedingt zwei Zellkerne sichtbar waren, wurden von der Messung ausgeschlossen. Bei sich verzweigenden Neuriten wurde lediglich der Hauptzweig gemessen.

Abb. 3.1. zeigt beispielhaft jeweils ein Bild mit DiI-gefärbten NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen nach Behandlung mit dbcAMP auf einem Monolayer von L140-Zellen. Es ist zu erkennen, dass sich die gefärbten B35-Zellen deutlich von dem nur schwach und unspezifisch leuchtenden Monolayer abheben.

In Abb. 3.2a. und 3.2b. sind die Ergebnisse der Neuritenmessungen gegenübergestellt. Um sämtliche Signifikanzen übersichtlich darzustellen, sind in Abb. 3.2a. nur die mit dbcAMP ausdifferenzierten Zellen den Kontrollzellen auf dem gleichen Monolayer, also entweder L- oder L140-Zellen bzw. COS-7- oder COS140-Zellen, gegenübergestellt. Abb. 3.2b. zeigt hingegen in einem Balkendiagramm lediglich die Kontrollzellen oder die ausdifferenzierten Zellen, wobei dort jeweils die Zellen, die auf untransfizierten L- bzw. COS-7-Zellen ausplattiert wurden, mit jenen verglichen werden, die auf einem Monolayer von NCAM140-WT-transfizierten Zellen ausgesät wurden. Tabelle 3.2. zeigt nochmals die durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von sämtlichen Bedingungen aus Abb. 3.2a. bzw. 3.2b.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Neuritenwachstum auf COS-7- und L-Zellen zwar leichte Unterschiede in einzelnen Werten aufweist, im wesentlichen jedoch vergleichbar ist. Vor allem fällt auf, dass die NCAM140-exprimierenden L-Zellen erst nach dem Ausdifferenzieren der B35-Zellen mit dbcAMP einen stimulierenden Effekt auf das Neuritenwachstum haben. Auf COS140-Zellen tritt dieser Effekt, vor allem bei NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen, auch schon ohne Ausdifferenzierung auf.

Außerdem ist zu erkennen, dass die Behandlung mit dbcAMP in allen Fällen zu einer signifikanten Steigerung des Neuritenwachstums führt. Lediglich auf COS140-Zellen haben die NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen auch ohne dbcAMP bereits so lange Ausläufer, dass diese durch das Ausdifferenzieren nur noch geringfügig und nicht signifikant länger werden.

Des Weiteren sind die Vergleiche zwischen dem Wildtyp und den beiden Mutanten vor allem auf NCAM140-transfizierten COS-7- bzw. L-Zellen nach Behandlung mit dbcAMP identisch. Sowohl auf COS140- als auch auf L140-Zellen zeigt die NCAM140-T803A-Mutante das stärkste Neuritenwachstum, während die NCAM140-T803D-Mutante signifikant kürzere Ausläufer bildet als der Wildtyp. Dieser Effekt ist aber auch unter den meisten anderen Bedingungen sichtbar. Eine Ausnahme stellt die NCAM140-T803A-Mutante auf COS140 ohne dbcAMP sowie auf COS-7-Zellen mit dbcAMP dar. Hier sind in beiden Fällen

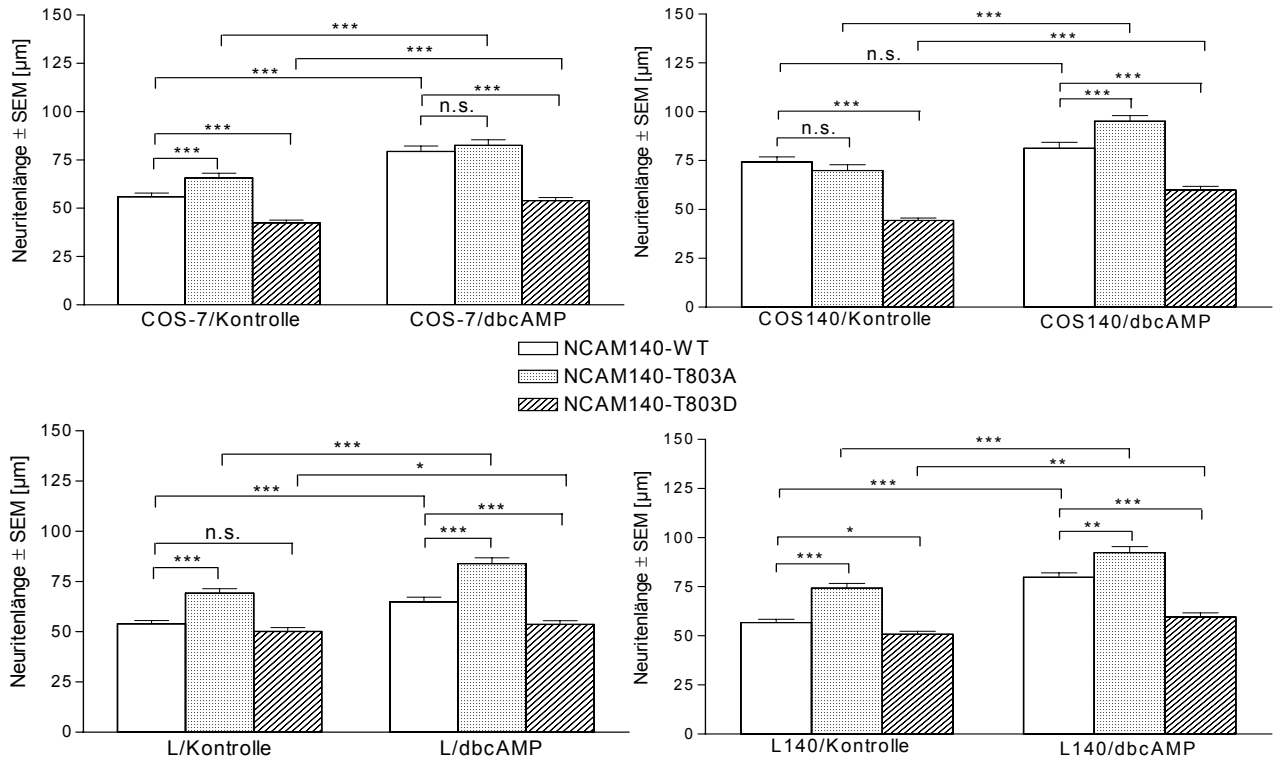


Abb. 3.2a.: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM von NCAM140-WT/-T803A/-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS-7-/L-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung (links) oder COS140-/L140-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung (rechts)

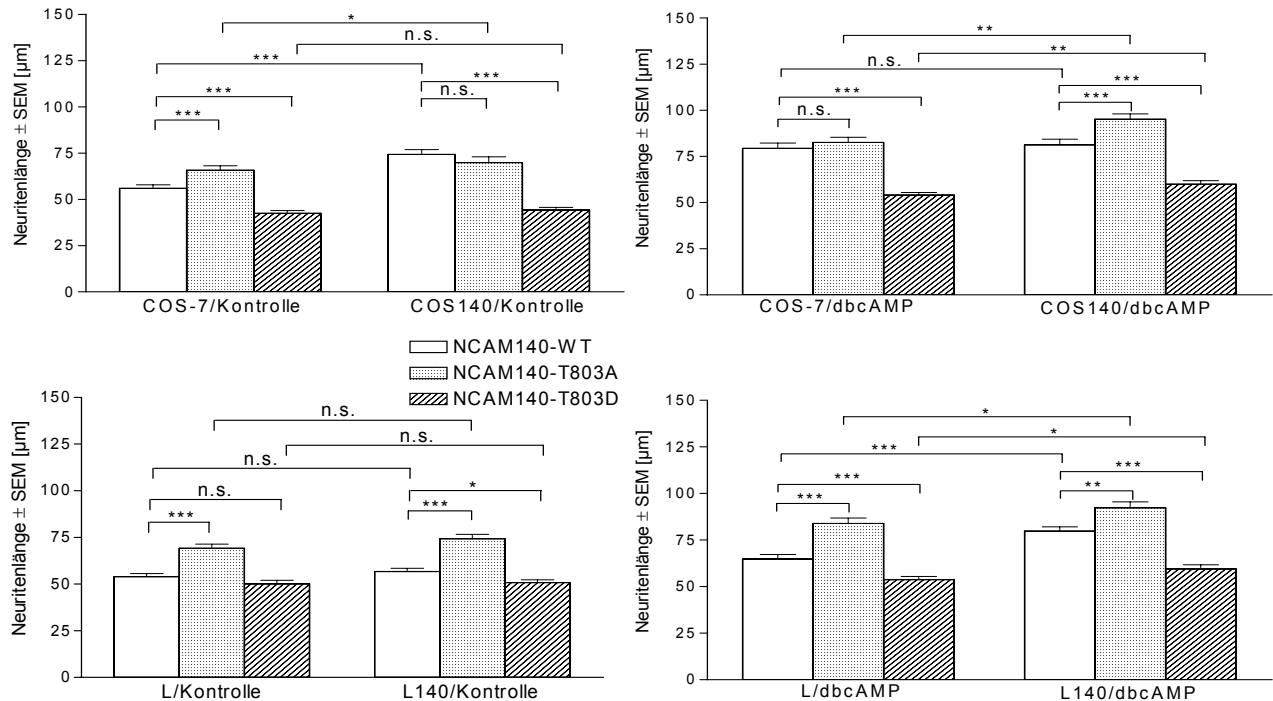


Abb. 3.2b.: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM von NCAM140-WT/-T803A/-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS-7-/L-Zellen oder COS140-/L140-Zellen ohne (Kontrollen, links) oder mit dbcAMP-Behandlung (rechts)

In den Kontrollversuchen wurden die Zellen anstatt mit dbcAMP nur mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und jeweils von jeder Bedingung zwischen 70 und 120 Neuriten gemessen.

*** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

		COS-7-Zellen	L-Zellen	COS140-Zellen	L140-Zellen
NCAM140-WT	Kontrolle	55,9 ± 2,1	54,0 ± 1,6	74,3 ± 2,6	56,7 ± 1,6
	dbcAMP	79,4 ± 2,9	62,6 ± 1,5	81,4 ± 3,3	78,3 ± 2,3
NCAM140-T803A	Kontrolle	65,8 ± 2,4	69,1 ± 2,3	70,0 ± 3,0	74,3 ± 2,4
	dbcAMP	82,7 ± 2,9	83,9 ± 2,9	95,2 ± 2,8	92,4 ± 3,1
NCAM140-T803D	Kontrolle	42,5 ± 1,4	50,1 ± 2,0	45,1 ± 1,3	50,9 ± 1,4
	dbcAMP	53,1 ± 1,5	54,8 ± 1,3	60,0 ± 1,8	59,0 ± 1,4

Tabelle 3.2.: Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM nach Behandlung mit dbcAMP oder nur mit der entsprechenden Menge DMSO (Kontrollen) von NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS-7-/L-Zellen und COS140/L140-Zellen

die Ausläufer der NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen nicht signifikant unterschiedlich zu denen der Mutante. Unter diesen beiden Bedingungen sind aber auf L- bzw. L140-Zellen jeweils signifikant längere Neuriten gemessen worden.

Andererseits zeigt die NCAM140-T803D-Mutante auf L-Zellen ohne Ausdifferenzierung im Vergleich zum Wildtyp nur wenig kürzere Neuriten. Auf COS-7-Zellen ist dieser Unterschied aber wiederum signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unterschiedliche Zellsysteme, auf denen das Neuritenwachstum gemessen wird, dieses Wachstum generell unterschiedlich beeinflussen können. Es war jedoch eindeutig erkennbar, dass auf beiden verwendeten Zelllinien die NCAM140-T803A-transfizierten B35-Zellen längere, die NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen hingegen kürzere Neuriten als die NCAM140-WT-transfizierten Zellen ausbilden.

3.1.2. Messung der Neuritenlängen nach Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126

Um zu untersuchen, ob die MAP-Kinase tatsächlich das T803, welches sich innerhalb einer Konsensussequenz für diese Kinase befindet, phosphorylieren kann und dies für das Neuritenwachstum von Bedeutung ist, wurde der Inhibitor U0126 der MAP-Kinase-Kinase MEK eingesetzt.

Dieser Versuch wurde nur mit den NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf COS140- sowie L140-Zellen nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP durchgeführt.

Der Inhibitor wurde in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt (s. Kapitel 2.2.22.) und in den Kontrollversuchen die entsprechende Menge DMSO, dem Lösungsmittel von U0126, zugefügt.

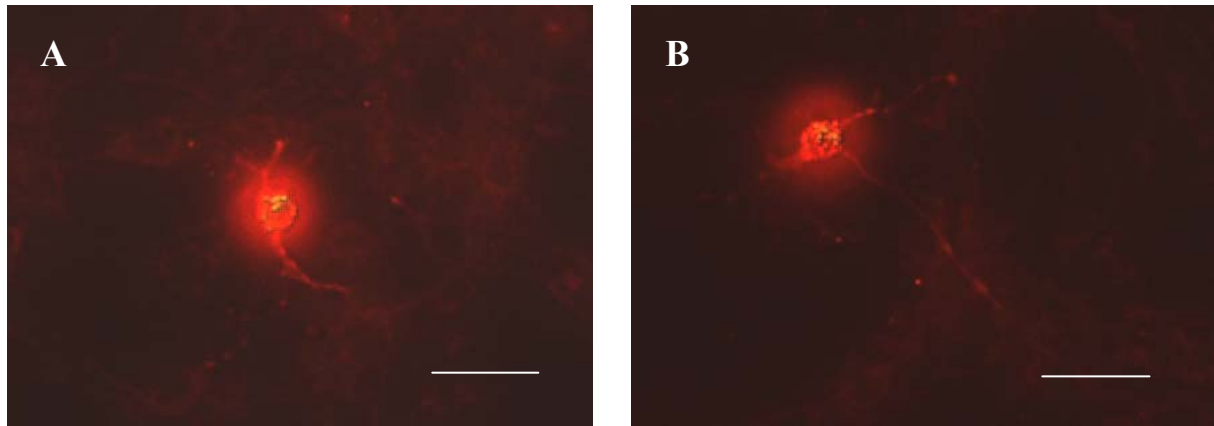


Abb. 3.3.: Fluoreszenzaufnahmen von DiI-markierten (A) NCAM140-WT- und (B) NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen auf einem Monolayer von NCAM140-exprimierenden L-Zellen (L140-Zellen) nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP und Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126

Die Balken entsprechen 50 μm .

Die Abb. 3.3. zeigt beispielhaft jeweils ein Bild mit DiI-gefärbten NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen nach Behandlung mit U0126 auf einem Monolayer von L140-Zellen. Die vergleichbaren Zellen ohne U0126 sind bereits in Abb. 3.1. dargestellt.

In Abb. 3.4. ist zu erkennen, dass die Mutante auf COS140- und auf L140-Zellen wie bereits in Kapitel 3.1.1. gezeigt signifikant kürzere Neuriten macht als der Wildtyp, auch wenn bei diesen zu einem späteren Zeitpunkt gemachten Versuchen die Neuriten zumindest auf den COS140-Zellen insgesamt länger sind als bei den früheren Versuchen. Sowohl auf den COS140- als auch auf den L140-Zellen führt der Einsatz des MEK-Inhibitors U0126 bei NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen zu einer signifikanten Verkürzung der Neuritenlänge im Vergleich zu den Kontrollzellen auf in etwa das Niveau der NCAM140-T803D-transfizierten Zellen ohne Inhibitor. Bei diesen Zellen lässt sich durch den Einsatz des U0126 das Neuritenwachstum nicht weiter reduzieren. Auf beiden Monolayern ist sogar ein leichter, im Falle der COS140-Zellen schwach signifikanter Anstieg des Neuritenwachstums der T803D-exprimierenden Zellen in Gegenwart von U0126 im Vergleich zu dem der selben Zellen ohne U0126-Behandlung zu beobachten. Diese Untersuchungen zeigen aber prinzipiell, dass eine direkte oder indirekte Phosphorylierung von T803 durch die MAP-Kinase von Bedeutung ist für das durch NCAM stimulierte Neuritenwachstum.

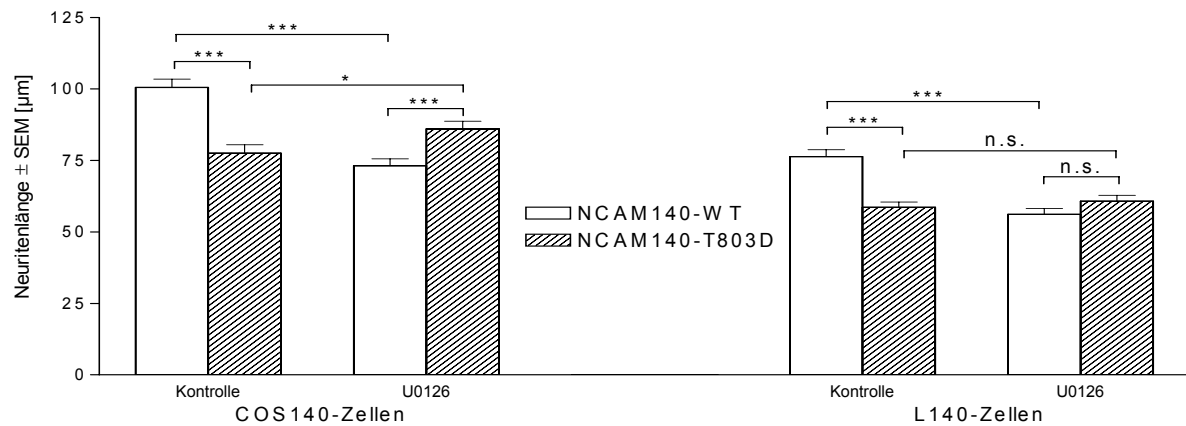


Abb. 3.4.: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von NCAM140-WT/-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS140- oder L140-Zellen nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP und ohne (Kontrollen) oder mit Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126

Die Kontrollversuche wurden anstatt mit U0126 mit der entsprechenden Menge DMSO durchgeführt. Der Versuch wurde dreimal (Kontrollen auf COS140 fünfmal) durchgeführt und jeweils von jeder Bedingung zwischen 70 und 120 Neuriten gemessen.

*** = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

In Tabelle 3.3. sind noch einmal die durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von sämtlichen Bedingungen aus Abb. 3.4. dargestellt.

		COS140-Zellen	L140-Zellen
NCAM140-WT	Kontrolle	100,6 \pm 2,9	76,44 \pm 2,4
	U0126	73,3 \pm 2,4	56,2 \pm 2,0
NCAM140-T803D	Kontrolle	77,8 \pm 2,2	58,6 \pm 1,9
	U0126	86,1 \pm 2,6	60,75 \pm 2,0

Tabelle 3.3.: Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM nach Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP und Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 oder nur mit der entsprechenden Menge DMSO (Kontrollen) von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf Monolayern von COS140- oder L140-Zellen

3.1.3. Endocytose von NCAM140-T803A und NCAM140-T803D

Frühere Untersuchungen auf mit PLL beschichteten Deckgläschen haben gezeigt, dass der Austausch des T803 von NCAM140 gegen Aspartat zu einem signifikanten Anstieg der endocytierten NCAM140-haltigen Vesikel nach Induktion der Endocytose mit dem gegen NCAM gerichteten Antikörper 123C3 (123C3-AK) im Vergleich zum Wildtyp ($4,96 \pm 0,4 \rightarrow 8,26 \pm 0,6$) führte. Im Vergleich zu NCAM140-WT führte die Mutation zu Alanin zu keiner signifikanten Veränderung der Vesikelanzahl ($4,96 \pm 0,4 \rightarrow 5,7 \pm 0,5$; Goschzik, 2004).

Bei der Untersuchung der Vesikelanzahl verschiedener Wildtyp-Klone mit unterschiedlichem NCAM140-Expressionslevel waren keine signifikanten Unterschiede festgestellt worden (Kominek, 2004).

Ohne die Induktion der Endocytose mit dem 123C3-AK war keine konstitutive Endocytose von NCAM140 in B35-Zellen zu erkennen, nur in wenigen Zellen waren vereinzelte NCAM-haltige Vesikel sichtbar (s. Quade, 2004; Diestel, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Auswertung der an einem konfokalen Mikroskop angefertigten Bilder erfolgte durch Auszählen der grün fluoreszierenden intrazellulären Vesikel. Diese mussten deutlich innerhalb der Zellmembran lokalisiert und eindeutig als Vesikel zu erkennen sein. Großflächige, grünliche Schleier oder übergroße Grünflächen wurden nicht gezählt. In den Neuriten oder Wachstumskegeln identifizierte Vesikel wurden nur dann gezählt, wenn auch diese Vesikel eindeutig innerhalb der Zellmembran lokalisiert waren. Alle Bilder wurden außerdem noch von mindestens einer weiteren Person ausgewertet. Dies führte allerdings in keinem Fall zu einem signifikant anderen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Bei einzelnen Versuchsreihen erfolgte die Auswertung außerdem per Pixel-Analyse mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ. Hierbei wurde ein Quotient der grünen Pixel innerhalb einer Zelle zur Gesamtpixelzahl der Zelle gebildet. Auch diese Art der Auswertung war jedoch nicht frei von menschlichem Ermessen. So hing das Ergebnis zum Einen von der Umrandung der Zelle ab, die per Freihandzeichnung erfolgen musste. Außerdem erfolgte die Festlegung des Schwellenwertes, welche Pixel grün waren, mit Augenmaß. Geringe Unterschiede dieses Schwellenwertes konnten schon zu deutlichen Veränderungen des Quotienten führen (s. auch Schaefer, 2006).

Ein Vergleich beider Auswertungs-Methoden führte zwar in einzelnen Fällen zu geringen, teilweise sogar leicht signifikanten Abweichungen, grundsätzlich waren die Ergebnisse jedoch vergleichbar. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ausschließlich das Auszählen der Vesikel für die Auswertung der Endocytose-Versuche angewendet.

3.1.4. Endocytose nach Behandlung der Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126

Wie schon bei der Messung der Neuritenlängen wurde ebenfalls der Einfluss des Inhibitors U0126 der MAP-Kinase-Kinase MEK auf die Endocytose von NCAM140 untersucht. In Abb. 3.5. sind beispielhaft jeweils zwei Bilder der NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen sowie der beiden Mutanten mit oder ohne Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 gezeigt.

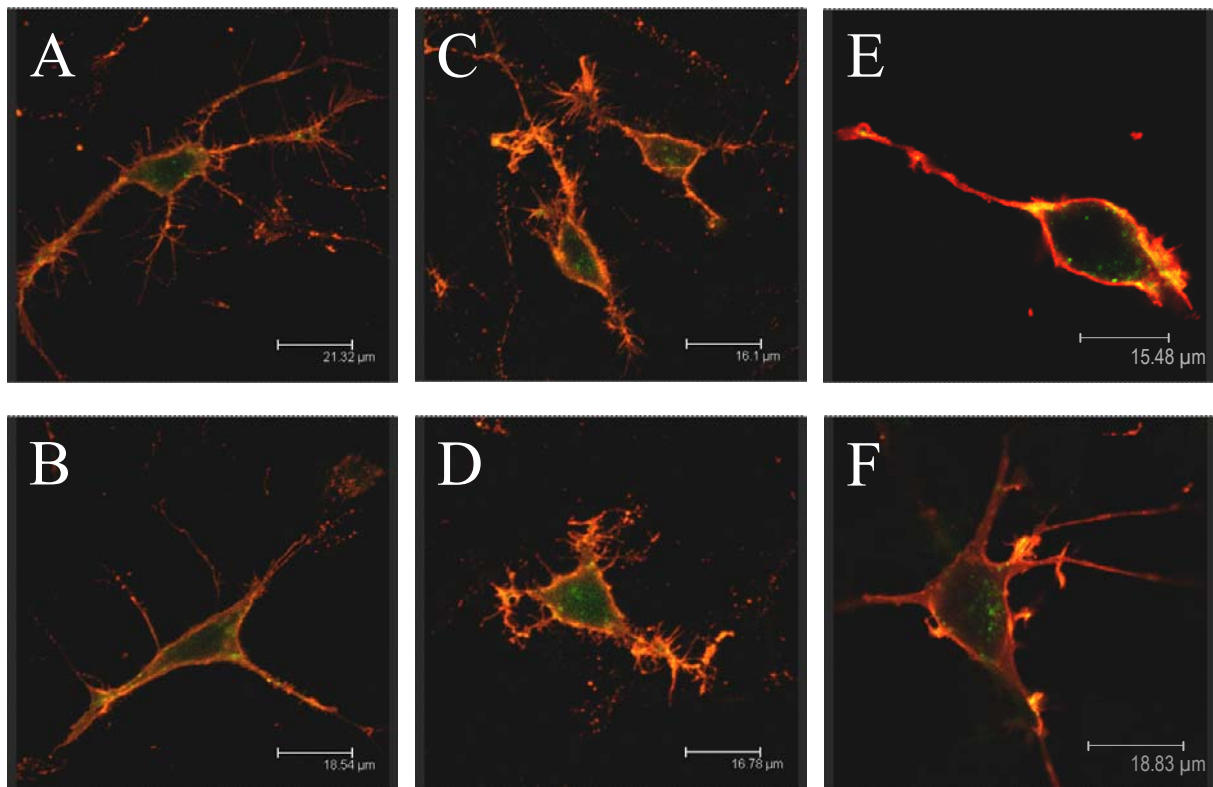


Abb. 3.5.: Untersuchungen der Endocytose ohne (A, C, E) oder mit Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 (B, D und F) von NCAM140-WT- (A und B), NCAM140-T803A- (C und D) und NCAM140-T803D- (E und F) exprimierenden B35-Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie

Der Nachweis von zelloberflächenexprimiertem NCAM wurde nach 30-minütiger Inkubation der B35-Zellen mit dem gegen humanes NCAM gerichteten monoklonalen AK 123C3 und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK durchgeführt. Nach Absättigung von freigebliebenen Bindungsstellen des NCAM-AK für den Zweit-AK mit einem Überschuss an polyklonalem anti-Maus-IgG und Permeabilisieren der Zellen wurden Vesikel mit endocytierten NCAM-AK-Komplexen mit einem DTAF- oder Cy2-gekoppelten Zweit-AK nachgewiesen.

Zunächst wurde nur die NCAM140-T803D-Mutante mit dem Wildtyp verglichen (s. Abb. 3.6a.). Hierbei führte der Einsatz des Inhibitors bei NCAM140-WT-exprimierenden Zellen zu einem signifikanten Rückgang der endocytierten NCAM-haltigen Vesikel von $5,5 \pm 0,5$ auf $3,0 \pm 0,4$. Bei der Mutante war hingegen nur ein sehr leichter, nicht signifikanter Rückgang von $8,7 \pm 0,6$ auf $8,1 \pm 0,7$ zu erkennen. Der Austausch des T803 gegen die eine Dauerphosphorylierung simulierende Aminosäure Aspartat bewirkt also, dass auch nach Inhibierung der MAP-Kinase die induzierte Endocytose von NCAM nicht beeinflusst wird.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurde dieser Versuch auch mit den NCAM140-T803A-exprimierenden B35-Zellen durchgeführt. Auch bei diesem Versuch führte der Einsatz des Inhibitors U0126 beim Wildtyp zu einem signifikanten Rückgang der Vesikelanzahl. Während bei den Versuchen mit den NCAM140-T803D-exprimierenden Zellen jedoch das Niveau insgesamt sehr ähnlich dem früherer Versuche ohne U0126 war (s. Kapitel 3.1.3.), ist das Niveau in diesem Fall, wie in Abb. 3.6b. zu erkennen ist, deutlich höher. So liegt hier die Vesikelanzahl beim Wildtyp ohne U0126 bei $11,6 \pm 0,9$ und geht nach Behandlung mit dem Inhibitor signifikant auf $8,0 \pm 1,0$ zurück.

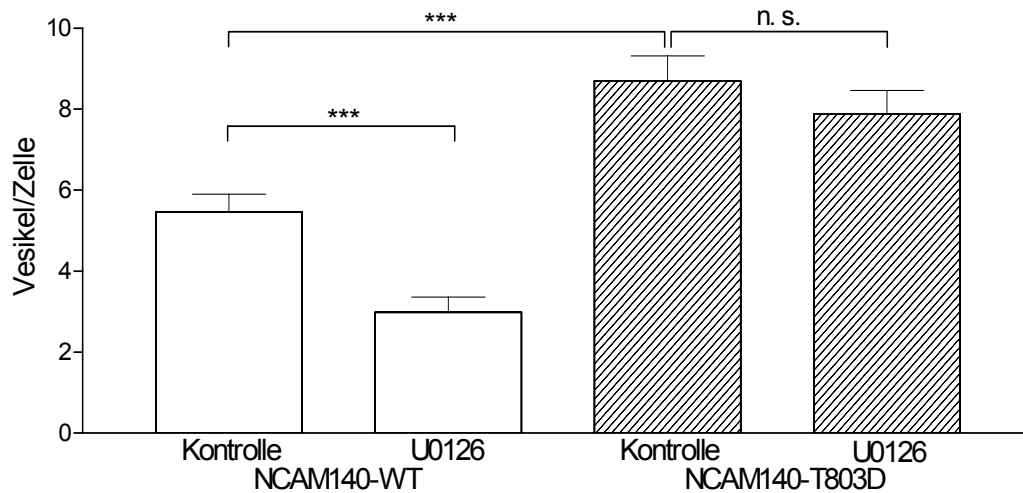


Abb. 3.6a.: Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 und Behandlung mit 100 μ M U0126 auf PLL als Substrat

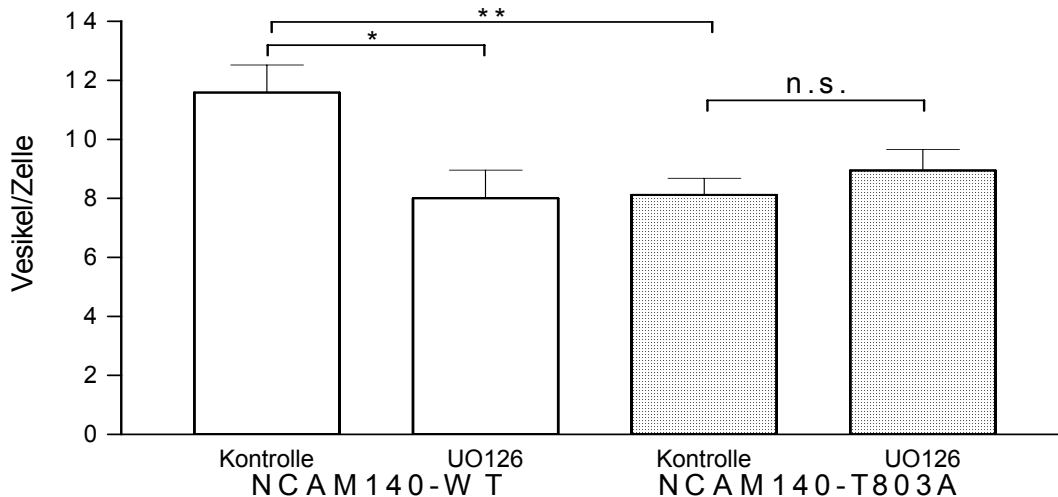


Abb. 3.6b.: Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803A-transfizierten B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 und Behandlung mit 100 μ M U0126 auf PLL als Substrat

Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und bei jeweils von jeder Bedingung zwischen 10 und 15 Zellen ausgewertet.

*** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Im Gegensatz zu den früheren Versuchen ist in diesem Fall jedoch ein leicht signifikanter Rückgang der Vesikelanzahl bei den NCAM140-T803A-exprimierenden Zellen ohne U0126 im Vergleich zu den NCAM140-WT-exprimierenden Zellen zu erkennen. Mit Inhibitor konnte ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Vesikelanzahl je Zelle von $8,1 \pm 0,6$ auf $8,9 \pm 0,7$ beobachtet werden. Auch nach dem Austausch des T803 gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin ist also kein Effekt des MEK-Inhibitors zu erkennen. Zum Bestätigen der Ergebnisse wurden die Versuche später noch einmal mit beiden Mutanten gleichzeitig wiederholt (Daten nicht gezeigt). Auch wenn bei diesem Versuch die Absolutwerte noch höher lagen, konnten die ursprünglichen Ergebnisse verifiziert werden. So

wies die NCAM140-T803D-Mutante erneut ohne MEK-Inhibitor mehr Vesikel auf als der Wildtyp, die NCAM140-T803A-exprimierenden Zellen hingegen geringfügig weniger. Allerdings führte der Einsatz des Inhibitors bei diesem Versuch bei beiden Mutanten zu einer schwach signifikanten Reduzierung der Vesikelanzahl. Diese Reduzierung fiel jedoch deutlich geringer aus als bei den NCAM140-WT-exprimierenden Zellen, bei denen erneut ein ca. 50 %iger Rückgang der Vesikelanzahl nach Behandlung der Zellen mit dem U0126 im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen zu beobachten war.

3.1.5. Endocytose auf L-Zellen

Um zu analysieren, ob auf physiologischeren Substraten als PLL Endocytose von NCAM in ähnlicher Weise wie auf PLL stattfindet bzw. beeinflusst wird, wurde die Endocytose von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von L-Zellen untersucht. Der Vergleich mit NCAM140-exprimierenden L-Zellen (L140) war in diesem Fall nicht möglich, da der anti-NCAM-AK 123C3 sonst auch an alle L140-Zellen gebunden hätte und eine Unterscheidung zwischen L140- und B35-Zellen kaum möglich gewesen wäre.

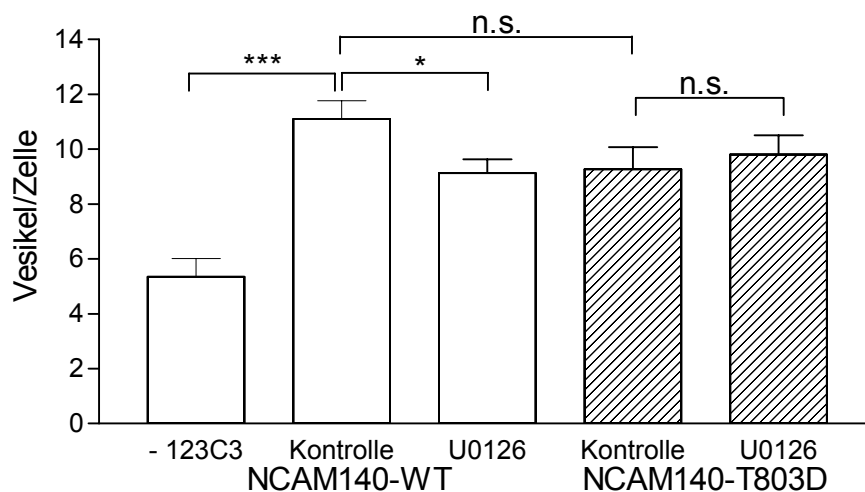


Abb. 3.7.: Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 und Behandlung mit 100 μ M U0126 auf einem Monolayer von L-Zellen

Der Versuch wurde viermal durchgeführt (NCAM140-WT ohne 123C3-AK einmal) und jeweils von jeder Bedingung zwischen 15 und 20 Zellen ausgewertet.

*** = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Wie in Abb. 3.7. zu erkennen ist, führt der Kontakt zu den L-Zellen bei der NCAM140-T803D-Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu einer geringeren Anzahl an Endocytosevesikeln. Auch wenn der Unterschied nicht signifikant ist, stellt dieses Ergebnis dennoch einen deutlichen Unterschied zu den Versuchen auf PLL dar, in denen immer eine signifikant erhöhte Vesikelzahl der die Mutante exprimierenden Zellen zu beobachten war (s.

Goschzik, 2004 und Abb. 3.6a.). Der Einsatz des MEK-Inhibitors U0126 führt auch bei diesem Experiment bei den NCAM140-WT-exprimierenden Zellen zu einer signifikant geringeren Anzahl an Vesikeln. Bei der Mutante ist auch auf den L-Zellen keine Veränderung der Vesikelanzahl zu erkennen, im Vergleich zu den Versuchen auf PLL allerdings nicht auf einem insgesamt sogar höheren Niveau als der Wildtyp ohne U0126, sondern auf dem Niveau des Wildtyps nach Behandlung mit dem MEK-Inhibitor.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass heterophile Interaktionspartner von NCAM auf der Oberfläche der L-Zellen oder von L-Zellen sekretierte Moleküle die auf PLL verstärkte Endocytose der NCAM140-T803D-exprimierenden Zellen hemmen.

Wie schon in Abb. 3.6b. gesehen zeigt der Wildtyp mehr Endocytosevesikel als bei früheren Versuchen (s. Goschzik, 2004 und Abb. 3.6a., jeweils ca. 6 Vesikel/Zelle). Es kann daher nicht gesagt werden, ob die erhöhte Vesikelanzahl in diesem Experiment auf den Kontakt mit den L-Zellen zurückzuführen ist oder ob es sich um Schwankungen handelt, die in biologischen Systemen auftreten können und wie sie auch schon bei der Messung der Neuritenlängen auf COS140-Zellen von NCAM140-WT und NCAM140-T803D zu beobachten war (s. Tabellen 3.2. und 3.3.).

Ohne Einsatz des 123C3-AK konnten auf L-Zellen mit $5,4 \pm 0,4$ mehr Vesikel je Zelle als auf PLL identifiziert werden. Diese erhöhte konstitutive Endocytose wird wahrscheinlich durch Interaktion(en) heterophiler Bindungspartner auf der Oberfläche der L-Zellen mit NCAM oder auch anderen Zelloberflächenmolekülen auf den B35-Zellen oder durch sekretierte Moleküle ausgelöst. Die durchschnittliche Vesikelanzahl je Zelle liegt aber auch hier signifikant unter jener nach Induktion der Endocytose.

3.2. Untersuchungen zur Phosphorylierung des Threonins 803 von NCAM140

Mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden sollte versucht werden, unter den Bedingungen der Endocytose von NCAM Veränderungen der Phosphorylierung des T803 von NCAM140 nachzuweisen.

3.2.1. Nachweis von freiem Phosphat mit Biomol GreenTM nach Phosphatase-Behandlung

Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob nach der Behandlung der Immunpräzipitate mit Lambda Proteinphosphatase eine höhere Menge an freiem Phosphat in Immunpräzipitaten von NCAM140-WT nachweisbar ist als in Immunpräzipitaten von NCAM140-T803A oder NCAM140-T803D. Mit dieser Methoden hatten Matthias und Horstkorte (2006) Phosphorylierungsunterschiede von NCAM in PC12-Zellen während der neuronalen Differenzierung nachweisen können. Wenn nach der Induktion der Endocytose mit dem 123C3-AK das T803 von NCAM140 tatsächlich verstärkt phosphoryliert wird, müsste dieser Unterschied beim Wildtyp nach Phosphatase-Behandlung durch die erhöhte Menge an freiem Phosphat zu detektieren sein, bei den beiden Mutanten jedoch nicht. Der Nachweis erfolgte mittels Farbreaktion mit Biomol GreenTM (s. Kapitel 2.2.24.1.).

Trotz mehrmaliger Optimierung der Versuchsbedingungen war es über die Bestimmung des freien Phosphates mit Biomol GreenTM nicht möglich festzustellen, ob die AK-Behandlung mit dem 123C3-AK, die bei den NCAM140-transfizierten B35-Zellen die Endocytose von NCAM auslöst, eine Phosphorylierung von T803 von NCAM140 bewirkt. Möglicherweise werden zu wenige NCAM-Moleküle an T803 phosphoryliert, so dass der Unterschied zu den nichtphosphorylierbaren Mutanten zu gering ist. Außerdem besitzt NCAM140 intrazellulär noch mehrere weitere potentiell phosphorylierte Aminosäuren, deren Phosphatreste von der Phosphatase entfernt würden und somit Unterschiede bei nur einer einzigen mutierten Phosphorylierungsstelle weniger deutlich sichtbar wären.

3.2.2. Färbung von Phosphoproteinen mit Pro-Q DiamondTM

Mit dieser sensitiven Färbemethode von Phosphoproteinen sollte ebenfalls versucht werden, die *in vivo*-Phosphorylierung des T803 nachzuweisen. Dieses Experiment wurde wie der in Kapitel 3.2.1. beschriebene Nachweis von freiem Phosphat mit NCAM140-WT-exprimierenden Zellen sowie den NCAM140-T803A- und NCAM140-T803D-Mutanten durchgeführt (s. Kapitel 2.2.24.2.).

Im Falle einer Phosphorylierung des T803 nach Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 müsste eine stärkere NCAM140-Bande beim Wildtyp nach Behandlung der Gele mit Pro-Q DiamondTM sichtbar werden als bei den Mutanten, bei denen besagtes Threonin nicht phosphoryliert werden kann.

Da das T803 innerhalb einer MAP-Kinase-Konsensussequenz liegt, wurden die Zellen vor Versuchsbeginn mit der cDNA für erk2 transfiziert, um eine Überexpression dieser MAP-Kinase zu bewirken. Dies sollte dazu führen, dass die vermutete Phosphorylierung am T803 durch die MAP-Kinase verstärkt abläuft und Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten deutlicher sichtbar werden.

In Abb. 3.8. sind Scans von einem mit Pro-Q DiamondTM behandelten SDS-Gel sowie von dem selben Gel nach anschließender Silberfärbung gezeigt.

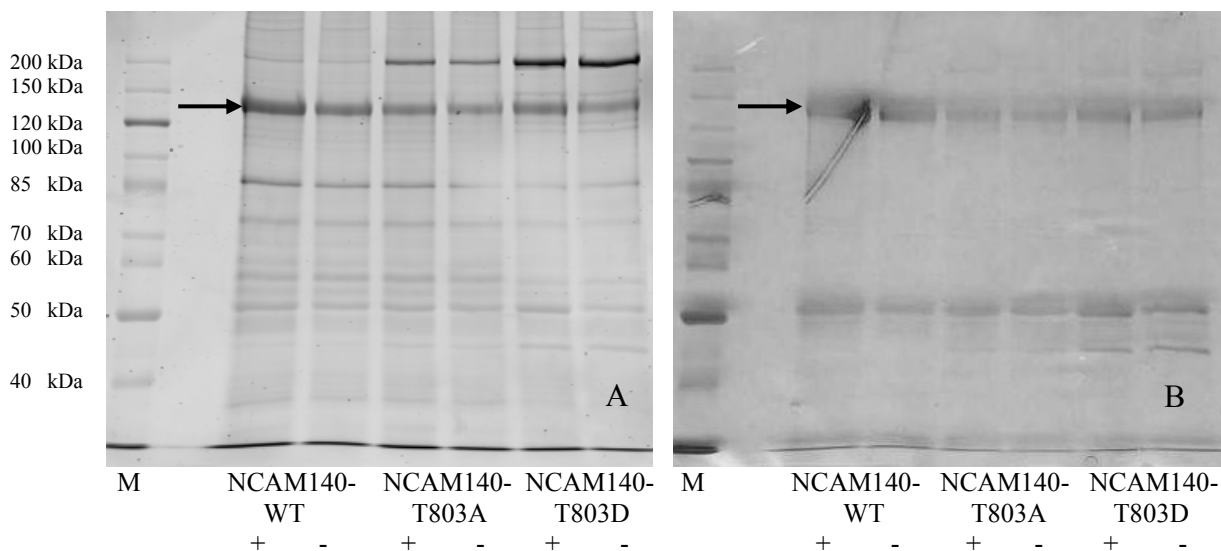


Abb. 3.8.: A) Pro-Q DiamondTM-Phosphoproteinfärbung der Immunpräzipitate von stabil mit NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- oder NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit dem 123C3-AK (+) oder Kontrollen ohne 123C3-AK (-); B) Silberfärbung von Gel A

Einen Tag vor der AK-Inkubation wurden alle Zellen zusätzlich noch mit der cDNA für die MAP-Kinase erk2 transient transfiziert. Nach der AK-Behandlung bzw. der Inkubation nur in OptiMEM (Kontrollen) wurden die Zellen lysiert und anschließend mit dem anti-NCAM-AK 123C3 immunpräzipitiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 8 %igen SDS-Gel. Bei ca. 140 kDa sind die NCAM-Banden (Pfeile) sichtbar. M = Marker
Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Auf den Gelen sind nach Anfärbung der Phosphoproteine sowohl bei NCAM140-WT als auch bei beiden Mutanten mit und ohne Induktion der Endocytose durch den 123C3-AK Banden auf der Höhe von 140 kDa zu erkennen.

Auf dem in Abb. 3.8. gezeigten Gel ist zu erkennen, dass der Grad der Phosphorylierung bei NCAM140-WT stärker zu sein scheint als bei den Mutanten. Allerdings ist zumindest bei der NCAM140-T803A-Mutante auch das Gesamtexpressionslevel niedriger. Dass der Wildtyp stärker phosphoryliert wird, kann aber auch anhand der beiden anderen durchgeführten

Versuche nicht eindeutig bestätigt werden. Wenn überhaupt ist die Steigerung der Gesamtphosphorylierung, die aufgrund der Phosphorylierung des T803 beim NCAM140-WT gegenüber den Mutanten aufzutreten scheint, sehr gering.

Nach der Induktion der Endocytose durch die Inkubation mit dem 123C3-AK zeigt sich bei allen drei untersuchten Zelllinien, also auch bei beiden Mutanten, ein stärkerer Phosphorylierungsgrad als bei den Kontrollen. Daraus lässt sich schließen, dass unter dieser Bedingung noch weitere, bzw. zumindest eine weitere Aminosäure von NCAM140 phosphoryliert wird. Ob aber das T803 überhaupt phosphoryliert wird und ob dies nach Induktion der Endocytose geschieht, kann auch mit dieser Methode nicht eindeutig beantwortet werden.

3.3. Untersuchungen der Bedeutung der Deletion des C-terminalen Hexapeptids ENESKA von NCAM auf Neuritenwachstum und Endocytose

Die Deletion des C-terminalen Hexapeptids ENESKA (NCAM140/180- Δ ENESKA) wurde mit Hilfe des QuickChangeTM site-directed mutagenesis kit (Stratagene, USA) durchgeführt (s. Kapitel 2.2.1.). Anschließend wurden B35-Zellen mit den cDNAs beider Mutanten stabil transfiziert.

Die Idee, diese Mutanten herzustellen, ergab sich aus der ungewollten und zunächst unentdeckten Entstehung eines Stoppcodons an Position -6 der cDNA von NCAM140 bei einem früheren Versuch, die NCAM140-T803A-Mutante herzustellen (Quade, 2004). Die Herstellung der Δ ENESKA-Mutanten sollte dazu dienen, herauszufinden, ob die abweichenden Ergebnisse der mit den NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden Zellen durchgeführten Experimente alleine auf das Fehlen der C-terminalen Aminosäuren zurückzuführen war oder die Kombination beider Mutationen dafür verantwortlich war.

Nach der stabilen Transfektion wurden für beide Mutanten jeweils mehrere positive Klone mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse und Western Blot identifiziert. Im Folgenden wurden jeweils Klone mit ähnlichem Expressionsniveau miteinander verglichen, um auszuschließen, dass Unterschiede in der Expressionsstärke für die Ergebnisse verantwortlich sind.

Wie schon bei in den vorangehenden Kapiteln dargestellten Ergebnissen wurden die Experimente mit verschiedenen Klonen durchgeführt, wobei aber dennoch immer das Expressionsniveau der verwendeten Wildtyp-Klone weitestgehend mit dem der Mutanten-Klone übereinstimmte.

3.3.1. Messung der Neuritenlängen auf PLL

In Abb. 3.9. sind beispielhaft jeweils ein Bild der NCAM140- und NCAM180-WT-sowie der NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP auf PLL-beschichteten Petrischalen dargestellt.

Die Neuritenlängen dieser Zellen wurden wie bereits in Kapitel 3.1.1. beschrieben gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abb. 3.10a. (NCAM140) und 3.11a. (NCAM180) dargestellt. In Abb. 3.10a. sind zusätzlich die durchschnittlichen Neuritenlängen der NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-Mutante wiedergegeben.

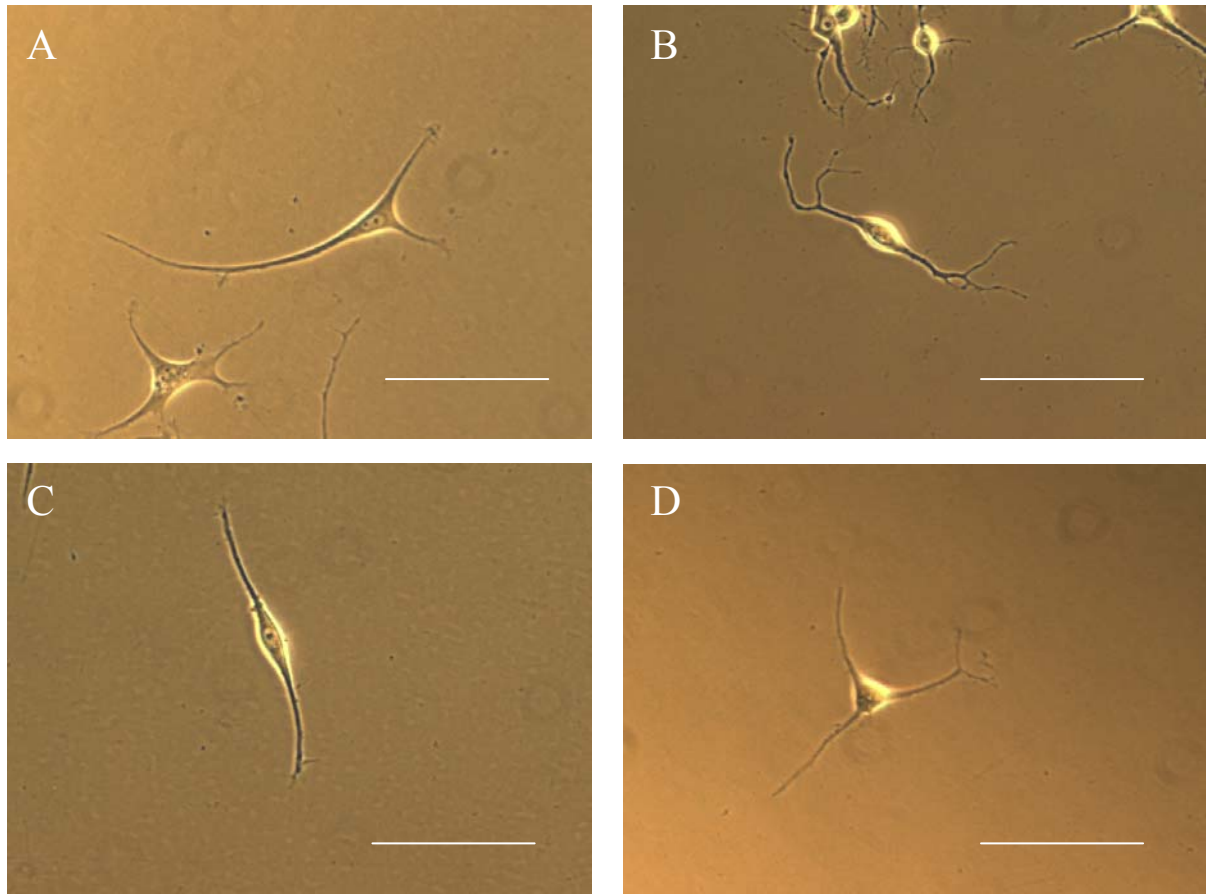


Abb. 3.9.: Phasenkontrastaufnahmen von (A) NCAM140-WT-, (B) NCAM140- Δ ENESKA-, (C) NCAM180-WT- und (D) NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP

Die Balken entsprechen 40 μ m.

Es ist zu erkennen, dass sich durch die Behandlung mit dbcAMP das Neuritenwachstum der NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf PLL ähnlich wie für die NCAM140-WT- und NCAM140-T803A/D-exprimierenden Zellen steigern lässt. Bei den NCAM140- Δ ENESKA-exprimierenden Zellen findet diese Steigerung im gleichen Umfang statt wie bei den NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen. Während bei den Kontrollversuchen (ohne dbcAMP) die Neuriten gleich lang sind wie bei den Wildtyp-exprimierenden Zellen, ist dies nach Ausdifferenzierung nur noch für NCAM140- Δ ENESKA-exprimierende Zellen der Fall. Die NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden Zellen hingegen zeigen nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP ein signifikant stärkeres Neuritenwachstum als der Wildtyp. Dieses Ergebnis bestätigt frühere Resultate aus unserer Arbeitsgruppe (Quade, 2004). In Tabelle 3.4. sind noch einmal alle durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM aus Abb. 3.10a. dargestellt.

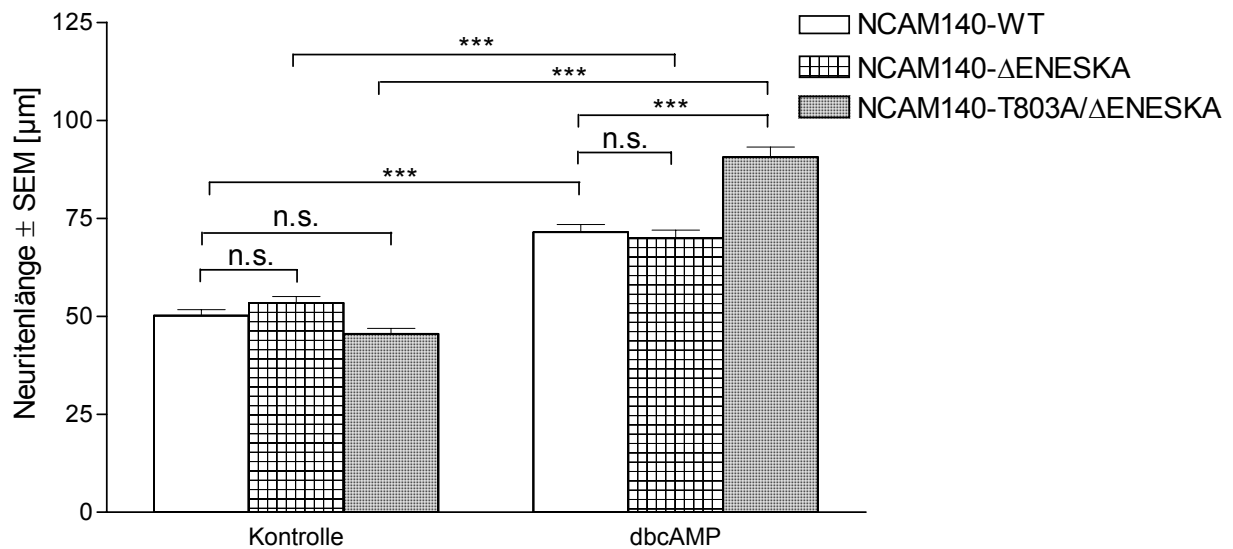


Abb. 3.10a.: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM von NCAM140-WT-, NCAM140-ΔENESKA- und NCAM140-T803A/ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen ± dbcAMP auf PLL als Substrat

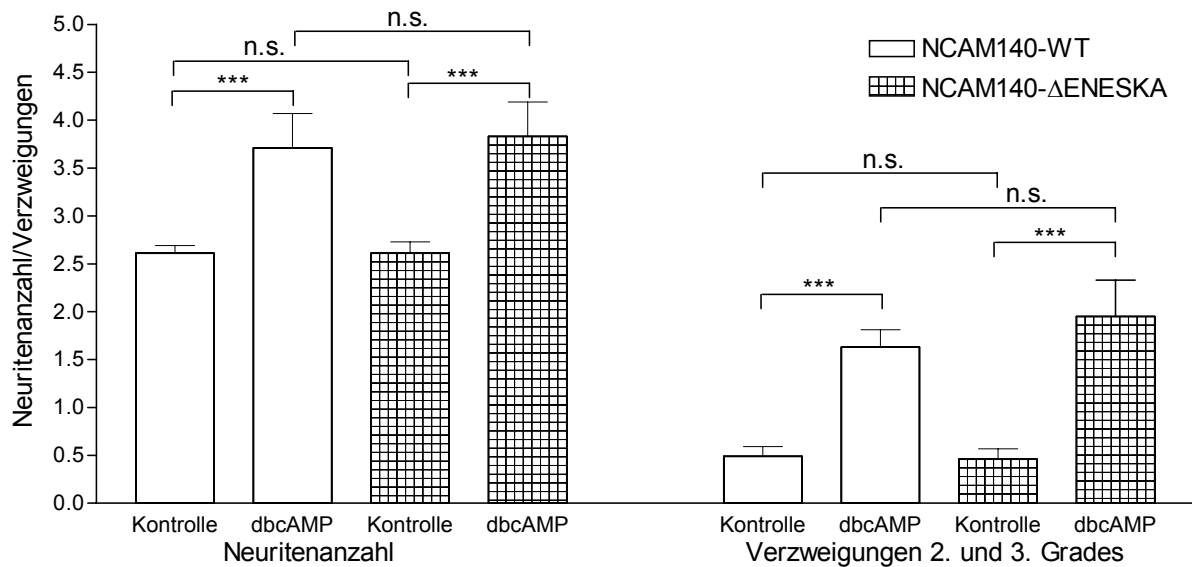


Abb. 3.10b.: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenanzahl je Zelle ± SEM sowie Verzweigungen 2. und 3. Grades von NCAM140-WT- und NCAM140-ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen ± dbcAMP auf PLL als Substrat

Die Kontrollen wurden anstatt mit dbcAMP mit der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Der Versuch wurde sechsmal durchgeführt (die Versuche mit NCAM140-T803A/ΔENESKA zweimal) und jeweils von jeder Bedingung zwischen 70 und 110 Neuriten gemessen.

*** = $p < 0,0001$; n.s. = nicht signifikant

	NCAM140-WT	NCAM140-ΔENESKA	NCAM140-T803A/ ΔENESKA
Kontrolle	50,2 ± 1,5	53,4 ± 1,7	45,5 ± 1,5
dbcAMP	71,5 ± 1,9	69,9 ± 2,1	90,6 ± 2,6

Tabelle 3.4.: Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen ± SEM von NCAM140-WT-, NCAM140-ΔENESKA- und NCAM140-T803A/ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat

Wie bereits in Tabelle 3.1. gezeigt wurde, wiesen die NCAM140-T803A-exprimierenden B35-Zellen ebenfalls nach Ausdifferenzierung längere Neuriten auf PLL auf als die Wildtyp-exprimierenden Zellen. Dieser Effekt wird also durch das zusätzliche Fehlen der letzten sechs C-terminalen Aminosäuren nicht beeinflusst.

Auch bei der Neuritenanzahl, also den Ausläufern, die direkt dem Zellkörper entwachsen, sowie bei der Anzahl an Ästen, die von diesen Neuriten abgehen (Verzweigungen 2. Grades) und wiederum deren Ästen (Verzweigungen 3. Grades) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den NCAM140-WT- und den NCAM140- Δ ENESKA-exprimierenden Zellen festgestellt werden (s. Abb. 3.10b.).

Die NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen zeigen ebenfalls bzgl. der Neuritenlängen keine signifikanten Unterschiede zum NCAM180-WT. Die Werte sind in Tabelle 3.5. dargestellt.

	NCAM180-WT	NCAM180- Δ ENESKA
Kontrolle	29,5 \pm 1,0	30,1 \pm 0,8
dbcAMP	42,4 \pm 1,1	45,3 \pm 1,2

Tabelle 3.5.: Übersicht über die durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM von NCAM180-WT-, NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) und mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat

Lediglich bei der Neuritenanzahl sowie bei den Verzweigungen 2. und 3. Grades nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP liegen die Werte der NCAM180- Δ ENESKA-Mutante geringfügig über denen des Wildtyps (s. Abb. 3.11b.). Diese Unterschiede sind zwar signifikant, allerdings ist vor allem bei den Verzweigungen 2. und 3. Grades ($0,7 \pm 0,02 \Leftrightarrow 0,5 \pm 0,01$) dieser Unterschied so gering, dass von einem Einfluss der Mutation auf diese Effekte nicht mit Sicherheit ausgegangen werden kann.

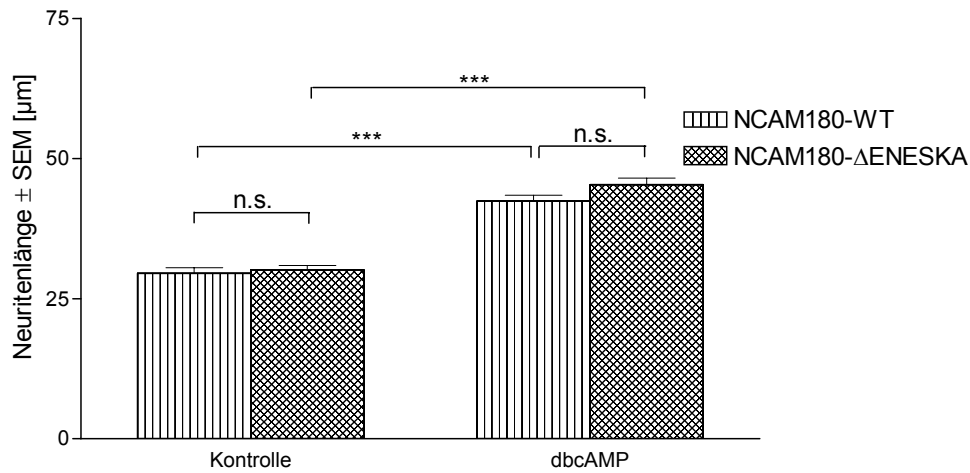


Abb. 3.11a.: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenlängen \pm SEM der NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat

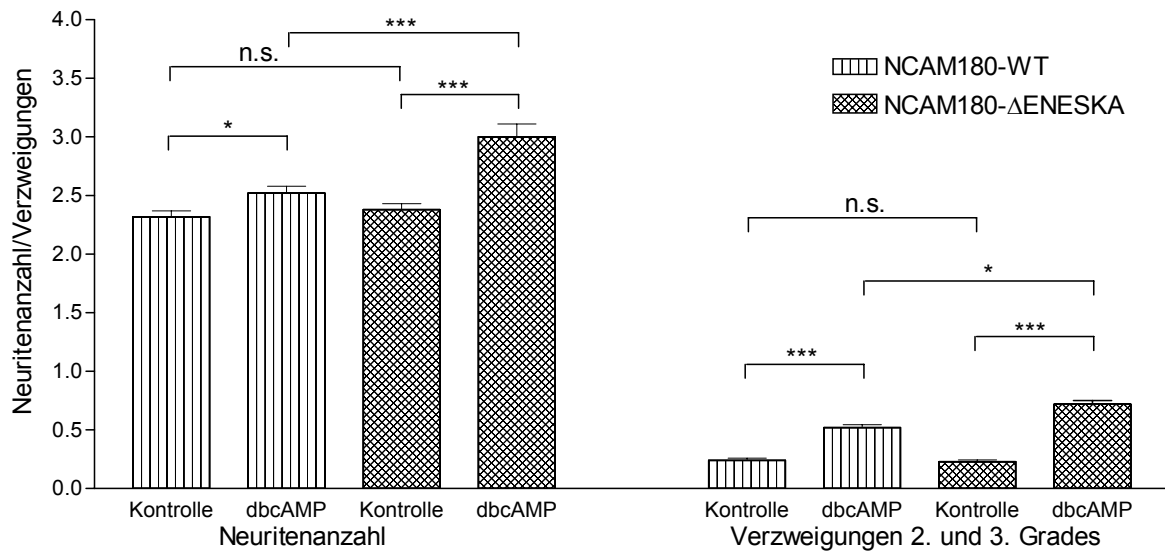


Abb. 3.11b.: Vergleich der durchschnittlichen Neuritenanzahl je Zelle \pm SEM sowie Verzweigungen 2. und 3. Grades von NCAM180-WT- und NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen ohne (Kontrollen) oder mit dbcAMP-Behandlung auf PLL als Substrat

Der Versuch wurde viermal durchgeführt und jeweils von jeder Bedingung zwischen 70 und 110 Neuriten gemessen.

*** = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

3.3.2. Endocytose von NCAM140- Δ ENESKA

Die Untersuchung der Endocytose erfolgte wie bereits in Kapitel 3.1.3. beschrieben. Die Abb. 3.12. zeigt beispielhaft jeweils die AK-induzierte Endocytose von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140-T803/ Δ ENESKA in den entsprechend transfizierten B35-Zellen auf PLL als Substrat.

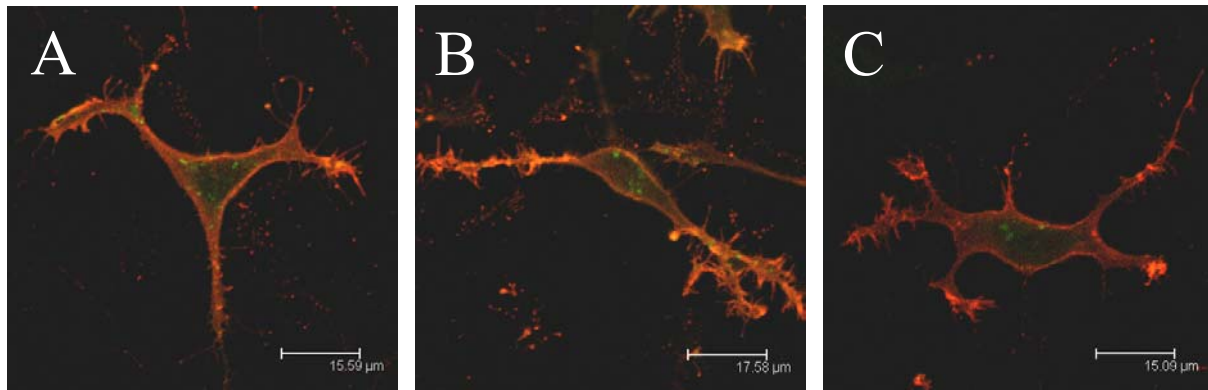


Abb. 3.12.: Untersuchungen der Endocytose von (A) NCAM140-WT-, (B) NCAM140- Δ ENESKA- und (C) NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen mittels konfokaler Lasermikroskopie

Der Nachweis von zelloberflächenexprimiertem NCAM wurde nach 30-minütiger Inkubation der B35-Zellen mit dem gegen humanes NCAM gerichteten monoklonalen AK 123C3 und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK durchgeführt. Nach Absättigung von freigebliebenen Bindungsstellen des NCAM-AK für den Zweit-AK mit einem Überschuss an polyklonalem anti-Maus-IgG und Permeabilisieren der Zellen wurden Vesikel mit endocytierten NCAM-AK-Komplexen mit einem DTAF- oder Cy2-gekoppelten Zweit-AK nachgewiesen.

Wie schon bei der Messung der Neuritenlängen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied bzgl. der Endocytose zwischen NCAM140-WT ($10,4 \pm 0,5$) und NCAM140- Δ ENESKA ($10,1 \pm 0,6$) festgestellt werden, wie in Abb. 3.13. zu erkennen ist. Die NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-transfizierten Zellen ($6,7 \pm 0,5$) hingegen weisen signifikant weniger Endocytose-Vesikel je Zelle auf als der Wildtyp und verhalten sich also auch hier tendenziell wie die NCAM140-T803A-exprimierenden B35-Zellen, wie auch schon bzgl. des Neuritenwachstums. Die hochsignifikant geringere Anzahl an Endocytose-Vesikeln der NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-Mutante gegenüber dem Wildtyp konnte auch schon zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Quade, 2004; Kominek, 2004).

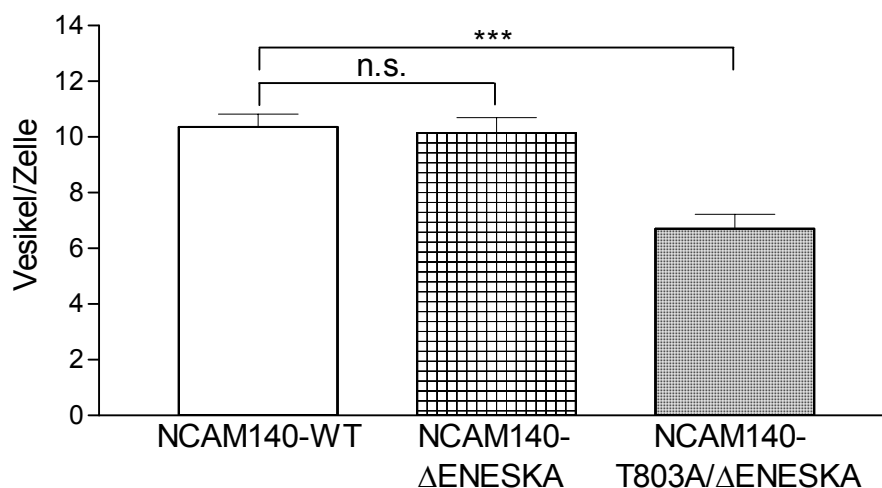


Abb. 3.13.: Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem anti-NCAM-AK 123C3 auf PLL

Der Versuch wurde siebenmal durchgeführt (NCAM140-T803A/ Δ ENESKA dreimal) und jeweils von jeder Bedingung zwischen 10 und 25 Zellen ausgewertet.

*** = $p < 0,0001$; n.s. = nicht signifikant ($p > 0,05$)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hochkonservierte ENESKA-Domäne am C-Terminus von NCAM140 keine direkte Rolle für Neuritenwachstum und Endocytose zu spielen scheint. Allerdings ist auf Grund der Ergebnisse anzunehmen, dass durch das Fehlen des C-Terminus zusätzlich zur T803A-Mutation die Endocytose verstärkt inhibiert wird.

3.4. „Shedding“-Experimente

Unter „Shedding“ wird die enzymatische Spaltung eines Transmembranproteins verstanden, worauf die extrazelluläre Domäne in die Extrazellulärflüssigkeit abgegeben wird. Dieser Vorgang stellt neben der Endocytose eine weitere Möglichkeit dar, ein Protein von der Zelloberfläche zu entfernen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zum Einen untersucht werden, wie sich die Behandlung von B35-Zellen mit dem Tyrosinphosphatase-Inhibitor Pervanadat auf NCAM auswirkt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit NCAM140/180-eGFP-Konstrukten transfiziert, um NCAM140/180 nach der Pervanadat-Behandlung direkt im Fluoreszenz-Mikroskop analysieren zu können.

Zum Anderen wurde untersucht, ob das Fehlen der letzten sechs C-terminalen Aminosäuren ENESKA einen Einfluss auf das Pervanadat-induzierte „Shedding“ von NCAM140/180 hat.

3.4.1. „Shedding“ von NCAM140/180-eGFP

B35-Zellen wurden mit den NCAM140-eGFP- bzw. NCAM180-eGFP-Konstrukten, die am C-terminalen Ende von NCAM die für eGFP codierende cDNA enthielten, transfiziert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Pervanadat-Behandlung zum „Shedding“ der extrazellulären Domäne von NCAM140 führt und dass eine Disintegrin Metalloprotease (ADAM) an dieser Abspaltung beteiligt ist (Diestel et al., 2005; Hinkle et al., 2006). Das Schicksal der noch in der Membran verankerten cytosolischen Domäne, die im Western Blot von Zelllysaten nachgewiesen werden kann, ist aber unklar. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die cytosolische Domäne von NCAM nach Pervanadat-Behandlung verstärkt endocytisiert und in Lysosomen abgebaut wird.

Die Zellen wurden wie in den Versuchen von Diestel et al. (2005) und Hinkle et al. (2006) auf Fibronectin (s. Tabelle 3.6.) oder auf PLL (s. Tabelle 3.7.) ausplattiert. Nach der Transfektion wurden sie außer mit Pervanadat auch noch mit dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 oder beiden Substanzen zusammen behandelt. Die Kontrollzellen wurden für den Zeitraum der Behandlung nur in serumfreiem Medium kultiviert (s. Kapitel 2.2.19.).

In Abb. 3.14. sind beispielhaft jeweils vier Bilder der NCAM140-eGFP- und vier Bilder der NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen dargestellt. Von diesen vier Bildern ist jeweils eines nur mit Pervanadat, eines mit dem GM6001 und eines mit beiden behandelt. Außerdem ist jeweils einmal eine unbehandelte und nur in serumfreiem Medium kultivierte Kontrollzelle abgebildet.

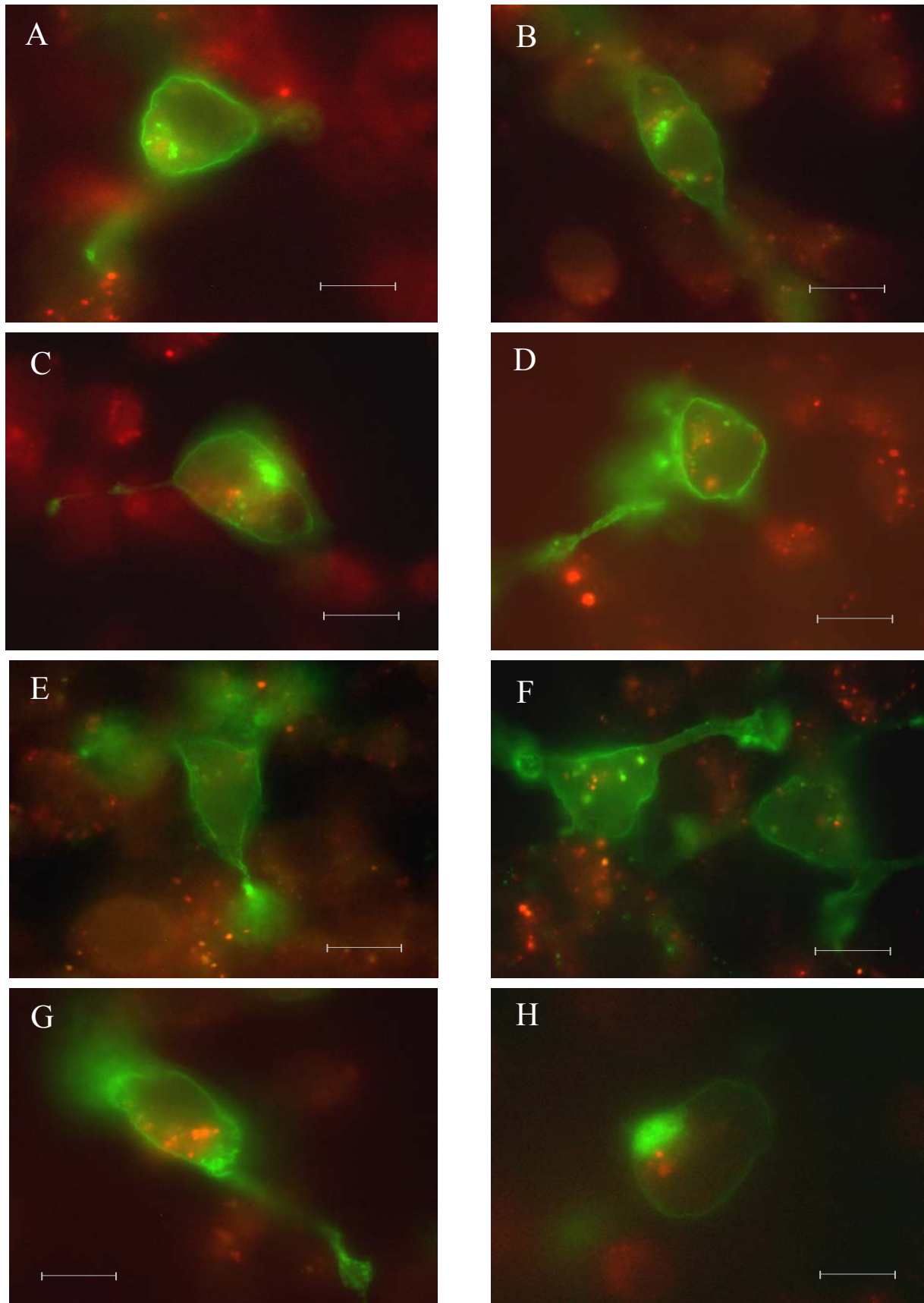


Abb. 3.14.: Fluoreszenzaufnahmen von NCAM140-eGFP- (A-D) und NCAM180-eGFP- (E-H) transfizierten B35-Zellen; A und E: Kontrollen; B und F: behandelt mit 25 µm GM6001; C und G: behandelt mit 200 µm Pervanadat; D und H: behandelt mit Pervanadat und GM6001

Die Kontrollen wurden nur in serumfreiem Medium kultiviert.

Die Kanäle für die grüne (NCAM-eGFP) und rote Fluoreszenz (Lysosomen) wurden nacheinander mit einem 100x-Objektiv aufgenommen und mit ImageJ-Software übereinander gelagert. Die Balken entsprechen 15 µm.

Die Ergebnisse der Vesikelzählungen sind in Abb. 3.15. (NCAM140-eGFP) und in Abb. 3.16. (NCAM180-eGFP) dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die Pervanadat-Behandlung zu einer starken und hochsignifikanten Zunahme der eGFP-positiven Vesikelanzahl führt. Häufig befanden sich in den Zellen nach Pervanadat-Behandlung viele Vesikel so dicht beieinander, dass das Auszählen stark erschwert war. Dies ist z. B. auf den Bildern C und H von Abb. 3.14. zu erkennen.

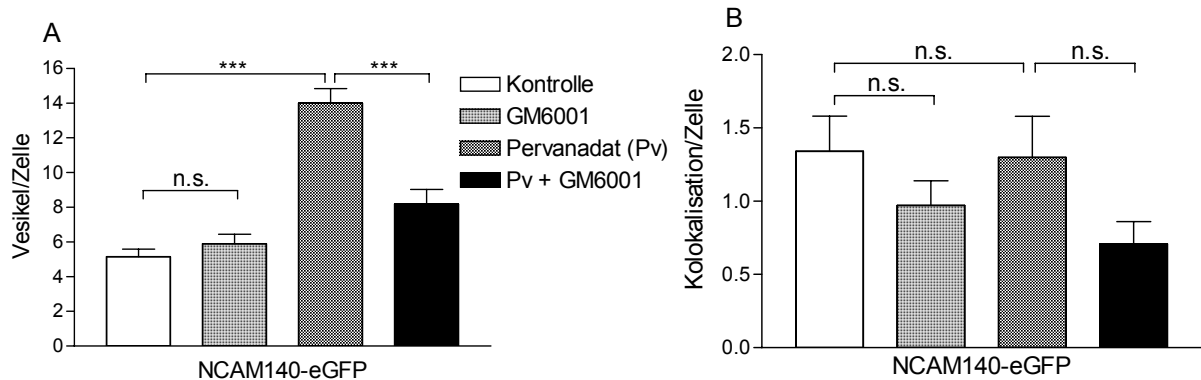


Abb. 3.15.: Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-eGFP-transfizierten B35-Zellen (A) sowie der durchschnittlichen Kolokalisation von NCAM140-eGFP und Lysosomen je Zelle \pm SEM (B) nach 40-minütiger Behandlung mit Pervanadat (Pv) und dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001

Die Kontrollzellen wurden für die Dauer der Pv- bzw. GM6001-Behandlung nur in serumfreiem Medium kultiviert. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und jeweils von jeder Bedingung zwischen 10-15 Zellen ausgewertet.

*** = $p < 0,0001$; n.s. = nicht signifikant

Der Einsatz des Metalloprotease-Inhibitors GM6001 reduziert die Vesikelanzahl der Pervanadat-behandelten NCAM140-eGFP-transfizierten Zellen wieder bis fast auf das Niveau der Kontrollzellen. Bei den NCAM180-eGFP-transfizierten Zellen wurde eine Signifikanz bei der statistischen Berechnung zwar nicht erreicht, die Tendenz ist aber auch hier die gleiche

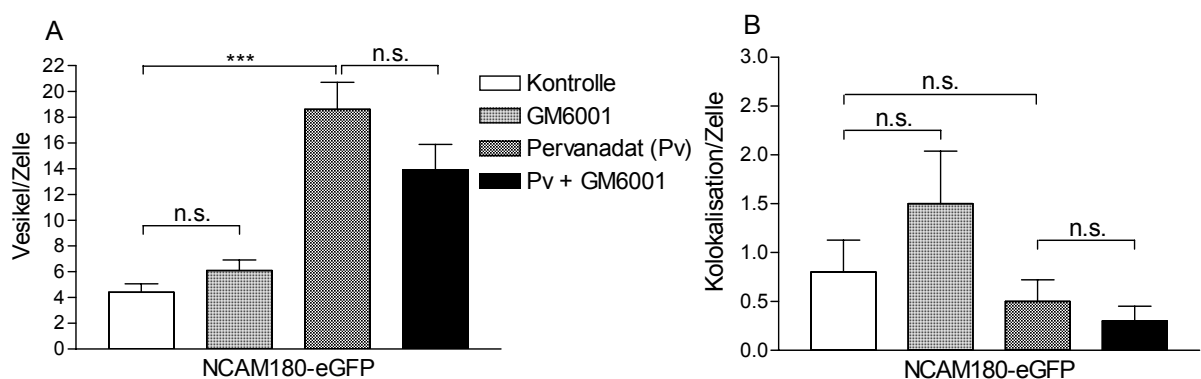


Abb. 3.16.: Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen (A) sowie der durchschnittlichen Kolokalisation von NCAM180-eGFP und Lysosomen je Zelle \pm SEM (B) nach 40-minütiger Behandlung mit Pervanadat (Pv) und dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001

Die Kontrollzellen wurden für die Dauer der Pv- bzw. GM6001-Behandlung nur in serumfreiem Medium kultiviert. Der Versuch wurde einmal durchgeführt und von jeder Bedingung zwischen 10-15 Zellen ausgewertet.

*** = $p < 0,0001$; n.s. = nicht signifikant

wie bei NCAM140-eGFP. Ohne die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Pervanadat führt der Einsatz des Inhibitors zu keiner Reduzierung der Vesikelanzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen.

In Tabelle 3.6. sind nochmals die Ergebnisse der „Shedding“-Experimente aus Abb. 3.15. und 3.16. zusammengefasst.

	NCAM140-eGFP	NCAM180-eGFP
Kontrolle	5,2 ± 0,4	4,4 ± 0,7
GM6001	5,9 ± 0,6	6,1 ± 0,8
Pervanadat	14,0 ± 0,9	18,6 ± 2,1
Pervanadat + GM6001	8,2 ± 0,8	13,9 ± 2,0

Tabelle 3.6.: Übersicht der durchschnittlichen Vesikelanzahl ± SEM von NCAM140-eGFP- und NCAM180-eGFP-exprimierenden B35-Zellen nach Behandlung mit Pervanadat und dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 auf Fibronectin als Substrat

Die Untersuchung der Kolokalisation von internalisierten NCAM-eGFP-Molekülen und Lysosomen mittels LysoTracker zeigte, dass nur ein sehr geringer Teil des NCAMs in die Lysosomen gelangt. Auch nach Pervanadat-Behandlung ist kein Anstieg der Kolokalisation zu erkennen, obwohl deutlich mehr NCAM-eGFP-Moleküle in das Zellinnere transportiert werden.

Auch nach 20- oder 60-minütiger Behandlung der Zellen mit Pervanadat konnte weder für NCAM140-eGFP noch für NCAM180-eGFP eine verstärkte Kolokalisation mit Lysosomen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Der Anstieg des intrazellulären NCAM-eGFP war aber auch schon nach 20 Minuten signifikant und nach 60 Minuten sogar nochmals stärker als nach 40 Minuten.

Allerdings muss erwähnt werden, dass viele B35-Zellen nach 60-minütiger Pervanadat-Behandlung deutliche Apoptose-Anzeichen aufwiesen. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen die Pervanadat-Behandlung lediglich für 40 Minuten durchgeführt, obwohl auch nach diesem Zeitraum bereits einige Zellen morphologische Veränderungen wie verkürzte Neuriten oder Membranausstülpungen („membrane blebbing“) aufwiesen.

Außer mit dem Metalloprotease-Inhibitor GM6001 wurden die Versuche auch mit dem MEK-Inhibitor U0126 durchgeführt, da Hinkle et al. (2006) ebenfalls zeigen konnten, dass eine Blockierung des MAP-Kinase-Signalweges mit diesem Inhibitor das Pervanadat-induzierte „Shedding“ von NCAM140 drastisch reduzieren konnte.

In Abb. 3.17. ist zu erkennen, dass die Ergebnisse von Diestel et al. (2005) sowie von Hinkle et al. (2006) in gewisser Weise bestätigt werden können und der Inhibitor die Pervanadat-

induzierte NCAM-eGFP-haltige Vesikelbildung signifikant reduzieren kann. Ohne Pervanadat-Behandlung ist anders als bei den Versuchen mit GM6001 jedoch

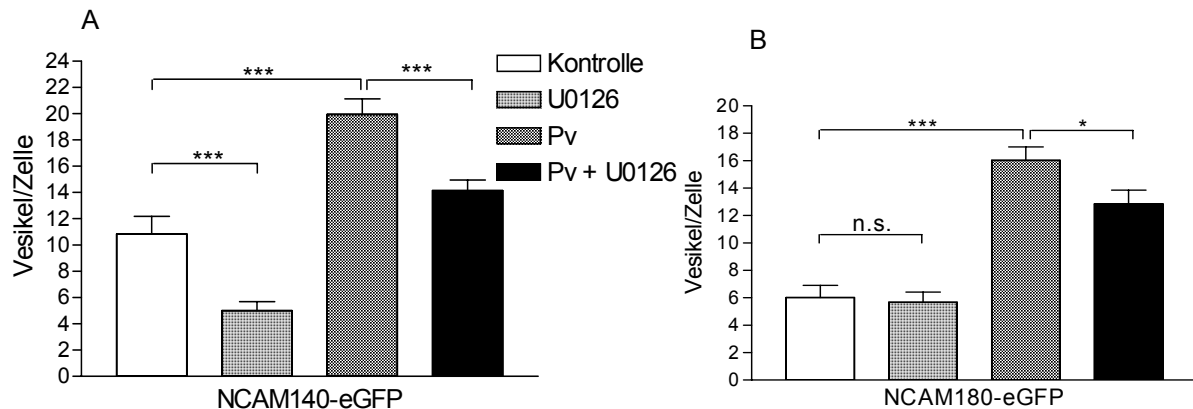


Abb. 3.17.: Vergleich der durchschnittlichen Vesikelanzahl je Zelle \pm SEM von NCAM140-eGFP- (A) und NCAM180-eGFP- (B) transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Behandlung mit Pervanadat (Pv) und dem MEK-Inhibitor U0126 auf PLL als Substrat

Die Kontrollzellen wurden für die Dauer der Pv- bzw. U0126-Behandlung nur in serumfreiem Medium kultiviert. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und jeweils von jeder Bedingung zwischen 10-15 Zellen ausgewertet.

*** = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

zumindest bei NCAM140-eGFP ein signifikanter Rückgang der Vesikelanzahl in Gegenwart von U0126 zu erkennen. Hierbei fällt jedoch auf, dass die Vesikelanzahl der Kontrollzellen bei diesem Versuch deutlich höher liegt als bei den in Abb. 3.15. gezeigten oder auch der NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen (s. Abb. 3.17.(B)). Es ist daher wahrscheinlich, dass es sich in diesem Fall um eine biologische Schwankung handelt und der MEK-Inhibitor ohne Pervanadat-Behandlung möglicherweise keine derart deutliche Reduktion der Vesikelanzahl bewirkt.

In Tabelle 3.7. sind die Ergebnisse aus Abb. 3.18. nochmals übersichtlich dargestellt.

	NCAM140-eGFP	NCAM180-eGFP
Kontrolle	10,9 \pm 1,3	6,0 \pm 0,9
U0126	5,0 \pm 0,7	5,7 \pm 0,8
Pervanadat	19,9 \pm 1,2	16,0 \pm 1,0
Pervanadat + U0126	14,1 \pm 0,8	12,9 \pm 1,0

Tabelle 3.7.: Übersicht der durchschnittlichen Vesikelanzahl \pm SEM von NCAM140-eGFP- und NCAM180-eGFP-exprimierenden B35-Zellen nach Behandlung mit Pervanadat und dem MEK-Inhibitor U0126 auf PLL als Substrat

Da die Untersuchungen der Kolo-kalisation von NCAM-eGFP mit Lysosomen bereits deutlich gezeigt hatten, dass NCAM nur in sehr geringem Umfang zu den Lysosomen transportiert wird und dies nach Pervanadat-Behandlung auch nicht gesteigert wird, wurde auf diese Untersuchung bei den Experimenten mit U0126 verzichtet.

Wie bis auf die zuvor genannte Ausnahme in den Abb. 3.15., 3.16. und 3.17. zu erkennen ist, weisen die Kontrollzellen durchschnittlich etwa 5 Vesikel je Zelle auf. Bei den Endocytose-Versuchen waren ohne Induktion durch einen AK nur vereinzelt intrazelluläre NCAM-haltige Vesikel sichtbar (s. Kapitel 3.1.3.). Um auszuschließen, dass neusynthetisiertes NCAM-eGFP, welches sich noch im endoplasmatischen Retikulum oder auf dem Weg zur Zellmembran befindet, für endocytisiertes NCAM gehalten wird, wurden Versuche mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid durchgeführt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass zwar nach 60-minütiger Pervanadat-Behandlung (90 Minuten Cycloheximid-Behandlung) ein geringer, nicht signifikanter Rückgang der Vesikelanzahl im Vergleich zu 40- oder 20-minütiger Pervanadat-Behandlung (70 bzw. 50 Minuten Cycloheximid-Behandlung) zu erkennen war, jedoch keine Veränderung der Vesikelanzahl im Vergleich zu den Experimenten ohne Cycloheximid (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer Grund für die verstärkte konstitutive Endocytose von NCAM-eGFP könnte sein, dass die Bilder nicht an einem konfokalen Lasermikroskop sondern an einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen wurden. In diesem Fall könnten also Vesikel, die ober- oder unterhalb der eingestellten Z-Ebene liegen, ebenfalls sichtbar sein, während sie bei einer Aufnahme an einem Konfokalmikroskop nicht erkennbar wären. Aus diesem Grund wurden einige Versuche mit NCAM140/180-eGFP \pm Pervanadat wiederholt und anschließend Bilder an einem konfokalen Lasermikroskop gemacht.

Die Abb. 3.18a. und 3.18b. zeigen beispielhaft jeweils ein Bild von NCAM140-eGFP- bzw. NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach Pervanadat-Behandlung oder Kontrollzellen, die ohne Pervanadat in serumfreiem Medium inkubiert wurden. Hierbei ist zu erkennen, dass auch bei den konfokalen Aufnahmen sowohl bei NCAM140-eGFP als auch bei NCAM180-eGFP deutliche Vesikel in den Kontrollzellen ohne Pervanadat sichtbar sind. Die mehrfache Wiederholung dieses Versuches führte jedes Mal zum gleichen Ergebnis. Auch nach Pervanadat-Behandlung sahen die am konfokalen Lasermikroskop entstandenen Bilder bzgl. der Vesikelanzahl den Bildern, die an einem Fluoreszenzmikroskop gemacht wurden, sehr ähnlich. Wie schon in Abb. 3.14. gezeigt, ist oft eine sehr hohe Vesikeldichte im Cytosol zu erkennen. Teilweise bleibt nur der Zellkern, in den NCAM-eGFP nicht eindringt, dunkel. Solche fast schon flächigen grün fluoreszierenden Bereiche waren zwar bei den Endocytose-Versuchen nach 30-minütiger Induktion der Endocytose mit dem 123C3-AK auch in Einzelfällen zu beobachten, jedoch nicht so regelmäßig wie nach der Pervanadat-Behandlung (s. Abb. 3.5. und Abb. 3.19. zur Erklärung der Anfärbung der Zellen mit dem 123C3-AK und dem Cy3-AK).

Allerdings ist erneut, vor allem in Abb. 3.18a. (Bild B), zu beobachten, dass die B35-Zellen nach Pervanadat-Behandlung häufig deutlich Apoptose-Anzeichen wie z. B. Membranausstülpungen oder verkürzte Neuriten aufwiesen. Die typische hohe Vesikelanzahl war aber auch in den morphologisch unveränderten Zellen zu erkennen.

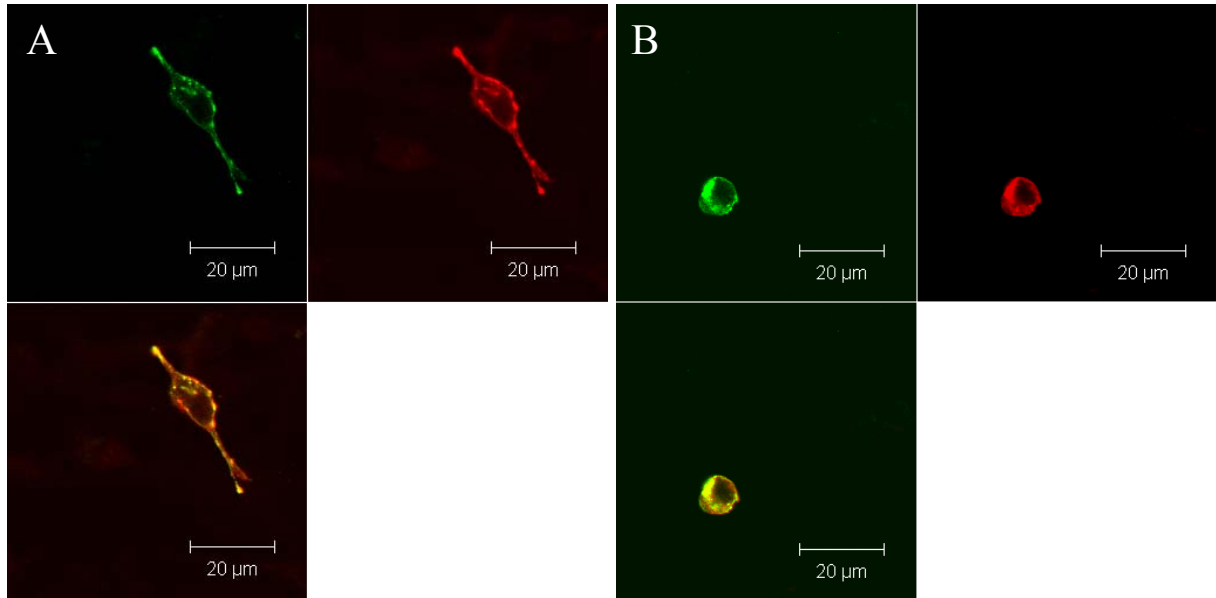


Abb. 3.18a.: „Shedding“-Untersuchungen von NCAM140-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Pervanadat-Behandlung (B) bzw. Kontrollen in serumfreiem Medium (A) mittels konfokaler Lasermikroskopie

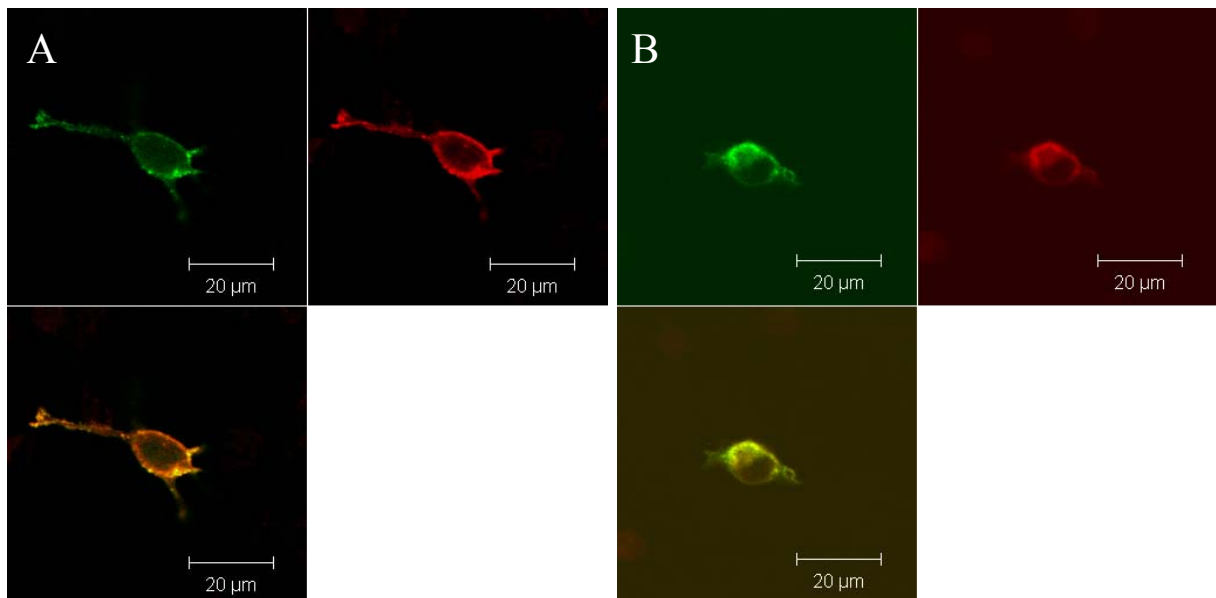


Abb. 3.18b.: „Shedding“-Untersuchungen von NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Pervanadat-Behandlung (B) bzw. Kontrollen in serumfreiem Medium (A) mittels konfokaler Lasermikroskopie

Nach dem Fixieren wurden die Zellen mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert und für 30 Minuten mit dem anti-NCAM-AK 123C3 inkubiert, welcher darauf mit einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK markiert wurde. Kontrollen ohne 123C3-AK zeigten keine rote Fluoreszenz (nicht gezeigt).

Da also weder die Vermutung, dass NCAM-eGFP-Moleküle, die auf dem Weg vom endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche waren, noch das Aufnahmeverfahren der Bilder an einem Fluoreszenzmikroskop als Grund für die Beobachtung des verstärkten Auftretens NCAM-eGFP-haltiger Vesikel in den Kontrollzellen bestätigt werden konnte, wurde untersucht, wie NCAM-WT- im Vergleich zu NCAM-eGFP-transfizierten Zellen auf Pervanadat reagieren.

Dieser Versuch, der ebenfalls je einmal an einem Fluoreszenzmikroskop und einmal an einem Konfokal-Mikroskop ausgewertet wurde, sollte dazu dienen, herauszufinden, ob die Modifizierung der cytoplasmatischen Domäne von NCAM mit eGFP eine verstärkte konstitutive Endocytose verursacht. Beide Versuche wurden mit NCAM140 durchgeführt.

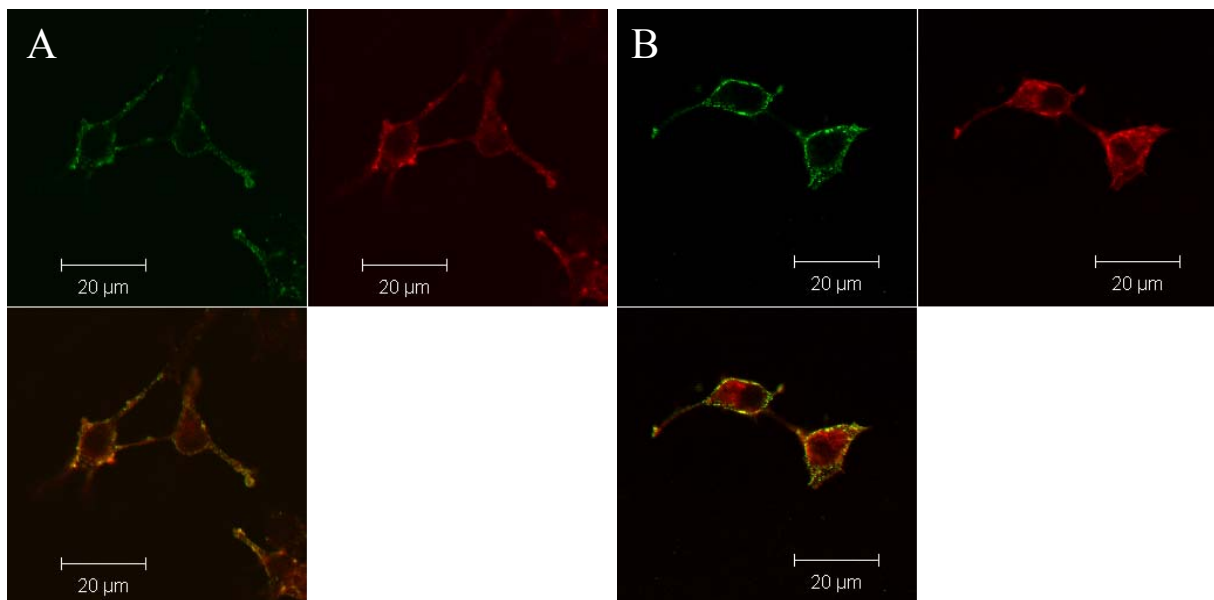


Abb. 3.19.: „Shedding“-Untersuchungen von stabil mit NCAM140-WT transfizierten B35-Zellen nach 40-minütiger Pervanadat-Behandlung (B) bzw. Kontrollen in serumfreiem Medium (A) mittels konfokaler Lasermikroskopie

Nach dem Fixieren wurde das Oberflächen-NCAM mit dem 123C3-AK und einem Cy2-gekoppelten Zweit-AK markiert und die Zellen anschließend mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert. Darauf wurden die Zellen erneut mit dem 123C3-AK und einem Cy3-gekoppelten Zweit-AK behandelt, um internalisiertes NCAM sichtbar zu machen.

Kontrollen ohne 123C3-AK zeigten keine Fluoreszenz (nicht gezeigt).

In Abb. 3.19. sind beispielhaft jeweils ein Bild mit Pervanadat-behandelten bzw. unbehandelten B35-Zellen abgebildet, die stabil mit NCAM140-WT transfiziert sind. Dabei wurde das Oberflächen-assoziierte NCAM nach dem Fixieren mit dem 123C3-AK und einem grün fluoreszierenden Zweit-AK markiert, das internalisierte NCAM nach dem Permeabilisieren ebenfalls mit dem 123C3-AK und einem rot fluoreszierenden Zweit-AK.

Die Experimente zeigen deutlich, dass ohne Pervanadat, wie auch schon ohne Einsatz des 123C3-AK zur Induktion der Endocytose beobachtet, nur vereinzelte Vesikel sichtbar wurden. Dies war sowohl bei den Aufnahmen an einem konfokalen Lasermikroskop als auch bei den

Bildern, die an einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem 63x-Öl-Objektiv aufgenommen wurden (nicht gezeigt) erkennbar und lässt vermuten, dass das eGFP, wenn es direkt an den C-Terminus von NCAM gebunden ist, dieses in irgendeiner Weise derart beeinflusst, dass es verstärkt in das Zellinnere aufgenommen wird.

Nach Pervanadat-Behandlung waren jedoch auch bei den NCAM140-WT-Zellen viele Vesikel zu erkennen, die, wie in Abb. 3.19. (Bild B) zu sehen, häufig ebenfalls große Flächen des Cytosols einnehmen.

Da Hinkle et al. (2006) gezeigt hatten, dass nach Pervanadat-Behandlung von NCAM-transfizierten Fibroblasten im Medienüberstand das extrazelluläre Fragment von NCAM und im Zelllysate das etwa 30 kDa schwere cytoplasmatische Fragment nachzuweisen sind, wurde untersucht, ob in den Vesikeln, die verstärkt nach der Pervanadat-Behandlung von NCAM-eGFP-exprimierenden B35-Zellen sichtbar werden, tatsächlich nur das eGFP-modifizierte intrazelluläre Fragment von NCAM zu finden ist. Zu diesem Zweck wurden die behandelten Zellen sowie Kontrollzellen, die nur in serumfreiem Medium inkubiert wurden, nach dem Fixieren permeabilisiert und für 30 Minuten mit dem 123C3-AK inkubiert. Dieser AK bindet an die extrazellulären Domänen von NCAM und kann nicht die „gesheddeten“ cytosolischen (bzw. transmembranen) NCAM140- und NCAM180-Fragmente erkennen (s. Kapitel 3.4.2., Abb. 3.21.).

Die Zellen, die in den Abb. 3.18a. und 3.18b. dargestellt sind, wurden auf diese Weise nach der Pervanadat-Behandlung mit dem 123C3-AK und anschließend einem rot fluoreszierenden Zweit-AK inkubiert. Die Vermutung, dass die AK-Behandlung lediglich zu einem Anfärben des membranständigen NCAMs führt und die Vesikel nur grün fluoreszieren, konnte allerdings nicht bestätigt werden. Es ist zu erkennen, dass sämtliche intrazellulären Bereiche, die NCAM-eGFP enthalten, sowohl rot als auch grün fluoreszieren. Lediglich bei zwei der untersuchten Zellen war jeweils ein Vesikel zu erkennen, der keine rote Fluoreszenz zeigte. Insgesamt wurden dabei in zwei Versuchen, deren Bilder am Konfokal-Mikroskop aufgenommen wurden, 43 Zellen untersucht. Außerdem wurde auch dieser Versuch zuvor bereits je einmal mit NCAM140-eGFP und NCAM180-eGFP durchgeführt und die Bilder an einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einem 100x-Öl-Objektiv aufgenommen (nicht gezeigt). Bei diesen Versuchen war kein einziger nur grün fluoreszierender Vesikel zu beobachten, sondern in allen Fällen war ebenfalls eine Rotfärbung sichtbar.

Dies bedeutet, dass in den Vesikeln zumindest teilweise auch komplettes NCAM140/180-eGFP enthalten sein muss und dass das Pervanadat nicht nur „Shedding“ von NCAM, sondern auch Endocytose von NCAM bewirkt. Eine Quantifizierung, wie viel des eGFP-

Fluoreszenzsignals eines Vesikels nur dem „gesheddeten“, intrazelluläre Fragment von NCAM-eGFP zuzuordnen war und wie viel auf das vollständige NCAM140/180-eGFP entfiel, kann jedoch mit Hilfe der durchgeführten Experimente nicht bestimmt werden. Auch kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob in den Vesikeln überhaupt „gesheddetes“ NCAM-eGFP vorliegt.

3.4.2. „Shedding“ von NCAM140/180- Δ ENESKA

Um zu untersuchen, ob das Fehlen der letzten sechs C-terminalen Aminosäuren von NCAM140 bzw. NCAM180 einen Einfluss auf das Pervanadat-induzierte „Shedding“ hat, wurden B35-Zellen transient mit den entsprechenden cDNAs von NCAM140/180- Δ ENESKA sowie zur Kontrolle mit NCAM140/180-WT transfiziert und für 60 Minuten mit Pervanadat behandelt. Bei einem Experiment wurden stabil transfizierte Zellen verwendet. Anschließend wurden sowohl die Lysate als auch die Medienüberstände mittels SDS-PAGE und Western Blot auf NCAM bzw. dessen Fragmente untersucht (s. Kapitel 2.2.20.). Der Versuch wurde insgesamt sechsmal durchgeführt, die Medienüberstände konnten dabei allerdings nur in vier (NCAM140-WT/ Δ ENESKA) bzw. drei (NCAM180-WT/ Δ ENESKA) Fällen analysiert werden.

Bei NCAM140 und NCAM180 beträgt das apparente Molekulargewicht der extrazellulären Domäne etwa 115 kDa. Eine Bande auf dieser Höhe wird also nach der Pervanadat-Behandlung in den Western Blots der Medienüberstände erwartet. In den Lysaten sollte hingegen zum Einen das komplette NCAM mit einem Molekulargewicht von 140 bzw. 180 kDa und zum Anderen das cytosolische Fragment samt Transmembrandomäne enthalten sein. Letzteres hat dementsprechend ein Molekulargewicht von 30 kDa bei NCAM140 oder 70 kDa bei NCAM180 (s. auch Diestel et al., 2005 und Hinkle et al., 2006).

In Abb. 3.20. ist zu erkennen, dass in den Lysaten der mit Pervanadat behandelten Zellen sowie in den Kontrollen, die für 60 Minuten nur in serumfreiem Medium inkubiert wurden, deutliche Banden bei 140 bzw. 180 kDa sichtbar sind. Sowohl bei den mit NCAM140/180-WT als auch den mit NCAM140/180- Δ ENESKA transfizierten Zellen war die Transfektion erfolgreich. Die B35-Zellen, die nur mit dem leeren pcDNA3-Vektor transfiziert wurden, weisen lediglich die Aktin-Banden auf, jedoch keine bei 140 oder 180 kDa. Bei NCAM140-WT und NCAM140- Δ ENESKA sind ohne Pervanadat geringfügig stärkere Banden zu erkennen als mit Pervanadat. Diese Unterschiede sind bei NCAM180-WT und NCAM180- Δ ENESKA nicht sichtbar. Allerdings war bei anderen Versuchen auch bei den mit NCAM180

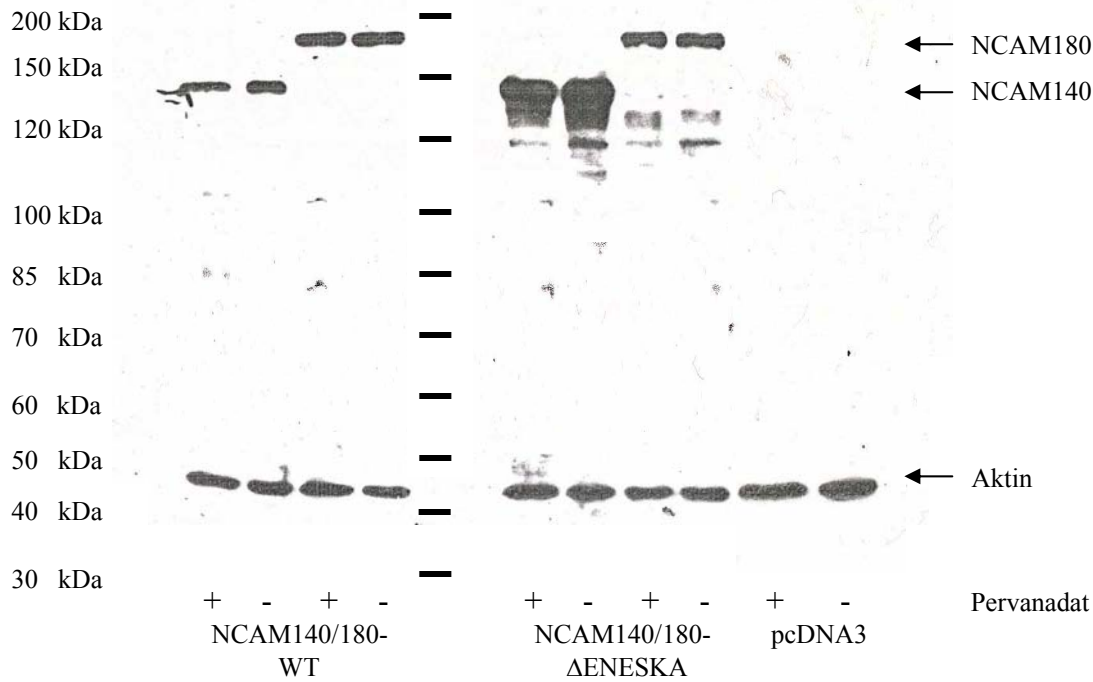


Abb. 3.20.: Western Blot Analyse der Lysate von transient mit NCAM140/180-WT- oder NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen nach 60-minütiger Behandlung mit Pervanadat (+) oder Inkubation in serumfreiem Medium (-) sowie von transient mit leerem pcDNA3-Vektor transfizierten B35-Zellen

Der Western Blot wurde mit dem OB11-AK (1:1.000; nur NCAM140/180-WT) oder mit dem 123C3-AK (1:1.000) und POD-gekoppeltem Zweit-AK entwickelt. Der Nachweis von Aktin mit einem anti-Aktin-AK (1:5.000) dient als Kontrolle, dass in allen Ansätzen gleiche Gesamtproteinmengen aufgetragen wurden.

transfizierten Zellen eine solche Tendenz zu erkennen. Insgesamt war aber sowohl bei NCAM140 als auch bei NCAM180 in den meisten Fällen kein Unterschied in der Bandenstärke mit oder ohne Pervanadat sichtbar. Dies ist dadurch zu erklären, dass wahrscheinlich nur ein geringer Anteil der NCAM-Moleküle nach Pervanadat-Behandlung „gesheddet“ werden, so dass in den Lysaten dieser geringe Unterschied kaum erkennbar wird.

Bei den ersten Experimenten stellte sich heraus, dass der OB11-AK, dessen Bindedomäne im cytosolischen Bereich von NCAM140/180 liegt, die Δ ENESKA-Mutanten nicht erkennt. Gleiches zeigte sich ebenfalls für den 5B8-AK (nicht gezeigt). Da ein weiterer AK, der die cytosolische Domäne von NCAM erkennt, nicht verfügbar war, wurden die Blots mit den NCAM140/180- Δ ENESKA-Lysaten mit dem 123C3-AK behandelt, auch wenn dieser nur das komplette oder das extrazelluläre Fragment von NCAM140/180 erkennt (s. unten). Ein cytosolisches Fragment bei 30 kDa bzw. 70 kDa konnte jedoch auch bei den mit NCAM140/180-WT transfizierten Zellen mit dem OB11-AK bei keinem Versuch nachgewiesen werden, auch nicht nach Pervanadat-Behandlung. Daher kann anhand der Untersuchungen der Lysate keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Deletion des ENESKA-Bereiches eine Bedeutung für das Pervanadat-induzierte „Shedding“ hat.

Anhand der Analyse der Medienüberstände, die direkt nach der Pervanadat-Behandlung abgenommen und konzentriert wurden, lässt sich jedoch feststellen, dass auch das mutierte NCAM, dem die sechs C-terminalen Aminosäuren fehlen, ebenso wie der Wildtyp „gesheddet“ wird (s. Abb. 3. 21.). Sowohl bei NCAM140 als auch bei NCAM180 führt die Pervanadat-Behandlung beim Wildtyp und der Mutante zu einem deutlichen Anstieg des 115 kDa großen extrazellulären Fragments von NCAM im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. In den Medienüberständen der mit leerem Vektor transfizierten parentalen B35-Zellen konnte mit dem 123C3-AK kein NCAM-Fragment nachgewiesen werden.

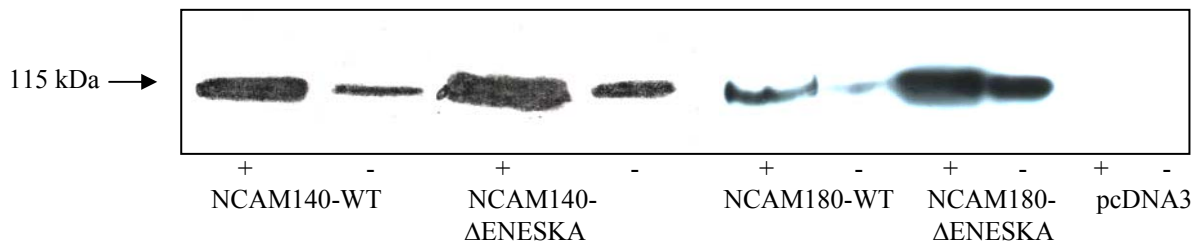


Abb. 3.21.: Western Blot Analyse der konzentrierten Medienüberstände von transient mit NCAM140/180-WT oder NCAM140/180- Δ ENESKA transfizierten B35-Zellen nach 60-minütiger Behandlung mit (+) oder ohne (-) Pervanadat sowie von transient mit leerem pcDNA3-Vektor transfizierten B35-Zellen
Der Western Blot wurde mit dem 123C3-AK (1:1.000) und POD-gekoppeltem Zweit-AK entwickelt.

Diese Ergebnisse zeigen außerdem, dass der anti-NCAM-AK 123C3 tatsächlich das extrazelluläre Fragment von NCAM erkennt. Es war zwar bekannt, dass dieser AK extrazellulär in der Nähe der Transmembrandomäne bindet (Eckhardt, 1995), der genaue Ort ist jedoch unbekannt. Auch die Aminosäuren, zwischen denen NCAM nach Pervanadat-Behandlung geschnitten wird, sind bisher nicht definitiv bekannt, befinden sich aber ebenfalls extrazellulär nahe der Transmembrandomäne.

Nachdem bereits in Kapitel 3.3. gezeigt wurde, dass die Deletion des C-Terminus von NCAM140 und NCAM180 weder einen Einfluss auf das Neuritenwachstum von transfizierten B35-Zellen noch auf die Endocytose von NCAM140 in der gleichen Zelllinie hat, konnte mit diesen Experimenten ebenfalls gezeigt werden, dass die ENESKA-Domäne funktionell nicht an einem Pervanadat-induzierten „Shedding“ von NCAM beteiligt ist.

3.5. Untersuchungen der Zellmigration

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit war es, die Migration von B35-Zellen zu untersuchen, die stabil mit der cDNA von NCAM140/180-WT sowie diverser NCAM-Mutanten transfiziert worden waren. Dabei handelte es sich um die NCAM140-T803A- und -T803D- sowie die NCAM140/180- Δ ENESKA-Mutanten, die schon in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden. Auch mit der NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-Mutante, die bereits in Kapitel 3.3. erwähnt wurde, wurden Migrationsversuche durchgeführt. Außerdem wurden NCAM140-Y734F- und NCAM180-Y734F-Mutanten untersucht, bei denen ein Tyrosinrest nahe der Transmembrandomäne im cytosolischen Bereich gegen ein Phenylalanin, welches nicht phosphoryliert werden kann, ausgetauscht wurde.

Eine Methode, die zur Untersuchung der Zellwanderung verwendet wurde, war der haptotaktische Zellmigrationsversuch mit Hilfe von Transwell-Kammern. Hierbei wird die gerichtete Migration durch eine Membran mit einer bestimmten Porengröße zu der mit einem oder mehreren ECM-Proteinen beschichteten Membranunterseite gemessen (s. Kapitel 2.2.23.1.). Mit dieser Methode wurden jedoch nur die NCAM140/180- Δ ENESKA- sowie die NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen und die entsprechenden NCAM-WT-transfizierten Zellen untersucht.

Die ersten Experimente von stabil mit NCAM140-WT- sowie den beiden Mutanten NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140- Δ ENESKA/T803A-transfizierten B35-Zellen zeigten keine Unterschiede in der Anzahl der in Richtung Fibronectin gewanderten Zellen zwischen diesen drei Zelllinien (s. Abb. 3.22.). Zu dem ECM-Gemisch hin konnte jedoch für den NCAM140-WT eine verstärkte Wanderung im Vergleich zu den beiden Mutanten festgestellt werden.

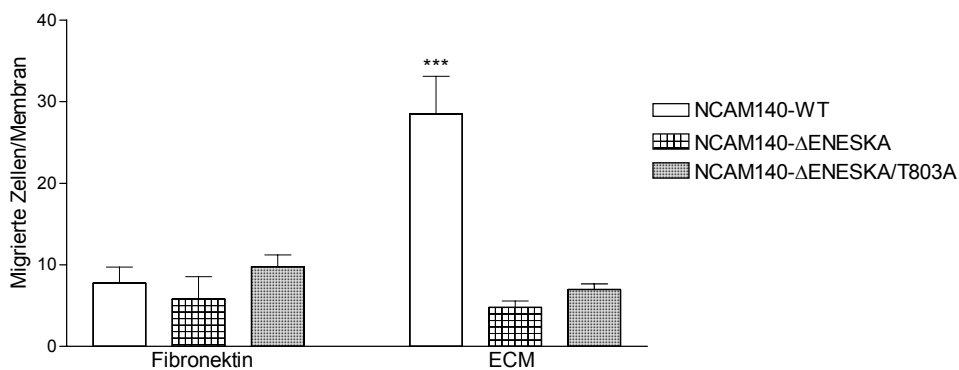


Abb. 3.22.: Haptotaktische Migrationsversuche von NCAM140-WT-, NCAM140- Δ ENESKA- und NCAM140- Δ ENESKA/T803A-transfizierten B35-Zellen in mit Fibronectin oder einem ECM-Gemisch beschichteten Transwell-Kammern

Die Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

*** = $p < 0,0001$

Allerdings fällt auf, dass insgesamt nur sehr wenige Zellen die Membran in Richtung der ECM-Beschichtung passiert haben, auch von den NCAM140-WT-transfizierten Zellen. Dennoch gab dieses Experiment einen Hinweis darauf, dass die ENESKA-Domäne für die Zellmigration von Bedeutung zu sein könnte. Diese Vermutung ließ sich durch die Timelapse-Versuche mit den Δ ENESKA-Mutanten auf Laminin bestätigen (s. Abb. 3.32.).

Der Versuch, die gerichtete Zellmigration der beiden stabil mit NCAM140- bzw. NCAM180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen in Transwell-Kammern zu einer Laminin-Beschichtung zu untersuchen, gelang jedoch nicht. Die Abb. 3.23. zeigt das Ergebnis eines Experiments, bei dem zu erkennen ist, dass alle untersuchten Zelltypen nahezu komplett die Membran passiert haben. D. h., dass bei allen vier Zelllinien die Anzahl der migrierten Zellen fast der Gesamtzahl an ausplattierten Zellen entsprach. Auch eine Wiederholung dieses Experiments führte zu dem selben Ergebnis, so dass keine Unterschiede zwischen den Zelllinien erkennbar waren. Die große Anzahl an migrierten Zellen deutet allerdings darauf hin, dass unter Umständen die Membranen fehlerhaft gewesen sein könnten oder Fehler in der Versuchsdurchführung diese nicht auswertbaren Ergebnisse verursacht haben. Jedoch blieb sowohl die Fehlersuche als auch die Verwendung neuer Membranen mit unterschiedlichen Porengrößen erfolglos, so dass diese Versuche nicht fortgeführt wurden.

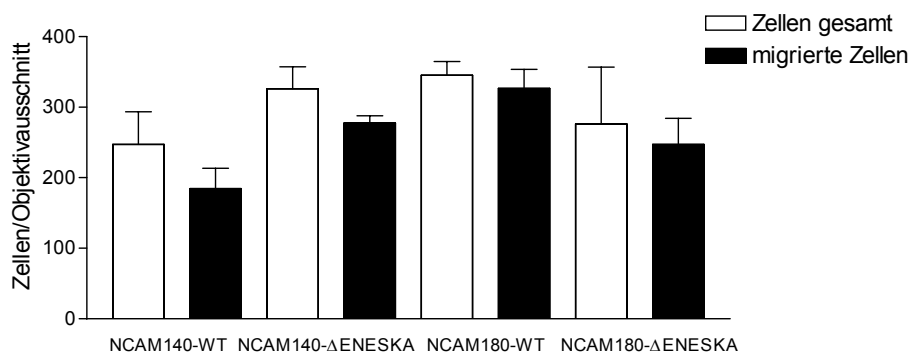


Abb. 3.23.: Haptotaktische Migrationsversuche von NCAM140/180-WT- und NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen in mit Laminin beschichteten Transwell-Kammern

Die Abb. zeigt das Ergebnis eines Experiments.

Mit Ausnahme der NCAM140/180- Δ ENESKA-Mutanten wurden alle mit den genannten mutierten cDNAs stabil transfizierten B35-Zelllinien mit Hilfe von Timelapse-Aufnahmen auf ihre Migrationsgeschwindigkeit auf PLL, COS-7- sowie NCAM140-exprimierenden COS140-Zellen und einem ECM-Gemisch untersucht (s. Kapitel 2.2.23.2.). Die Migration der beiden stabil mit der cDNA von NCAM140- bzw. NCAM180- Δ ENESKA transfizierten Zelllinien wurde außer auf PLL, COS-7- sowie COS140-Zellen auch auf dem ECM-Protein Laminin gemessen.

Zur Kontrolle wurden immer gleichzeitig die Migrationsgeschwindigkeiten der mit NCAM140- bzw. NCAM180-WT stabil transfizierten Zellen bestimmt. Auf PLL, dem ECM-Gemisch und Laminin wurde außerdem die Migration von parentalen B35-Zellen im Vergleich zu NCAM140-WT-transfizierten Zellen gemessen.

In Abb. 3.24a. und 3.24b. sind exemplarisch jeweils die ersten beiden Bilder der Aufnahmereihen von NCAM180-WT-transfizierten B35-Zellen auf mit PLL oder Laminin beschichteten Multiwell-Schalen dargestellt. Die Aufnahmen wurden unter einem Fluoreszenz-Mikroskop gemacht, so dass nur die mit Hoechst-Farbstoff markierten Zellkerne sichtbar sind. Für die Auswertung der Migration mit Hilfe der ImageJ-Software wird ein Schwellenwert („Threshold“) gewählt, wodurch Schwarz-Weiß-Bilder generiert werden, was für die folgende Migrationsanalyse der nun schwarzen Zellkerne nötig ist. Das Mtrack2-PlugIn der ImageJ-Software kann die genauen Positionen der Mittelpunkte der Zellkerne über alle 32 Bilder erkennen und die gewanderte Strecke in Bildpixeln jedes Zellkerns von einem Bild zum Nächsten berechnen. Am Ende werden diese 31 Einzelwege addiert, so dass sich die gesamte Wanderung über den Messungszeitraum von 16 Stunden ergibt. Diese Wanderungen aller Zellen einer Bilderreihe werden ebenfalls von der Software dargestellt. So kann an diesen Pfaden im Beispiel von NCAM180-WT bereits deutlich erkannt werden, dass diese Zelllinie auf PLL (s. Abb. 3.24a.) nur sehr wenig wandert, während auf Laminin fast alle von der Software erfassten Zellen sehr stark migrieren.

Auch bei schnell wandernden und relativ dicht ausplattierten Zellen konnte die Software mit guter Genauigkeit die Zellkerne von einem Bild zum Nächsten verfolgen. Allerdings hat das Programm nur die Zellen gemessen, die über den gesamten Zeitraum in dem Ausschnitt sichtbar waren. Zellkerne, die verblassten, aus dem Bildausschnitt herauswanderten oder einem anderen Kern so nahe kamen, dass sie diesen scheinbar berührten und dadurch zu groß wurden, hat die Software nicht berücksichtigt.

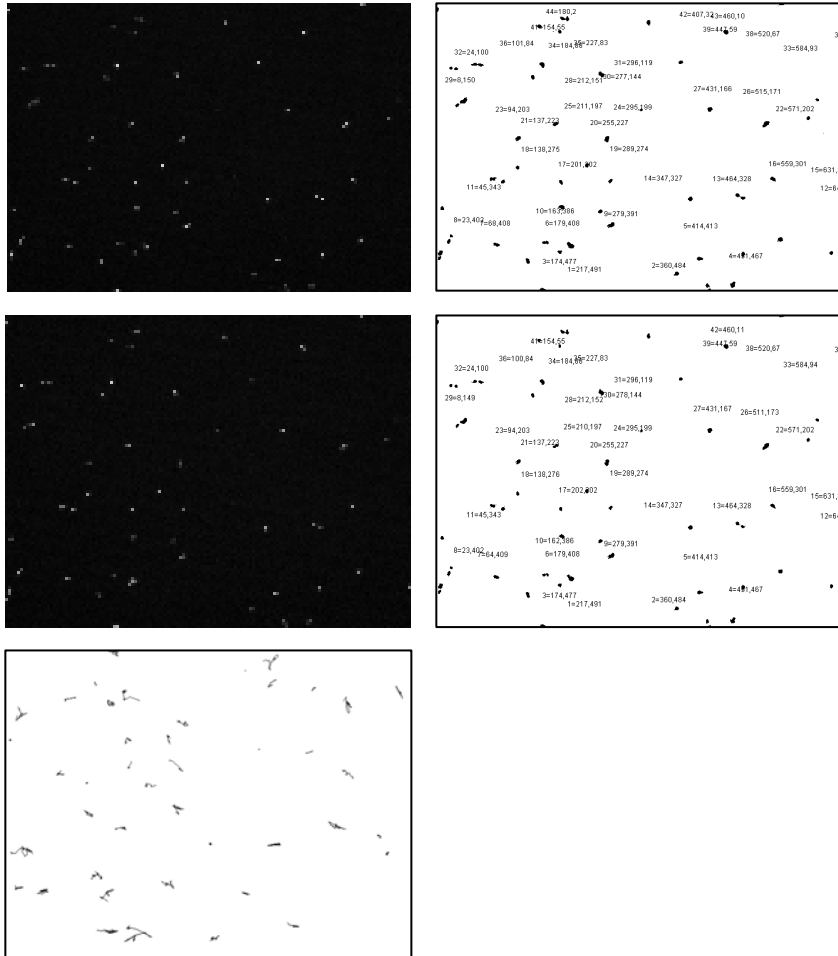


Abb. 3.24a.: Timelapse-Aufnahmen von NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen auf PLL

Bild 1 (Beginn, oben links) und Bild 2 (nach 30 Minuten, Mitte links) von 32 Bildern insgesamt; rechts daneben sind die entsprechenden Bilder mit Positionsangaben nach Analyse mit der ImageJ-Software. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 markiert. Unten sind die Pfade der analysierten Zellen über alle 32 Bilder zu sehen.

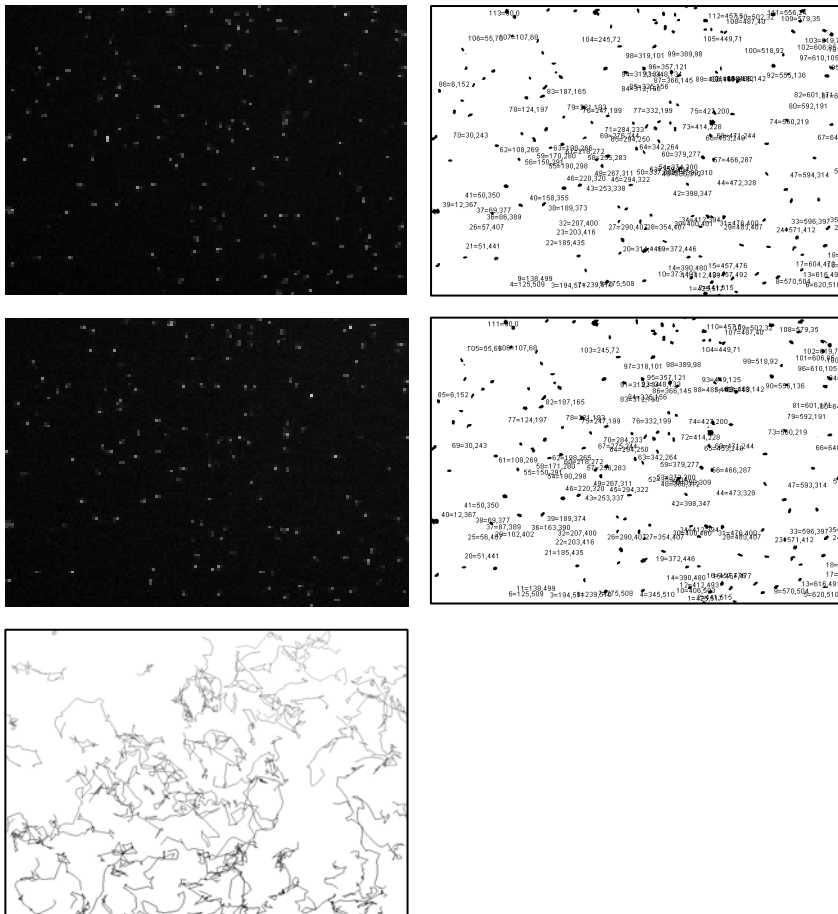


Abb. 3.24b.: Timelapse-Aufnahmen von NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen auf Laminin

Bild 1 (Beginn, oben links) und Bild 2 (nach 30 Minuten, Mitte links) von 32 Bildern insgesamt; rechts daneben sind die entsprechenden Bilder mit Positionsangaben nach Analyse mit der ImageJ-Software. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 markiert. Unten sind die Pfade der analysierten Zellen über alle 32 Bilder zu sehen.

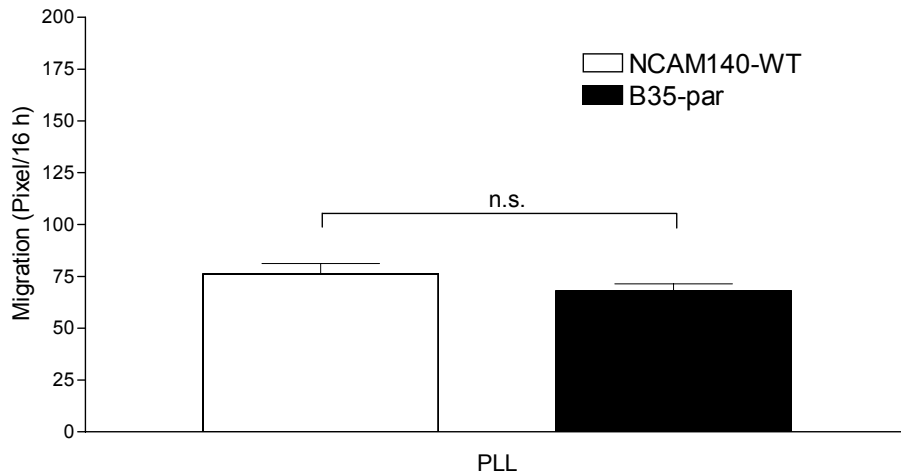


Abb. 3.25.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT-exprimierenden B35-Zellen und parentalen B35-Zellen (B35-par) auf PLL

Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 50 und 80 Zellen gemessen.

n.s. = nicht signifikant

Der Vergleich zwischen den parentalen, NCAM-negativen B35-Zellen und den humanes NCAM140-exprimierenden B35-Zellen zeigt auf PLL keinen signifikanten Unterschied in der Zellmigration (s. Abb. 3.25.). Auf dem ECM-Gemisch war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Allerdings war die Zellmigration auf dem ECM-Gemisch bei sämtlichen untersuchten Zelllinien noch deutlich geringer als auf PLL, obwohl schon auf diesem NCAM-inerten Substrat lediglich eine sehr schwache Zellmigration der (transfizierten) B35-Zellen zu erkennen war (s. auch Abb. 3.24a.). Dass die Ergebnisse der Messungen aller Zelllinien auf dem ECM-Gemisch nahezu identisch waren und fast keine Migration zu erkennen war (jeweils ca. 40 Pixel/16 Stunden), war vermutlich auf eine falsche Beschreibung des Herstellers zur Beschichtung zurückzuführen, wie spätere Untersuchungen im Rahmen einer Diplomarbeit ergaben (Salomon, 2009).

In Abb. 3.26. sind die Ergebnisse der Messungen mit den NCAM-T803A- und den NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen dargestellt. Während auf PLL die NCAM140-T803A-Mutante gegenüber dem Wildtyp keinen signifikanten Unterschied zeigt, migriert die NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-Mutante schneller und hat mit 121 Pixeln/16 Stunden den höchsten aller gemessenen Werte auf PLL. Darüber hinaus zeigt diese Mutante die Besonderheit, dass es die einzige der untersuchten Zelllinien ist, deren Migrationsgeschwindigkeit auf einem Monolayer von COS-7-Zellen nicht signifikant erhöht ist gegenüber PLL. Alle anderen Zelllinien migrieren auf PLL signifikant langsamer als auf COS-7-Zellen.

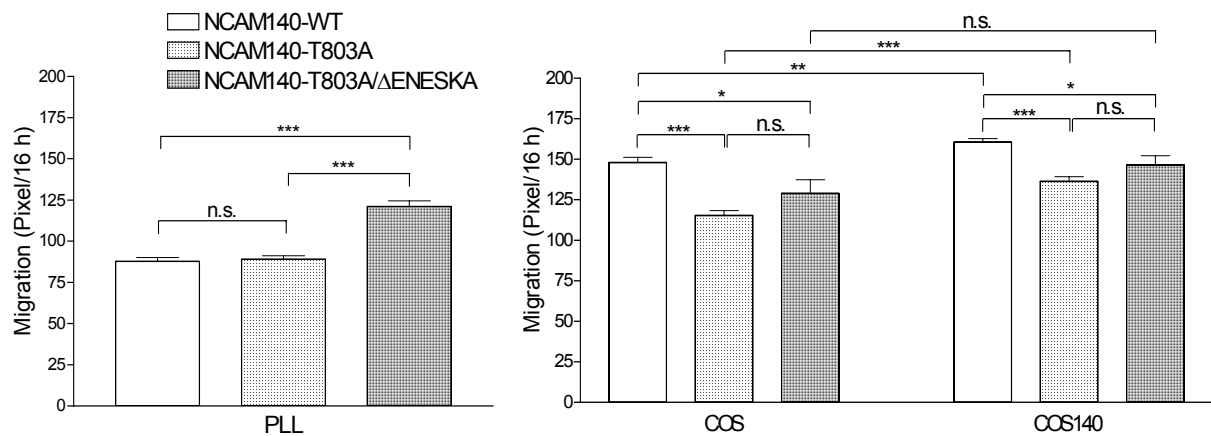


Abb. 3.26.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf PLL (links) und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen (rechts)

Die Ergebnisse für NCAM140-WT resultieren aus sechs (PLL) bzw. vier (COS und COS140) unabhängig durchgeführten Experimenten, die Ergebnisse von NCAM140-T803A/ Δ ENESKA aus vier (PLL) bzw. zwei (COS und COS140) Experimente. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 70 und 120 Zellen (PLL) bzw. 20 bis 80 Zellen (COS und COS140) gemessen.

*** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

Auf COS-7-Zellen zeigen die NCAM140-T803A-exprimierenden Zellen gegenüber den NCAM140-WT-exprimierenden Zellen ein signifikant geringeres Migrationsverhalten. Auch die Doppelmutante migriert schwachsignifikant weniger als der Wildtyp und unterscheidet sich nicht signifikant von den NCAM140-T803A-exprimierenden Zellen. Während der Kontakt zwischen NCAM140-exprimierenden COS140-Zellen und NCAM140-WT- und -T803A-exprimierenden Zellen zu einer schnelleren Migration im Vergleich zum Kontakt zu nichttransfizierten COS-7-Zellen führt, ist dieser Vergleich bei NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-transfizierten Zellen nicht signifikant. Allerdings ist bei anderen Versuchsreihen dieser Vergleich für die NCAM140-WT-transfizierten Zellen ebenfalls nicht (s. Abb. 3.28. und 3.29.) oder nur schwachsignifikant (s. Abb. 3.27.) bzw. auf COS140-Zellen sogar signifikant langsamer (s. Abb. 3.32a.). Daran ist zu erkennen, dass es bei Timelapse-Messungen beim Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsreihen zu relativ geringen, aber dennoch unterschiedlichen Ergebnissen der Migrationsgeschwindigkeiten bei derselben Zelllinie kommen kann, so dass verlässliche Daten nur durch eine Vielzahl an Messwiederholungen gewonnen werden können.

Die NCAM140-T803D-exprimierenden Zellen weisen wie die NCAM140-T803A-transfizierten Zellen auf PLL ebenfalls kein verändertes Migrationsverhalten im Vergleich zu NCAM140-WT-exprimierenden Zellen auf (s. Abb. 3.27.). Auf COS-7-Zellen (schwachsignifikant) und COS140-Zellen (hochsignifikant) migrieren die NCAM140-T803D-exprimierenden Zellen jedoch schneller als die NCAM140-WT-transfizierten Zellen. Auf COS140-Zellen migriert die Mutante hochsignifikant schneller als auf COS-7-Zellen, beim Wildtyp ist nur eine schwachsignifikante Steigerung zu beobachten.

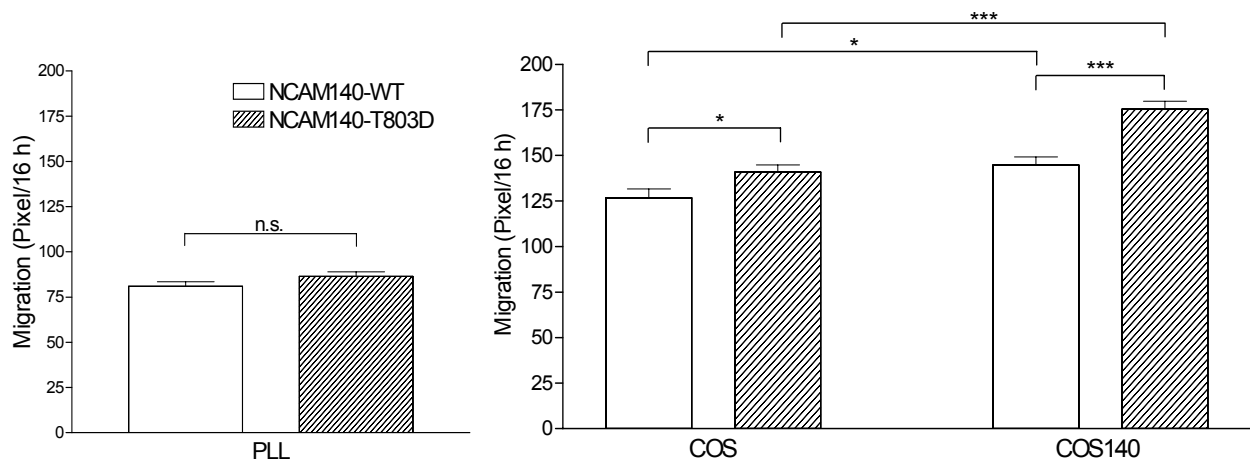


Abb. 3.27.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf PLL (links) und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen (rechts)

Die Ergebnisse resultieren aus fünf (PLL) bzw. drei (COS und COS140) unabhängig durchgeführten Experimenten. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 80 und 140 Zellen (PLL) bzw. 20 bis 70 Zellen (COS und COS140) gemessen.

*** = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

In Abb. 3.28. sind die Ergebnisse der Timelapse-Messungen mit den NCAM140-Y734F-exprimierenden B35-Zellen, die in früheren Versuchen ein gegenüber dem Wildtyp gesteigertes Neuritenwachstum auf COS140-Zellen nur nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP zeigten (Diestel, unveröffentlichte Ergebnisse), dargestellt. Auf PLL und COS140-Zellen migrieren diese Zellen schneller als die NCAM140-WT-exprimierenden Zellen. Auf nichttransfizierten COS-7-Zellen ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Während die Mutante auf COS140-Zellen allerdings signifikant schneller migriert als auf COS-7-Zellen, ist diese Steigerung in dieser Versuchsreihe für den NCAM140-WT wie zuvor bereits erwähnt nicht zu beobachten.

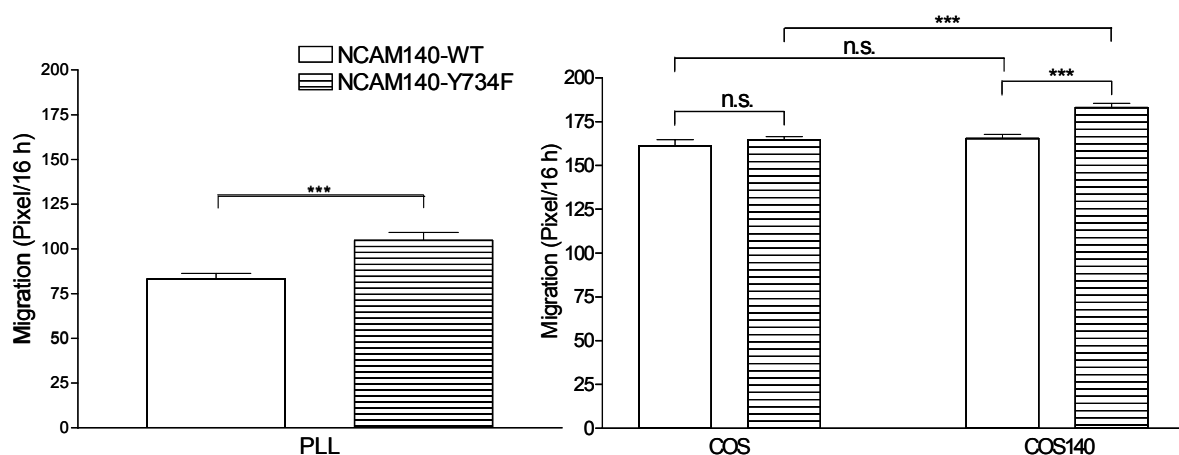


Abb. 3.28.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-Y734F-exprimierenden B35-Zellen auf PLL (links) und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen (rechts)

Die Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 60 und 140 Zellen (PLL) bzw. 70 bis 160 Zellen (COS und COS140) gemessen.

*** = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

Außerdem wurden Versuche durchgeführt, bei denen NCAM140-WT- und NCAM180-WT-transfizierte Zellen vergleichend untersucht wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3.29. dargestellt.

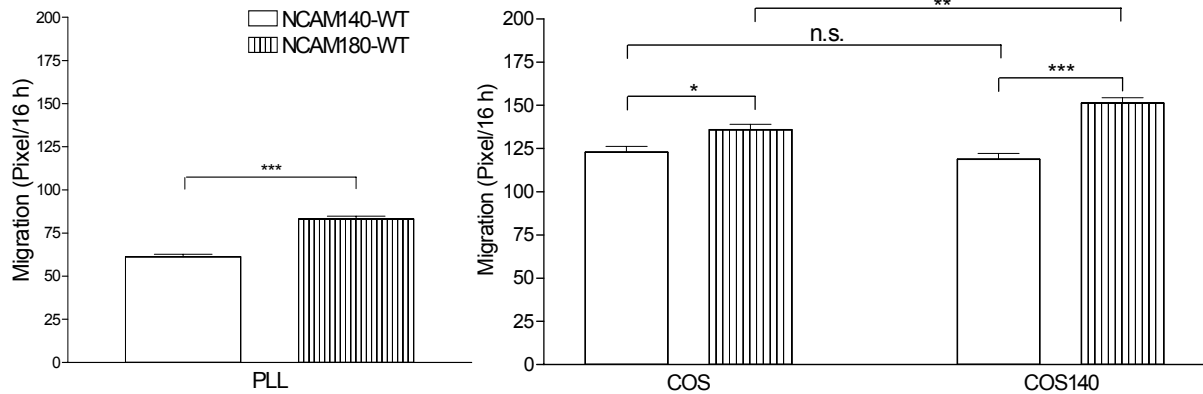


Abb. 3.29.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM140-WT- und NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen auf PLL (links) und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen (rechts)

Die Ergebnisse resultieren aus sieben (PLL) bzw. fünf (COS und COS140) unabhängig durchgeführten Experimenten. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 100 und 170 Zellen (PLL) bzw. 40 bis 60 Zellen (COS und COS140) gemessen.

*** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

Es ist zu erkennen, dass NCAM180-WT-exprimierende B35-Zellen auf PLL und auf beiden COS-Monolayern schneller migrieren als NCAM140-WT-exprimierende Zellen. Allerdings ist der Unterschied auf nichttransfizierten COS-7-Zellen lediglich schwachsignifikant. Im Vergleich zwischen den Ergebnissen auf COS-7- und COS140-Zellen ist beim NCAM140-WT erneut kein signifikanter Unterschied zu beobachten, wohingegen bei den NCAM180-WT-transfizierten Zellen der Kontakt zu den NCAM140-präsentierenden COS-Zellen eine weitere, wenn auch nur mäßig signifikante Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit bewirkt.

Die NCAM180-Y734F-exprimierenden B35-Zellen zeigen im Gegensatz zu den NCAM140-Y734F-exprimierenden Zellen (s. Abb. 3.28.) im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen eine geringere Migrationsgeschwindigkeit (s. Abb. 3.30.). Die Ergebnisse mit dieser Mutante, für die Diestel et al. (2004) ein verstärktes Neuritenwachstum sowohl auf PLL als auch auf COS-7- und COS140-Zellen zeigen konnten, basieren wie die der NCAM140-Y734F-transfizierten Zellen allerdings nur auf zwei Versuchen. Hochsignifikant langsamer als der Wildtyp migrieren die NCAM180-Y734F-transfizierten Zellen nur auf COS-7-Zellen, während die Unterschiede auf PLL und COS140-Zellen lediglich schwachsignifikant sind. Auf COS140-Zellen migriert die Mutante allerdings hochsignifikant schneller als auf COS-7-Zellen, wohingegen die NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen wie schon in Abb. 3.29. gezeigt lediglich schwachsignifikant schneller migrieren.

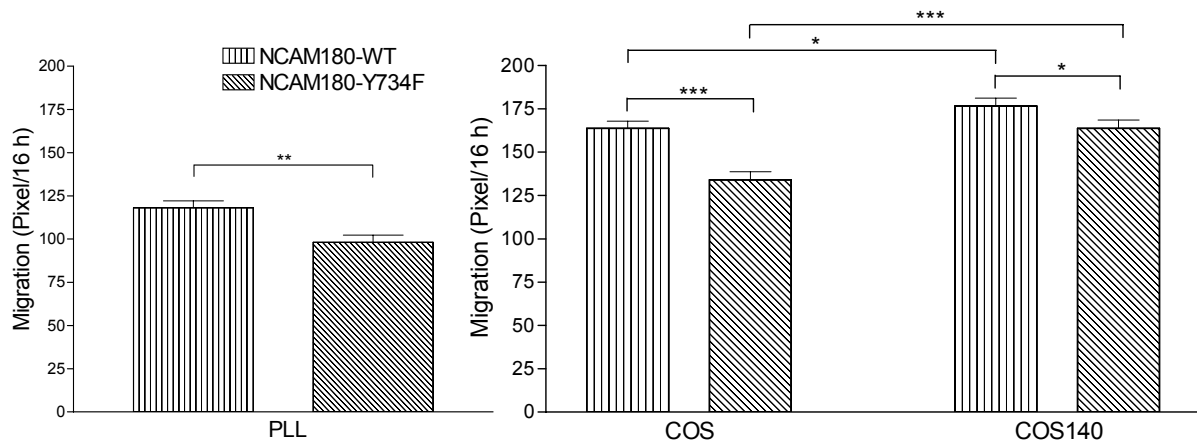


Abb. 3.30.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden \pm SEM von NCAM180-WT- und NCAM180-Y734F-exprimierenden B35-Zellen auf PLL (links) und einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen (rechts)

Die Ergebnisse resultieren aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 80 und 130 Zellen (PLL) bzw. 40 bis 60 Zellen (COS und COS140) gemessen.

*** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$

Unabhängig von den zuvor gezeigten Ergebnissen wurden zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls Timelapse-Untersuchungen mit den beiden NCAM140/180- Δ ENESKA-Mutanten durchgeführt. In Abb. 3.31a. und 3.31b. sind die Ergebnisse dieser Messungen auf COS-7- und COS140-Zellen dargestellt, in Abb. 3.32a. und 3.32b. die der Messungen auf dem ECM-Protein Laminin sowie der gleichzeitig durchgeführten Kontrollversuche auf PLL. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.31b. und 3.32b. wie bei den früheren Untersuchungen nach 16 Stunden gezeigt. Da die NCAM140/180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen jedoch bei Neuritenmessungen unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich mit den entsprechenden Wildtyp-exprimierenden Zellen nach 5 und 24 Stunden auf Laminin zeigten (s. Salomon, 2009), wurden ebenfalls nach 5 Stunden die Migrationsstrecken durch Auswerten lediglich der jeweils ersten 10 Bilder bestimmt (s. Abb. 3.31a. und 3.32a.).

Auf PLL migrieren auch die beiden Δ ENESKA-Mutanten ähnlich gering wie alle anderen zuvor untersuchten Zelllinien. Allerdings konnte dennoch für die NCAM140- Δ ENESKA-transfizierten Zellen nach 16 Stunden eine leicht stärkere Migration, für die NCAM180- Δ ENESKA-transfizierten Zellen eine geringere Migration im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypen festgestellt werden. Wie schon in Abb. 3.29. gezeigt, migrieren die NCAM180-WT-exprimierenden Zellen erneut signifikant schneller als die NCAM140-WT-exprimierenden Zellen. Mit Ausnahme des Vergleiches zwischen den NCAM140-WT- und den NCAM140- Δ ENESKA-transfizierten Zellen sind diese Effekte auch nach 5 Stunden bereits sichtbar.

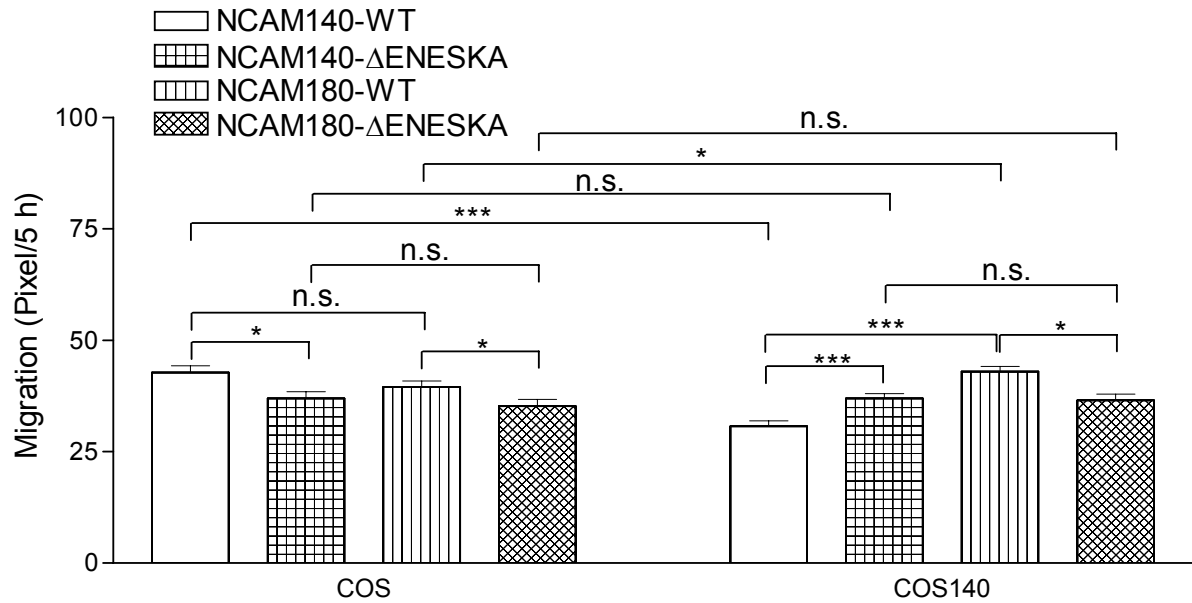


Abb. 3.31a.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 5 Stunden ± SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-ΔENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180-ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen

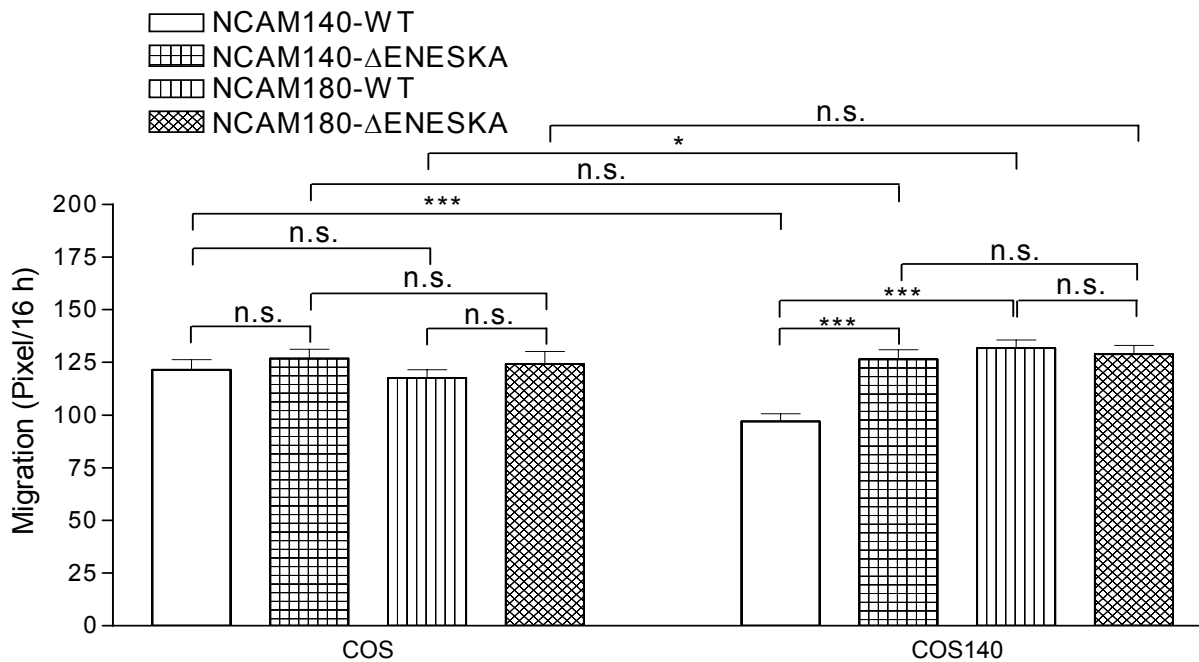


Abb. 3.31b.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden ± SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-ΔENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180-ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von COS-7- oder NCAM140-transfizierten COS140-Zellen

Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 40 und 70 Zellen gemessen.

*** = $p < 0,0001$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

Auf COS-7- und COS140-Zellen konnten keine stärkeren Wanderungsgeschwindigkeiten der ΔENESKA-transfizierten B35-Zellen gegenüber den NCAM140/180-WT-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Lediglich auf COS140-Zellen migrieren die NCAM140-ΔENESKA-exprimierenden Zellen schneller als die NCAM140-WT-exprimierenden Zellen, was auch schon nach 5 Stunden zu erkennen ist. Auf COS140-Zellen konnte ebenfalls, wie

bereits in Abb. 3.29. zu sehen, eine stärkere Migration der NCAM180-WT-transfizierten Zellen im Vergleich zu den NCAM140-WT-transfizierten Zellen gemessen werden. Auch dies war sowohl nach 16 Stunden als auch bereits nach 5 Stunden sichtbar. Auf COS-7-Zellen konnte jedoch weder nach 5 noch nach 16 Stunden ein Unterschied zwischen den NCAM140-WT- und den NCAM180-WT-exprimierenden Zellen festgestellt werden.

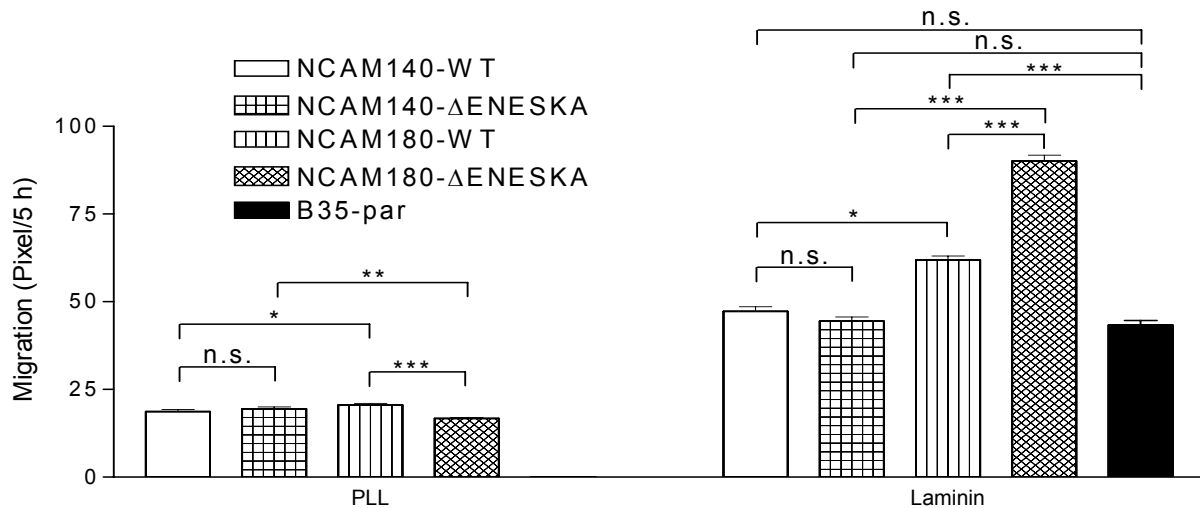


Abb. 3.32a.: Timelapse-Untersuchungen in Pixeln je 5 Stunden ± SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-ΔENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180-ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen und parentalen B35-Zellen (B35-par) auf PLL und Laminin

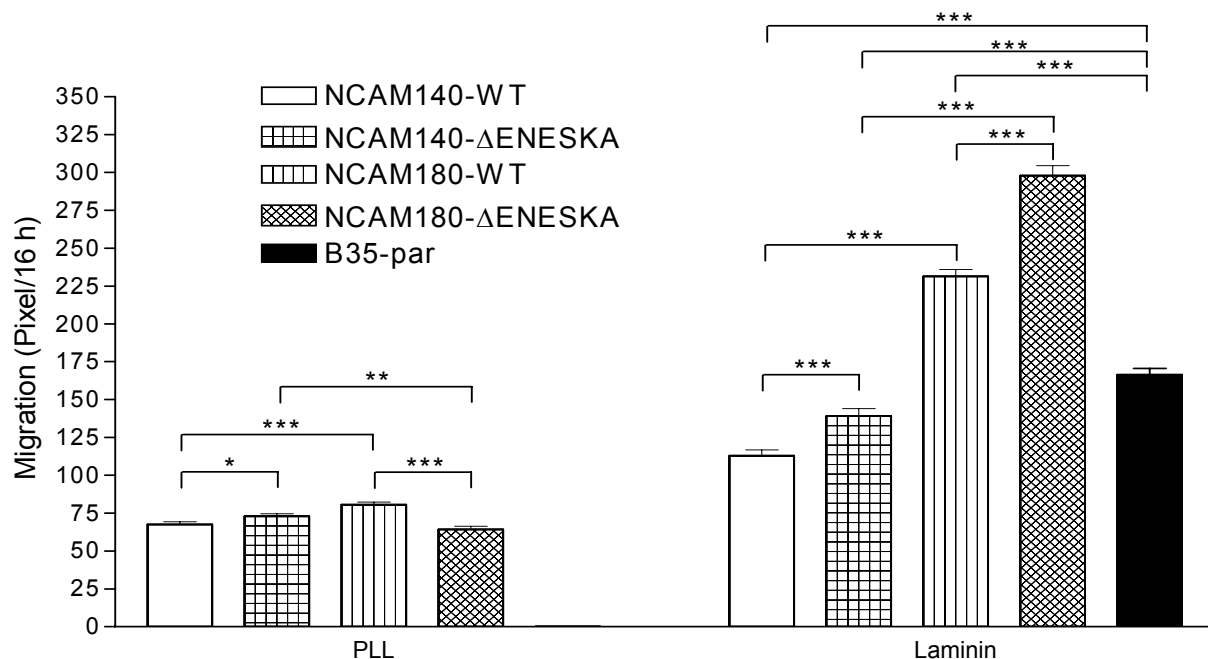


Abb. 3.32b.: Timelapse-Untersuchung in Pixeln je 16 Stunden ± SEM von NCAM140-WT- und NCAM140-ΔENESKA- sowie NCAM180-WT- und NCAM180-ΔENESKA-exprimierenden B35-Zellen und parentalen B35-Zellen (B35-par) auf PLL und Laminin

Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Bei jedem Versuch wurden jeweils von jeder Bedingung zwischen 80 und 130 Zellen (PLL) bzw. 300 und 400 Zellen (Laminin) gemessen.

*** = $p < 0,0001$; ** = $p < 0,005$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant

Während bei den NCAM140/180-ΔENESKA-transfizierten Zellen der Kontakt zu den NCAM140-exprimierenden COS140-Zellen zu keiner weiteren Erhöhung der

Migrationsgeschwindigkeit im Vergleich zum Kontakt zu NCAM-negativen COS-7-Zellen führt, ist bei den NCAM180-WT-transfizierten Zellen wie auch schon zuvor (s. Abb. 3.29. und Abb. 3.30.) eine schnellere Migration gemessen worden. Im Gegensatz zu den früheren Versuchen migrieren die NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen auf COS140-Zellen jedoch signifikant langsamer als auf COS-7-Zellen.

Auf dem Extrazellulärmatrixprotein Laminin, welches bei allen Zelllinien zu einer deutlich stärkeren Migration im Vergleich zu PLL führt, die bereits nach 5 Stunden deutlich zu erkennen ist, ist eine niedrigere Wanderungsgeschwindigkeit bei den NCAM140-WT-transfizierten Zellen im Vergleich zu den parentalen B35-Zellen nach 16 Stunden zu beobachten, während die NCAM180-WT-transfizierten Zellen auf Laminin signifikant und deutlich schneller als die parentalen B35-Zellen migrieren. Die Deletion der letzten sechs C-terminalen Aminosäuren führt sowohl bei NCAM140 als auch bei NCAM180 zu einer hochsignifikanten Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit gegenüber dem entsprechenden Wildtyp. Bei NCAM140- Δ ENESKA nähert sich das Ergebnis dem der parentalen B35-Zellen an, liegt allerdings immer noch signifikant unter diesem. Allerdings ist nach 5 Stunden zwischen den NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA-transfizierten Zellen sowie den parentalen B35-Zellen noch kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die NCAM180-WT-exprimierenden Zellen zeigen auf Laminin die höchsten Migrationswerte aller mit NCAM140-WT- und NCAM180-WT-transfizierten Zellen durchgeführten Versuche auf verschiedenen Substraten. Und die NCAM180- Δ ENESKA-transfizierten Zellen zeigen die höchsten gemessenen Migrationswerte überhaupt (298 Pixel/16 h). Bemerkenswert sind auch die sehr viel höheren Migrationswerte gegenüber NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA-exprimierenden Zellen. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die ENESKA-Sequenz vor allem für die NCAM180-abhängige Zellmigration von Bedeutung ist.

Kapitel 4

Diskussion

Obwohl das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM zu den am besten untersuchten Zelladhäsionsmolekülen gehört, ist noch weitgehend unklar, wie auf molekularer Ebene die cytoplasmatischen Domänen von NCAM140 und NCAM180 Signale weiterleiten und somit spezifische Zellantworten auslösen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Mutanten von NCAM140 und NCAM180 hergestellt, bei denen definierte intrazelluläre Epitope modifiziert wurden, um Aufschlüsse über deren Funktionen zu erlangen.

Zum Einen war dies ein innerhalb der PEST-Sequenz von NCAM140 an Position 803 gelegenes Threonin (T803), welches das einzige Threonin dieser PEST-Sequenz darstellt, das mit hoher Wahrscheinlichkeit phosphoryliert wird. Mit Hilfe des Computerprogramms NetPhos 2.0 konnte für das besagte, innerhalb einer MAP-Kinase Konsensussequenz befindliche Threonin eine Phosphorylierungswahrscheinlichkeit von $p = 0,732$ errechnet werden.

Zum Anderen wurden die letzten sechs C-terminalen Aminosäuren von NCAM140 und NCAM180 deletiert (Δ ENESKA), die hochkonserviert in vielen Spezies vorkommen und deren letzte vier Aminosäuren ein Klasse I PDZ-Bindemotiv repräsentieren (s. Kapitel 1.1.1.).

4.1. Funktionen des Threonins 803 von NCAM140 bei Endocytose, Neuritenwachstum und Zellmigration

In Anlehnung an die Arbeiten über apCAM, dem NCAM-Homolog in der Meeresschnecke *Aplysia* (Mayford et al., 1992; Bailey et al., 1992; 1997), wurde das T803 von NCAM140 entweder gegen die nichtphosphorylierbare Aminosäure Alanin (T803A) oder gegen die eine

Dauerphosphorylierung simulierende Aminosäure Aspartat (T803D) ausgetauscht, um zu untersuchen, ob humanes NCAM auf ähnliche Weise wie apCAM nach Phosphorylierung durch eine MAP-Kinase internalisiert wird.

Während Serotoninapplikation zur Phosphorylierung und anschließender Endocytose von apCAM führt, wird NCAM140 und NCAM180 bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten als Antigen-Antikörper-Komplex mit dem gegen humanes NCAM gerichteten AK 123C3 in die Zelle endocytotisch aufgenommen. Die Bindung des AK bewirkt eine Dimerisierung von NCAM, was eine homophile NCAM-NCAM-cis-Interaktion an der Zelloberfläche stabilisieren könnte, andererseits kann aber die Bindung des AK (die in den FNIII-Domänen stattfindet und nicht im homophilen Bindungsbereich (Eckardt, 1995)) eine heterophile Bindung eines nativen Liganden simulieren. Beide Ereignisse könnten die Clathrin-abhängige (oder unabhängige) Endocytose der AK-NCAM-Komplexe auslösen, die in stabil transfizierten B35-Neuroblastomzellen beobachtet wurde (Quade, 2004; Goschzik, 2004). Diese Methode des AK-„Clusters“ hat außerdem praktisch dieselben Effekte auf NCAM-abhängige Signaltransduktionen und Neuritenwachstum wie der Einsatz rekombinanter NCAM-Fragmente (Schmid et al., 1999) und wurde auch schon 2001 von Long et al. für das Zelladhäsionsmolekül L1 beschrieben. Auch in transient transfizierten primären kortikalen Neuronen konnte die Endocytose von NCAM auf diese Weise induziert werden (Diestel et al., 2007). Ohne Vernetzung mit dem AK ist hingegen in B35-Zellen als auch in Neuronen nur eine sehr schwache konstitutive Endocytose von NCAM zu beobachten. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das T803 von NCAM140 eine wichtige Rolle bei der induzierten Endocytose von NCAM zu spielen scheint und dass eine Beteiligung der MAP-Kinase an diesem Vorgang wahrscheinlich ist. So konnte gezeigt werden, dass der Austausch des T803 gegen Aspartat zu einer signifikanten Erhöhung der endocytierten NCAM-haltigen Vesikel in stabil transfizierten B35-Zellen führt. Auch in kortikalen Neuronen zeigten die NCAM140-T803D-transfizierten Zellen signifikant mehr NCAM-haltige Vesikel als NCAM140-WT-transfizierte Zellen (Diestel, unveröffentlichte Ergebnisse). Durch den Einsatz des MEK-Inhibitors U0126 ließ sich in Einklang mit dieser Beobachtung nur bei NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen die Vesikelzahl hochsignifikant reduzieren, nicht aber bei den NCAM140-T803D-exprimierenden Zellen.

Dass die Simulierung einer Dauerphosphorylierung des T803 von NCAM140 nach AK-Induktion zu einer verstärkten Endocytose führt, die sich auch durch die Inhibierung der MAP-Kinase nicht oder nur sehr schwach wieder reduzieren lässt, deutet stark darauf hin,

dass das T803 von der MAP-Kinase direkt oder indirekt phosphoryliert werden kann und dass dies ein Endocytose-Signal darstellt.

Im Gegensatz zu L1, für das ein Modell aufgestellt wurde, nach dem nach homophiler trans-Interaktion (durch AK-Bindung simuliert) die Endocytose von L1 für die Aktivierung der MAP-Kinase Voraussetzung ist (da die Endocytose nicht durch MAP-Kinase-Inhibitoren gehemmt wird (Schmid et al., 2000)), scheint für NCAM umgekehrt zu gelten, dass die aktivierte MAP-Kinase notwendig für die Endocytose ist (die Endocytose wird durch MAP-Kinase-Inhibitoren gehemmt). Dass die MAP-Kinase nach „Clustern“ von NCAM phosphoryliert und somit aktiviert wird, konnte bereits 1999 von Schmid et al. gezeigt werden.

Diestel et al. (2007) haben darüber hinaus durch Untersuchungen an B35-Zellen und primären kortikalen Neuronen festgestellt, dass NCAM nach AK-„Clustern“ in der cytosolischen Domäne mono-ubiquitiniert wird und dass die Überexpression von Ubiquitin die Endocytoserate von NCAM erhöht. Der größte Teil des endocytierten NCAMs wird allerdings rezykliert und nur ein kleiner Teil wird lysosomal oder proteasomal abgebaut. Auch nach Pervanadat-induziertem „Shedding“ waren nur sehr wenige NCAM-haltige Vesikel mit Lysosomen co-lokalisiert, wie die Experimente mit den NCAM-eGFP-Konstrukten in dieser Arbeit zeigen.

Für apCAM haben Bailey et al. (1997) weiterhin postuliert, dass nach der Threonin-Phosphorylierung innerhalb der PEST-Sequenz eine Konformationsänderung oder eine Ubiquitin-abhängige Spaltung von apCAM innerhalb der cytoplasmatischen Domäne stattfinden und dies zu Veränderungen von Interaktionen mit dem Cytoskelett führen könnte, wodurch apCAM leichter in „coated pits“ assembliert und internalisiert werden könnte. Es ist außerdem noch für weitere Proteine bekannt, dass eine Phosphorylierung Peptid-Sequenzen für Enzyme der Ubiquitinierungs-Maschinerie zugänglich macht und diese Proteine so für einen proteasomalen Abbau markiert werden können (Review s. Glickmann und Ciechanover, 2002). Eine mögliche proteolytische Spaltung von NCAM nach Ubiquitinierung ist allerdings bisher nicht gezeigt worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit und von Diestel et al. (2007) lassen jedoch vermuten, dass eine Phosphorylierung am T803 (und evtl. weiteren Serin- oder Threoninresten) und/oder die Ubiquitinierung von NCAM, ähnlich wie bei apCAM, an der Endocytose von NCAM beteiligt sind.

Dass noch weitere oder wenigstens eine weitere Aminosäure von NCAM sogar ohne Induktion der Endocytose phosphoryliert sind bzw. ist, zeigt der Versuch der Phosphoprotein-Färbung mit Pro-Q DiamondTM (s. Kapitel 3.2.2.), da hier selbst die NCAM140-T803A- und

NCAM140-T803D-transfizierten Zellen deutlich sichtbare NCAM-Banden aufweisen. Allerdings muss in diesem Fall erwähnt werden, dass bei diesen Versuchen die MAP-Kinase erk2 überexprimiert wurde, was evtl. zu einer (verstärkten) Phosphorylierung auch anderer Serin-/Threoninreste von NCAM geführt haben könnte. Da also im Falle einer tatsächlichen Phosphorylierung des T803 in jedem Fall auch noch weitere Serin- und/oder Threoninreste phosphoryliert sind, sind möglicherweise Unterschiede im Phosphorylierungsgrad zwischen NCAM140-WT und den Mutanten mit den beiden in Kapitel 3.2. beschriebenen Methoden nicht eindeutig nachweisbar. Dass NCAM140 und auch NCAM180 *in vivo* sowie *in vitro* phosphoryliert werden können, wurde bereits 1984 von Sorkin et al. und 1989 von Mackie et al. gezeigt (s. auch Kapitel 1.1.1.). Allerdings konnte vor allem bei den NCAM140-WT-Banden, aber auch bei den NCAM140-T803A-/T803D-Banden nach Pro-Q DiamondTM-Färbung eine geringfügig stärkere Gesamtphosphorylierung nach der Induktion der Endocytose beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass das „Clustern“ von NCAM an der Zellmembran und die dadurch ausgelösten Signalkaskaden zu einer verstärkten Phosphorylierung von NCAM, unabhängig von der Überexpression von erk2, führen könnten. Anders als bei anderen Transmembranproteinen wie dem EGF-Rezeptor, bei dem „Clustern“ zu einer Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase-Aktivität des Rezeptors selbst führt (Sun et al., 2008), muss die Phosphorylierung von NCAM von einer oder mehreren anderen Kinasen durchgeführt werden, da NCAM über keine Kinase-Aktivität verfügt.

Die in Kapitel 3.2.1. beschriebene Methode des Nachweises von freiem Phosphat mit Biomol GreenTM wurde von Matthias und Horstkorte (2006) angewendet, um ebenfalls die Phosphorylierung von NCAM nachzuweisen. Allerdings wurde hier Gesamt-NCAM140 und -NCAM180 in PC12-Zellen untersucht, und nur bei auf Kollagen IV adhärierenden Zellen war mit dieser Methode nach „nerve growth factor“- (NGF-) Inkubation eine Phosphorylierung von NCAM zu detektieren. Ohne NGF war kein freies Phosphat nach 30-minütiger Phosphatase-Behandlung nachweisbar, was unter Berücksichtigung der zuvor genannten Studien von Sorkin et al. (1984) und Mackie et al. (1989) sowie der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse darauf hinweist, dass dieser Nachweis nicht sensitiv genug ist, um eventuelle Unterschiede im Phosphorylierungsgrad von NCAM140-WT und den beiden Mutanten sichtbar zu machen, da auch ohne NGF zumindest eine leichte NCAM-Phosphorylierung nachweisbar sein müsste.

Die NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen zeigen gegenüber den NCAM140-WT-exprimierenden Zellen außer der erhöhten Anzahl an NCAM-haltigen intrazellulären Vesikeln signifikant kürzere Neuriten nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP auf Monolayern von

NCAM-transfizierten COS-7- oder L-Zellen, welche kein endogenes NCAM exprimieren. Die Simulierung einer Dauerphosphorylierung des T803 führt also dazu, dass das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum in stabil mit dieser mutierten cDNA transfizierten B35-Zellen gehemmt wird.

In Kapitel 3.1.2. ist gezeigt, dass die durchschnittliche Neuritenlänge von NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen dem der NCAM140-WT-exprimierenden Zellen vergleichbar ist, die mit dem MEK-Inhibitor U0126 behandelt wurden. Während dieser Inhibitor wie erwartet beim Wildtyp zu einer signifikanten Reduzierung des Neuritenwachstums führt, konnte bei der Mutante jedoch kein weiter reduziertes Wachstum festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine MAP-Kinase-abhängige Phosphorylierung des T803 das Neuritenwachstum negativ beeinflusst. Die homophile NCAM-NCAM-trans-Interaktion (durch den Kontakt zu den NCAM-exprimierenden COS-7- oder L-Zellen) führt aber bekanntermaßen zu einer MAP-Kinase-abhängigen Steigerung des Neuritenwachstums, was auch dadurch in dieser Arbeit bestätigt wird, dass das Neuritenwachstum der NCAM140-WT-exprimierenden Zellen in Gegenwart des MEK-Inhibitors U0126 ebenfalls reduziert wird (Signaltransduktionswege s. Kapitel 1.1.4.). Dieser Widerspruch ließe sich z. B. damit erklären, dass MAP-Kinase-Aktivierung mehrere Mechanismen in Gang setzt, von denen einer oder mehrere Neuritenwachstums-stimulierend ist/sind, während die Phosphorylierung des T803 von NCAM eine regulierende „feedback“-Hemmwirkung besitzt. Bei den NCAM140-WT-exprimierenden Zellen wird vermutlich nur ein kleiner Teil der NCAM-Moleküle direkt oder indirekt durch die MAP-Kinase phosphoryliert, so dass sich deren potentiell hemmende Wirkung wegen der dominanteren MAP-Kinase-abhängigen und durch CREB und c-Fos sowie PKA gesteuerten verstärkten stimulierenden Effekte nicht auswirken kann. Durch die simulierte Phosphorylierung des T803 aller NCAM-Moleküle der NCAM140-T803D-exprimierenden Zellen könnte hingegen deren hemmender Effekt über die verschiedenen stimulierenden Mechanismen dominieren. Für diese Theorie sprechen auch die Ergebnisse mit den NCAM140-T803A-exprimierenden Zellen, bei denen das T803 gar nicht phosphoryliert werden kann und die sowohl auf COS140- als auch auf L140-Zellen nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP noch längere Neuriten als die NCAM140-WT-transfizierten Zellen aufweisen, da hier die mögliche hemmende Wirkung auf das Neuritenwachstum durch Phosphorylierung des T803 nicht stattfinden kann.

Gleichzeitig wird die Endocytose durch die Phosphorylierung von T803 beschleunigt. Das heißt, erhöhte Endocytose der NCAM140-T803D-Mutante korreliert (im Gegensatz zu L1) mit reduziertem Neuritenwachstum. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das

phosphorylierte NCAM lysosomal oder nach Ubiquitinierung proteasomal abgebaut statt rezykliert wird. Rezyklisierung würde vermutlich - wenn das für L1 gezeigte Modell der Neuritenwachstums-stimulierenden Effekte durch Endocytose und Rezyklisierung auch auf NCAM übertragen werden könnte - Neuritenwachstum beschleunigen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob Rezyklisierung oder Abbau für die NCAM140-T803D-Mutante beschleunigt oder verlangsamt im Vergleich zu NCAM140-WT abläuft.

Eine andere mögliche Erklärung für die Ergebnisse der NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen wäre, dass die simulierte dauerhafte Phosphorylierung von T803 im Vergleich mit einer transienten Phosphorylierung zwar die Endocytose verstärkt, jedoch gleichzeitig zu einer „downstream“-Desensibilisierung von für das Neuritenwachstum benötigten MAP-Kinase-Signalen führt. Dass transiente und dauerhafte Phosphorylierungen durch Kinasen, und speziell durch die MAP-Kinase, zu unterschiedlichen Effekten führen kann, konnte bereits gezeigt werden (Marshall, 1995; Walmod et al., 2004). Ein ähnlicher selbst-inaktivierender Mechanismus der MAP-Kinase-Signale wurde für β -Arrestin beschrieben, welches von der MAP-Kinase phosphoryliert wird, im phosphorylierten Zustand jedoch eine niedrigere Affinität zu der Tyrosinkinase src aufweist und auf diese Weise G-Protein-induzierte MAP-Kinase-Signale inhibiert (Hupfeld et al., 2005).

Die Beobachtung, dass die NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf einem Monolayer von L-Zellen nicht signifikant mehr NCAM-haltige Endocytose-Vesikel aufweisen als NCAM140-WT-exprimierende Zellen, steht mit keiner der vorgeschlagenen Erklärungen im Einklang. Es scheint keine weiteren Untersuchungen zur Endocytose in Zellkulturen nach Ausplattieren auf einem Monolayer anderer Zellen zu geben, aber es ist denkbar, dass in einem solchen System andere Mechanismen an der Endocytose von NCAM beteiligt sind, welche die unterschiedlichen Ergebnisse der NCAM140-T803D-transfizierten Zellen auf PLL und einem Monolayer von L-Zellen erklären.

Die Timelapse-Migrationsuntersuchungen der stabil mit NCAM140-WT-, NCAM140-T803A- und NCAM140-T803D-transfizierten B35-Zellen ergaben auf PLL keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Zelllinien. Es war zu erkennen, dass sowohl parentale als auch mit den verschiedenen NCAM140-cDNAs transfizierten B35-Zellen auf einem NCAM-inerten Substrat wie PLL kaum Migration zeigten. Bei allen untersuchten Zelllinien waren lediglich leicht zuckende Bewegungen der Zellkerne sichtbar und nur selten konnten Zellen (bzw. Zellkerne) beobachtet werden, die innerhalb von 30 Minuten deutlich ihre Position veränderten. Einzig die NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen

zeigten ein stärkeres Migrationsverhalten auf PLL, welches sogar auf dem Niveau der auf einem Monolayer von COS-7-Zellen untersuchten Zellen lag.

Auf COS-7- und NCAM140-transfizierten COS140-Zellen konnte hingegen bei allen untersuchten Zelllinien (Ausnahme: NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-transfizierte Zellen) eine signifikant stärkere Migration als auf PLL gemessen werden. Der Kontakt zu den COS-7-Zellen, egal ob untransfiziert oder NCAM140-exprimierend, löst demnach in den B35-Zellen verstärkt Signalwege aus, welche die in Kapitel 1.2. beschriebenen Mechanismen der Zellmigration aktivieren.

Die NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen zeigten auf COS-7- und COS140-Zellen eine leicht gesteigerte Migrationsgeschwindigkeit gegenüber den NCAM140-WT-exprimierenden Zellen, während die NCAM140-T803A-transfizierten Zellen signifikant langsamer migrierten als der Wildtyp. Die Unterschiede der jeweiligen Mittelwerte waren zwar teilweise hochsignifikant, jedoch quantitativ betrachtet nur gering. So migrierten die NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen auf COS140-Zellen nur ca. 24 Pixel/16 Stunden mehr als die NCAM140-T803A-transfizierten Zellen (160 \rightarrow 136, s. Abb. 3.26.). Bei den in den Abbildungen 3.25. bis 3.32. dargestellten Timelapse-Messungen ist zu erkennen, dass auch die Mittelwerte von mehrfach unabhängig durchgeführten Experimenten mit der selben Zelllinie schwanken können (z. B. NCAM140-WT auf COS-7-Zellen: 148 Pixel/16 h in Abb. 3.26. (viermal durchgeführt), 127 Pixel/16 h in Abb. 3.27. (dreimal durchgeführt)).

Dennoch ist aus den Ergebnissen die Tendenz zu erkennen, dass die Simulierung einer Dauerphosphorylierung des T803 von NCAM140 auf COS-7- und COS140-Zellen die Zellmigration verstärkt, während die Verhinderung einer möglichen Phosphorylierung durch den Austausch des Threonins gegen Alanin zu einem entgegengesetzten Effekt führt. Dies deutet also bzgl. des Migrationsverhaltens auf gegensätzliche Effekte dieser Mutanten im Vergleich zum Neuritenwachstum hin. Die NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen auf COS-7-/COS140-Zellen bilden kürzere Neuriten aus als die NCAM140-WT-transfizierten Zellen, migrieren aber schneller, während bei den NCAM140-T803A-transfizierten B35-Zellen das Gegenteil zu beobachten ist.

Da die B35-Zellen vor dem Ausplattieren zum Erhalt der Transmembranproteine nur mit EDTA von den Kulturschalen abgelöst werden und die Messung der Timelapse-Migration 24 Stunden nach dem Ausplattieren beginnt, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen zu Beginn der Messung bereits ihre Neuriten weitestgehend ausgebildet haben, welche NCAM sowie weitere endogene Adhäsionsmoleküle der B35-Zellen exprimieren. Allerdings wurden die Zellen für diese Versuche nicht wie bei den Neuritenwachstumsversuchen mit

dbcAMP ausdifferenziert. Die Effekte der T803A- bzw. T803D-Mutanten auf das Neuritenwachstum waren jedoch auch bei den nicht ausdifferenzierten B35-Zellen gleichermaßen sichtbar. Da NCAM in den transfizierten B35-Zellen ebenso wie *in vivo* in Neuronen auch in der Plasmamembran der Neuriten exprimiert wird, ist es denkbar, dass aufgrund der längeren Neuriten der NCAM140-T803A-exprimierenden B35-Zellen auf diesen auch mehr NCAM exprimiert wird, mit denen die Zellen an homophilen (nur COS140) oder heterophilen Bindungspartnern des Monolayers adhären und so die Migration hemmen können. Die NCAM140-T803D-exprimierenden B35-Zellen hingegen könnten aufgrund ihrer kürzeren Ausläufer weniger adhären und dadurch schneller als die NCAM140-WT-exprimierenden Zellen migrieren. Es ist aber nicht auszuschließen, dass weitere, durch die Mutationen ausgelöste Unterschiede in Signalkaskaden zu diesen Effekten beitragen.

4.2. Migration und Neuritenwachstum der NCAM140/180-WT- und NCAM140/180-Y734F-exprimierenden B35-Zellen

Die Transfektion von B35-Zellen mit NCAM140-WT hat keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum dieser Zellen auf PLL, wie ein Vergleich von NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen und parentalen B35-Zellen zeigte (Laurini, unveröffentlichte Ergebnisse). Und auch bzgl. der Migration auf PLL konnte kein Unterschied zwischen parentalen B35-Zellen und NCAM140-WT-transfizierten B35-Zellen festgestellt werden.

Auf COS-7- und COS140-Zellen als Substrat ist sowohl die Zellmigration von NCAM140-WT-exprimierenden Zellen als auch das Neuritenwachstum im Vergleich zu diesen Prozessen auf PLL beschleunigt, wobei nur für das Neuritenwachstum, nicht aber für die Migration die homophile NCAM-NCAM-trans-Interaktion (durch Aktivierung FGFR-abhängiger Signalmechanismen, s. Einleitung) stimulierend wirkt. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Neuritenwachstum und Migration zumindest teilweise verschiedenen Mechanismen zugrunde liegen.

Die NCAM140-Y734F-exprimierenden B35-Zellen zeigen kaum Unterschiede in der Migration auf PLL, COS-7- und COS140-Zellen im Vergleich zu NCAM140-WT-exprimierenden Zellen. Diese Aussage gilt auch für das Neuritenwachstum dieser Mutante (Diestel, unveröffentlichte Ergebnisse), so dass insgesamt gesagt werden kann, dass das Y734 von NCAM140 allenfalls eine geringe Rolle für diese Prozesse zu spielen scheint.

Der Vergleich zwischen den NCAM140-WT- und den NCAM180-WT-exprimierenden B35-Zellen zeigt sowohl auf PLL als auch auf COS-7- und COS140-Zellen eine schnellere Migration der NCAM180-WT-transfizierten Zellen. Allerdings sind diese Unterschiede wie

schon die in Kapitel 4.1. diskutierten Werte der Timelapse-Experimente auf PLL und COS140-Zellen relativ gering, aber dennoch signifikant. Da die Mittelwerte dieser Messungen jedoch aus insgesamt sieben (PLL) bzw. fünf (COS-7/COS140) unabhängig durchgeführten Experimenten resultieren, kann hier zumindest bei den hochsignifikant unterschiedlichen Ergebnissen von einer deutlichen Tendenz gesprochen werden. Hinzu kommt, dass bei zu einem späteren Zeitpunkt erneut durchgeführten Messungen auf PLL (s. Abb. 3.32b.) und COS140 (s. Abb. 3.31b.) die Ergebnisse verifiziert werden konnten.

Dass NCAM180-WT-exprimierende Zellen schneller auf PLL sowie auf COS-7- und vor allem COS140-Substraten als NCAM140-WT-exprimierende Zellen migrieren, weist darauf hin, dass NCAM180 für Migration von größerer Bedeutung sein könnte als NCAM140. Dies wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die durch den RMS wandernden neuronalen Precursorzellen hauptsächlich NCAM180 exprimieren (Tomasiewicz et al., 1993). Für die Migration im RMS ist außerdem von Bedeutung, dass PSA-Seitenketten vermutlich durch das Verhindern homophiler NCAM-NCAM-Interaktionen die Migration der Zellen beschleunigen (Reviews s. Gascon et al., 2007; 2008). Ein Einfluss von PSA auf das Migrationsverhalten bei den hier beschriebenen Versuchen an B35-Zellen ist nicht möglich, da diese Zellen keine der beiden PSA-Transferasen exprimieren.

Es konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass NCAM180-WT-transfizierte B35-Zellen kürzere Neuriten ausbilden als NCAM140-WT-transfizierte Zellen. Die hemmende Wirkung der cytoplasmatischen Domäne von NCAM180 auf das Neuritenwachstum wurde in Untersuchungen von Büttner et al. (2004) an PC12-Zellen gezeigt und darauf zurückgeführt, dass NCAM180 verstärkt stabilisierende Cytoskelett-Interaktionen eingehen kann. Ob und welche NCAM180-spezifischen Cytoskelett-Interaktionen/Signalmechanismen für die schnellere Migration der Zellen eine Rolle spielen, wurde nicht untersucht. Es ist denkbar, dass die Migration auch aufgrund von quantitativ geringerer homo- und heterophiler Adhäsion der kürzeren Ausläufer der NCAM180-WT-exprimierenden Zellen beschleunigt abläuft (s. Kapitel 4.1.).

Die Y734F-Mutation von NCAM180-WT wirkt sich bei der Migration auf PLL, COS-7- und COS140-Zellen stärker aus als die von NCAM140-WT. Auf allen drei Substraten zeigt sich ein signifikant hemmender Einfluss dieser Mutation auf die Zellmigration. Das Neuritenwachstum dieser Mutante weist auf allen drei Substraten (ohne Ausdifferenzierung mit dbcAMP) ein gegenüber NCAM180-WT-exprimierenden Zellen gesteigertes Neuritenwachstum auf (Diestel et al., 2004). Die Autoren leiteten aus ihren Beobachtungen die Hypothese ab, dass NCAM180 in Tyrosin-phosphorylierter Form möglicherweise

stabilisierend auf Zell-Zell-Kontakte aufgrund von Interaktionen mit dem Cytoskelett wirkt, so dass das Neuritenwachstum im Vergleich zu dem der Zellen, welche die nicht phosphorylierbare Y734F-Mutante exprimieren, gehemmt ist. Weiterhin ist denkbar, dass die von Diestel et al. festgestellte erhöhte FGF-Rezeptor- und MAP-Kinase-Aktivität bei NCAM180-Y734F-transfizierten B35-Zellen zu einer Aktivierung der Myosin Light Chain-Kinase (MLCK) führt, wodurch wiederum der Aktin-Rückwärtsfluss verstärkt und die Migration gehemmt werden könnte. Dass die MAP-Kinase die MLCK aktivieren kann, konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Klemke et al., 1997; Huang et al., 2004; Hong und Grabel, 2006). Außerdem könnte auch in diesem Fall für die geringere Migration - neben veränderten Cytoskelett/Signalmolekül-Interaktionen - die verstärkte Adhäsion durch längere Neuriten eine Rolle spielen.

Da bekannt ist, dass die Extrazellulärmatrix für Neuritenwachstum und Migration von Neuronen eine erhebliche Rolle vor allem während der Entwicklung spielt, wurden diese Vorgänge ebenfalls vergleichend für NCAM140-WT und NCAM180-WT sowie den ENESKA-Deletionsmutanten auf Laminin als eine der wichtigsten Komponenten der ECM analysiert. Die Ergebnisse dieser Versuche werden in Kapitel 4.4. diskutiert.

4.3. „Shedding“ von NCAM140/180-eGFP

Das „Shedding“ von Transmembranproteinen wie z. B. Rezeptoren oder Zelladhäsionsmolekülen stellt neben der Endocytose eine weitere Möglichkeit dar, mögliche Interaktionen dieser Moleküle mit extrazellulären Bindungspartnern zu beenden bzw. zu verhindern. Oberflächenrezeptor-„Shedding“ kann durch verschiedene intrazelluläre Signalmechanismen induziert werden (Review s. Arribas und Borroto, 2002; Blobel, 2005).

Die enzymatische Abspaltung der extrazellulären Domäne von NCAM140 und NCAM180 findet konstitutiv statt, lässt sich aber durch den Tyrosinphosphatase-Inhibitor Pervanadat deutlich steigern, was bedeutet, dass Tyrosinphosphorylierung direkt oder indirekt bei diesem Vorgang eine Rolle spielt (s. Abb. 3.21.; Diestel et al., 2005; Hinkle et al., 2006). Andere Moleküle wie L1 (Gutwein et al., 2000), Betaglycan (Velasco-Loyden et al., 2004) oder der Transferrin-Rezeptor (Kaup et al., 2002) können ebenfalls Pervanadat-induziert „gesheddet“ werden. Auch in der menschlichen Gehirnflüssigkeit konnte ein lösliches, ca. 115 kDa großes NCAM-Fragment identifiziert werden, das die komplette extrazelluläre Domäne von NCAM enthält und welches bei Patienten mit Schizophrenie in deutlich erhöhter Konzentration vorliegt (van Kammen et al., 1998; Vawter, 2000). Dieses lösliche NCAM-Fragment kann möglicherweise entweder durch PLC-abhängige Freisetzung von NCAM120 aus der

Plasmamembran, durch alternatives Spleißen oder reguliertes proteolytisches Spalten („Shedding“) der extrazellulären Domäne von NCAM entstehen (Nybroe et al., 1989; Vawter et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche die Konsequenzen von Pervanadat-induziertem „Shedding“ von NCAM sind. Es wurde postuliert, dass das in der Membran verbleibende transmembrane/intrazelluläre Fragment von NCAM endocytiert werden könnte und dieser Prozess dann analog zu AK-induzierter Endocytose durch den Metalloprotease-Inhibitor GM6001 sowie den MEK-Inhibitor U0126 moduliert werden könnte. Zu diesem Zweck wurden B35-Zellen mit NCAM-eGFP-Konstrukten transient transfiziert, die daraufhin am C-Terminus mit eGFP modifiziertes NCAM140 bzw. NCAM180 exprimierten.

Mit Fluoreszenz- und konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Pervanadat-Behandlung bei NCAM140-eGFP- und NCAM180-eGFP-transfizierten B35-Zellen zu einem hochsignifikanten Anstieg an NCAM-haltigen intrazellulären Vesikeln im Vergleich zu Kontrollzellen führt. Aufgrund der eGFP-Modifizierung am C-Terminus von NCAM konnte nicht unterschieden werden, ob sich in den durch das eGFP grün fluoreszierenden Vesikeln lediglich der „gesheddete“ cytoplasmatische Bereich inklusive Transmembrandomäne oder vollständiges NCAM140 bzw. NCAM180 befindet. Durch die Markierung des in den Vesikeln enthaltenden NCAMs nach Permeabilisierung mit einem AK, der die extrazelluläre Domäne von NCAM erkennt (123C3-AK), und einem Cy3-markierten Zweit-AK, konnte gezeigt werden, dass sich in den Vesikeln zumindest zum Teil auch nicht „gesheddetes“ NCAM befindet. Lediglich in sehr wenigen Zellen wurden mittels Konfokal-Mikroskopie vereinzelte Vesikel gefunden, die kein 123C3-AK-Cy3-AK-markiertes, d. h. intaktes, NCAM aufwies, sondern nur durch eGFP grün fluoreszierten, also nur das Fragment mit intrazellulärer und Transmembrandomäne enthielten. Obwohl weder die Bindungsstelle des 123C3-AK noch die Position, an der (vermutlich) eine Disintegrin Metalloprotease NCAM spaltet (Hinkle et al., 2006) mit Sicherheit bekannt sind, sich aber beide Positionen extrazellulär in der Nähe der Transmembrandomäne befinden, ist sicher, dass der 123C3-AK in N-terminaler Richtung der Spaltstelle bindet, da er, wie in Abb. 3.21. zu sehen ist, das „gesheddete“ NCAM-Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 115 kDa im Medienüberstand erkennt. Es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich in der Mehrzahl der Vesikel ausschließlich vollständiges NCAM140 bzw. NCAM180 befindet oder auch das ca. 30 kDa (NCAM140) oder ca. 70 kDa (NCAM180) große cytoplasmatische Fragment oder eventuell auch nur das eGFP, welches nach Internalisierung enzymatisch von NCAM getrennt wurde, befindet. Da allerdings Diestel et al. (2005) in Zellysaten von

NCAM140-transfizierten B35-Zellen und Hinkle et al. (2006) in NCAM140-transfizierten L-Fibroblasten und kortikalen Neuronen nach Pervanadat-Behandlung die cytosolischen Fragmente von NCAM140/180 nachweisen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass sich in den Vesikeln neben dem kompletten NCAM auch „gesheddete“ transmembrane/intrazelluläre Fragmente befinden. In B35-Zellen und kortikalen Neuronen konnte auch ohne Pervanadat-Behandlung ein 30 kDa-Fragment von NCAM140 identifiziert werden, allerdings in deutlich niedrigerer Konzentration (Diestel et al., 2005). Wie an den in Abb. 3.20. gezeigten Ergebnissen zu erkennen ist, konnte jedoch in dieser Arbeit weder für NCAM140 noch für NCAM180 mit oder ohne Pervanadat-Behandlung ein „gesheddetes“ Fragment in den Zellysaten identifiziert werden. Da auch nach Pervanadat-Behandlung keine mikroskopischen Unterschiede in der Fluoreszenz-Intensität des membranständigen NCAMs sichtbar sind, kann davon ausgegangen werden, dass nur ein sehr geringer Teil des in der Membran vorliegenden NCAMs „gesheddet“ wird, der im Western Blot nicht nachweisbar ist.

Im Vergleich zu den AK-induzierten Endocytose-Versuchen fällt auf, dass auch ohne Pervanadat-Behandlung relativ viele NCAM-eGFP-haltige Vesikel sichtbar sind, während ohne AK-Inkubation unter ansonsten nahezu identischen Bedingungen nur eine sehr geringe konstitutive Endocytose erkennbar ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das eGFP am C-Terminus von NCAM trotz seiner geringen Größe von ca. 26 kDa und seiner kompakten Struktur Einfluss auf das Schicksal von NCAM nimmt und z. B. durch sterische Behinderung die Interaktion mit cytosolischen Bindungspartnern verhindert oder mögliche Phosphorylierungsstellen für Kinasen/Phosphatasen unerreichbar macht, wodurch eine verstärkte konstitutive Internalisierung ausgelöst werden könnte. Diese Vermutung konnte insofern bestätigt werden, indem weder mit Hilfe der Fluoreszenz- noch der Konfokal-Mikroskopie für NCAM140-WT- (ohne eGFP) transfizierte B35-Zellen bei ansonsten identischer Versuchsdurchführung eine ähnlich starke konstitutive Bildung NCAM-haltiger Vesikel nachgewiesen werden konnte. Für den „epidermal growth factor receptor“ (EGF-Rezeptor) konnte hingegen gezeigt werden, dass die Fusion dieses Transmembranproteins mit GFP keinen Einfluss auf die normalen Funktionen wie Phosphorylierungen und Clathrin-abhängige Endocytose hat (Carter und Sorkin, 1998; Hayes et al., 2004). Dies scheint jedoch zumindest bzgl. der Endocytose von NCAM nicht zuzutreffen.

Auch die Möglichkeit, dass *de novo* translatierte NCAM-eGFP-Moleküle, die sich auf dem vesikulären Transportweg zur Plasmamembran befinden, für die eGFP-positiven Vesikel ohne

Pervanadat-Behandlung verantwortlich sind, konnte durch Experimente mit dem Translations-Inhibitor Cycloheximid ausgeschlossen werden.

Dass die mit dem Pervanadat-stimulierten und Metalloprotease-vermittelten „Shedding“ einhergehende Endocytose kein auf das eGFP zurückzuführender Artefakt ist, konnte durch Untersuchungen an B35-Zellen gezeigt werden, die mit nicht-eGFP-modifiziertem NCAM durchgeführt wurden. Dies bedeutet, dass trotz der vermutlich eGFP-bedingten konstitutiven Internalisierung von NCAM-eGFP der Anstieg der NCAM140- bzw. NCAM180-haltigen Vesikelzahl nach Pervanadat-Behandlung auf diese Behandlung und die durch sie ausgelöste MAP-Kinase-regulierte enzymatische Spaltung durch eine Metalloprotease zurückzuführen ist. Dies ist daran zu erkennen, dass die Anzahl der Vesikel nach Pervanadat-Behandlung und gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit dem Breitbandspektrum-Metalloprotease-Inhibitor GM6001 oder dem MEK-Inhibitor U0126 im Vergleich zu nur mit Pervanadat behandelten B35-Zellen signifikant zurückgeht. Lediglich nach GM6001-Behandlung NCAM180-eGFP-exprimierender B35-Zellen war dieser Rückgang aufgrund der hohen SEM-Werte nicht signifikant, von der Tendenz war jedoch ebenfalls ein deutlicher Rückgang der Vesikelzahl erkennbar. Hinkle et al. hatten 2006 bereits gezeigt, dass NCAM140 und NCAM180 Pervanadat-induziert durch eine Metalloprotease „gesheddet“ werden und diese proteolytische Spaltung die Aktivierung der MAP-Kinase erfordert. Hinkle et al. (2006) konnten weiterhin zeigen, dass die Inhibierung von NCAM-„Shedding“ in kortikalen Neuronen durch GM6001-Behandlung Neuritenwachstum stimuliert, während simuliertes exzessives „Shedding“ in Neuronen eines Mausmodells, welches ein lösliches NCAM-Fragment überexprimiert (nicht jedoch die nach „Shedding“ normalerweise in der Zellmembran verbleibende cytosolische/transmembrane Domäne), Neuritenwachstum gehemmt ist. Insofern ist denkbar, dass Metalloprotease-bedingtes „Shedding“ und die darauf folgende Internalisierung von NCAM zu einer Reduzierung des Oberflächen-lokalisierten NCAMs führt und somit zu geringe Adhäsionskräfte dafür verantwortlich sind, dass Neuriten nicht mehr adäquat auswachsen können. Andererseits könnten auch heterophile Wechselwirkungen des löslichen NCAMs im Gegensatz zur homophilen NCAM-NCAM-Interaktion wachstumshemmende Signalwege auslösen oder das transmembrane/intrazelluläre Fragment von NCAM könnte mit vollständigem NCAM um intrazelluläre Bindungspartner konkurrieren und auf diese Weise Signalwege inhibieren, was z. B. für NCAM140 und die Bindung zu p59^{fyn} und FAK gezeigt wurde (Büttner et al., 2004).

Ein möglicher Mechanismus für die Initiierung der Internalisierung von NCAM könnte durch die Bindung der „gesheddeten“ Fragmente an NCAM-Moleküle auf derselben oder

benachbarten Zellen (homophile NCAM-NCAM-Interaktion) ausgelöst werden, was auch erklären würde, warum vermutlich vollständige NCAM-Moleküle in den Vesikeln vorkommen. Das würde aber auch bedeuten, dass zusätzlich die extrazelluläre „gesheddete“ Domäne in den Vesikeln vorliegt, welche mit dem 123C3-AK nicht von vollständigen NCAM-Molekülen zu unterscheiden wäre. Prinzipiell ist auch nicht auszuschließen, dass die extrazelluläre Domäne von NCAM durch einen heterophilen Rezeptor gebunden und internalisiert wird. Bisher gibt es allerdings keinen Hinweis darauf, dass NCAM zusammen mit einem seiner bekannten heterophilen Bindungspartner internalisiert wird.

Eine mögliche Rezyklisierung der Vesikel nach Pervanadat-Behandlung wurde nicht untersucht. Denkbar ist aber, dass NCAM, wie schon in Kapitel 4.1. vorgeschlagen, zur Plasmamembran, auch in den Wachstumskegeln, zurücktransportiert wird. Wenn dieser Mechanismus, der für das Zelladhäsionsmolekül L1 genauer untersucht wurde, auch für NCAM zutrifft, könnte beschleunigte Endocytose und nachfolgend verstärkte Rezyklisierung in die Filopodien des Wachstumskegels die Vorwärtsbewegung desselben und damit das Neuritenwachstum beschleunigen (Kamiguchi, 2003).

Dieser Vorgang könnte weiterhin durch das „gesheddete“ extrazelluläre NCAM-Fragment unterstützt werden, da, wie in einer Reihe von Studien gezeigt wurde, lösliches NCAM Neuritenwachstum auf ECM-Substraten (Niethammer et al., 2002; Leshchyn'ska et al., 2003; Bodrikov et al., 2005) oder auf Monolayern von NIH-3T3-Zellen (Doherty et al., 1990) stimuliert, wodurch aufgrund von homophiler NCAM-NCAM-trans-Interaktion der in der Einleitung beschriebene FGFR-abhängige Signalweg aktiviert wird. Ob lösliches NCAM Neuritenwachstum hemmt oder stimuliert hängt möglicherweise von dem involvierten Signalweg - ausgelöst durch homo- oder heterophile Interaktion - und/oder der Konzentration des löslichen NCAMs ab.

Die konstitutive Endocytose (in Abwesenheit von Pervanadat) konnte nur bei NCAM140-eGFP-transfizierten B35-Zellen mit U0126 signifikant gehemmt werden. Bei U0126-behandelten NCAM180-eGFP-transfizierten Zellen sowie bei GM6001-behandelten NCAM140- und NCAM180-eGFP-transfizierten Zellen war kein Rückgang der konstitutiven Vesikelbildung erkennbar, d. h. dass die konstitutive Endocytose von NCAM140/180-eGFP durch einen anderen Prozess als durch Metalloprotease-vermitteltes „Shedding“ hervorgerufen wird und dass keine Aktivierung der MAP-Kinase für die konstitutive Endocytose (zumindest von NCAM180-eGFP) notwendig ist. Insgesamt lassen also auch die Kontrollen ohne Pervanadat-Behandlung, aber mit GM6001 oder U0126, vermuten, dass die stärkere konstitutive Vesikelbildung im Vergleich zu den Endocytose-Versuchen auf die

eGFP-Modifizierung zurückzuführen ist, da ansonsten auch bei den Kontrollen ohne Pervanadat-Behandlung ein Rückgang der Vesikelzahlen nach Inhibitor-Einsatz zu erwarten gewesen wäre.

Nur ein kleiner Teil der NCAM140/180-haltigen Vesikel co-lokalisiert mit Lysosomen, wie durch die Anfärbung der Lysosomen mit Lysotracker gezeigt werden konnte. Auffällig ist weiterhin, dass nach Pervanadat-Behandlung zwar die Anzahl der Vesikel steigt, nicht jedoch die Zahl der mit Lysosomen co-lokalisierten Vesikel. Dies bedeutet, dass die aufgrund der Pervanadat-Behandlung vermehrt aufgenommen NCAM-Moleküle bzw. -Fragmente anscheinend nicht lysosomal abgebaut werden. Auch Untersuchungen nach 20 und 60 Minuten zeigten keine verstärkte Co-Lokalisierung mit Lysosomen (Daten nicht gezeigt), so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass nach 40 Minuten bereits ein Teil des in Lysosomen transportierten NCAMs abgebaut wurde oder zu diesem Zeitpunkt noch nicht die Lysosomen erreicht hatte.

Es konnte außerdem nach Pervanadat-Behandlung kein NCAM140/180-eGFP im Zellkern identifiziert werden, wie aus der fehlenden Co-Lokalisation zwischen grün fluoreszierendem NCAM bzw. NCAM-Fragmenten und Hoechst-gefärbten Zellkernen abgeleitet werden kann (Daten nicht gezeigt). Ein derartiger Mechanismus ist für andere Transmembranproteine jedoch bekannt. Z. B. wird nach Stimulierung des „Sheddings“ der komplette Heparin-bindende EGF-like growth factor (HB-EGF) sowie das cytosolische Fragment inklusive Transmembrandomäne zur Kernmembran transportiert, wo die cytosolische Domäne mit Transkriptions-Repressoren interagiert (Hieda et al., 2008). Eine ähnliche direkte Interaktion von NCAM mit Transkriptionsfaktoren ist bislang jedoch nicht bekannt. Das intrazelluläre Schicksal der transmembranen/intrazellulären Domäne und auch des endocytierten vollständigen NCAMs muss durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

4.4. Untersuchungen zur Funktion des Hexapeptids ENESKA von NCAM140/180 auf „Shedding“, Endocytose, Neuritenwachstum und Zellmigration

Das Hexapeptid ENESKA befindet sich am C-terminalen Ende der beiden Transmembranformen von NCAM, NCAM140 und NCAM180, und ist bei vielen Spezies hoch konserviert. Da eine zunächst unentdeckte, ungewollte zusätzliche Mutation bei einem ersten Versuch, die NCAM140-T803A-Mutante herzustellen, zur Einführung eines Stoppcodons an Position -6 führte und die mit dieser cDNA transfizierten B35-Zellen auffällige Werte bzgl. Neuritenwachstum und Endocytose von NCAM aufwiesen (Quade, 2004), wurde die cDNA von NCAM140-WT erneut zielgerichtet so mutiert, dass nur die

letzten sechs C-terminalen Aminosäuren im fertig translatierten Protein fehlen (NCAM140- Δ ENESKA). Später wurde diese Mutation auch in NCAM180 eingefügt (NCAM180- Δ ENESKA) und B35-Zellen mit beiden mutierten cDNAs stabil transfiziert.

Zur gleichen Zeit als die Mutanten hergestellt wurden, publizierten Polo-Parada et al. (2005) eine Arbeit über NCAM180, in dem gezeigt wurde, dass die letzten sieben C-terminalen Aminosäuren (KENESKA) notwendig für die effektive Transmission von Signalen an neuromuskulären Synapsen während hochfrequenter repetitiver Stimulation sind. Auch bei NCAM180-negativen Mäusen wurde gezeigt, dass dieser Prozess erheblich gestört ist (Polo-Parada, 2004). Für die effektive Transmission von Signalen durch die Freisetzung synaptischer Vesikel an der Präsynapse wurde darüber hinaus von den Autoren ein Signalweg identifiziert, an dem die MLCK entscheidend beteiligt ist. Außerdem scheint die Phosphorylierung des Serinrestes innerhalb der KENESKA-Domäne durch eine noch unbekannte Kinase eine wichtige Rolle zu spielen. Mit Hilfe des Computerprogramms PepTool wurde allerdings festgestellt, dass der Serinrest innerhalb einer Konsensussequenz für die Casein Kinase 1 liegt. Bereits 1989 fanden Mackie et al. heraus, dass diese Kinase die beiden Transmembranformen von Hühner-NCAM phosphorylieren kann. Jedoch ist bis heute nicht bekannt, welche Aminosäure(n) tatsächlich von diesem Enzym modifiziert wird (werden).

Ob die ENESKA-Domäne von NCAM140 und/oder NCAM180 darüber hinaus notwendig für die Stabilität von z. B. synaptischen oder anderen Zell-Zell-Kontakten sein könnte, ist nicht untersucht worden. Wie bereits erwähnt, spielt die schnelle Entfernung von Adhäsionsmolekülen wie NCAM bei mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Verbindung gebrachter synaptischer Plastizität eine wichtige Rolle. „Shedding“ und Endocytose stellen Möglichkeiten dar, ein Molekül auf ein Signal hin rapide von der Zelloberfläche zu entfernen und somit z. B. das Lösen eines synaptischen Kontaktes zu ermöglichen. Da besonders NCAM180 innerhalb der postsynaptischen Membran lokalisiert ist und diese Lokalisierung durch Interaktionen mit dem Cytoskelett (z. B. Spektrin; s. auch Kapitel 1.1.2. und 1.1.3.) stabilisiert wird, war denkbar, dass die ENESKA-Domäne durch Interaktionen mit einem unbekanntem Bindungspartner für die Lokalisierung von NCAM180 in der „postsynaptic density“ wichtig sein könnte. Für die Vermutung, dass die ENESKA-Domäne speziell von NCAM180 eine Rolle bei der Lokalisation in der „postsynaptic density“ spielt, spricht, dass die letzten vier Aminosäuren ein Klasse I PDZ-Bindemotiv darstellen (s. Kapitel 1.1.1.) und es bekannt ist, dass in diesem Bereich PDZ-Domänen-enthaltende Gerüst-Proteine vorhanden sind, die in vielfältiger Weise an der Organisation von Signalkomplexen, dem „Clustern“ von

Oberflächenrezeptoren oder der Koordination cytoskelettaler Bewegungen beteiligt sind (Review s. Feng und Zhang, 2009). Um zu untersuchen, ob die ENESKA-Sequenz für die Stabilisierung von NCAM in der Plasmamembran eine Rolle spielt, wurde sowohl „Shedding“ der NCAM140- und NCAM180-Mutanten als auch Endocytose der NCAM140-Mutante untersucht. Außerdem sollten die „Shedding“-Experimente mit den stabil transfizierten B35-Zellen Erkenntnisse darüber liefern, ob das Fehlen der ENESKA-Domäne Einfluss auf das Pervanadat-induzierte Abspalten der extrazellulären Domäne von NCAM140 bzw. NCAM180 hat.

Nach Pervanadat-Behandlung konnte im Western Blot der Zelllysate und Medienüberstände jedoch keine Veränderung des „Sheddings“ festgestellt werden. NCAM140/180- Δ ENESKA- und NCAM140/180-WT-transfizierte B35-Zellen zeigten einen ähnlich deutlichen Anstieg des extrazellulären Fragments in den Medienüberständen nach Pervanadat-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. In den Lysaten hingegen waren keine Unterschiede zu den Kontrollversuchen sichtbar, was darauf hindeutet, dass sowohl beim Wildtyp als auch den Mutanten nur ein kleiner Teil der vorhandenen NCAM-Moleküle „geshededet“ wird, so dass dieser Unterschied im Western Blot der Zelllysate nicht erkennbar ist. Wie bereits in Kapitel 4.3. erwähnt und in Abb. 3.20. gezeigt, konnten in den Lysaten keine Banden bei 30 kDa bzw. 70 kDa identifiziert werden, was ebenfalls darauf hindeutet, dass nur ein sehr kleiner Anteil der vorhandenen Moleküle nach Pervanadat-Behandlung enzymatisch gespalten wird. Da aber in den Medien deutliche Unterschiede sichtbar wurden und das Pervanadat somit das „Shedding“ sowohl von NCAM140/180-WT als auch von NCAM140/180- Δ ENESKA verstärkt, ist auch denkbar, dass das intrazelluläre Fragment bereits abgebaut wurde, auch wenn dies, wie in Kapitel 4.3. beschrieben, anscheinend nicht lysosomal geschieht.

Auch Untersuchungen der Endocytose konnten keinen Einfluss der ENESKA-Domäne auf die AK-induzierte Internalisierung von NCAM140 zeigen. Da Endocytose von NCAM140 und NCAM180 sowie nachfolgende Vorgänge wie Rezyklisierung sehr ähnlich verlaufen, ist nicht anzunehmen, dass die Endocytose von NCAM180 anders als von NCAM140 durch die ENESKA-Deletion beeinflusst wird.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass dieses C-terminale Hexapeptid unter den hier angewendeten Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Stabilisierung der Plasmamembranlokalisation von NCAM hat. Es ist aber nicht auszuschließen, dass entsprechende PDZ-bindende Proteine in B35-Zellen nicht vorkommen; entsprechende Untersuchungen zu deren Nachweis wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Lediglich wurde in Zusammenarbeit mit R. Horstkorte untersucht, ob das Fehlen der ENESKA-Domäne Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des „leucine-rich acidic nuclear protein“ LANP (auch pp32 genannt) an NCAM140 hat, da Büttner et al. (2005) dieses Protein - welches allerdings keine PDZ-Domäne enthält - als direkten Bindungspartner von NCAM140 und -180 mit Hilfe von MALDI-Massenspektrometrie identifizieren konnten und die Bindungsstelle für LANP innerhalb der letzten 39 C-terminalen Aminosäuren von NCAM liegt. Leider waren die Ergebnisse dieser Co-Immunpräzipitationen widersprüchlich und konnten keine eindeutige Antwort liefern (Daten nicht gezeigt).

Obwohl auch mittels Immunfluoreszenz-Analyse festgestellt werden konnte, dass in den transfizierten B35-Zellen das überexprimierte NCAM in der gesamten Membran sowohl des Zellkörpers als auch der Neuriten vorhanden ist und mikroskopisch keine verstärkte Lokalisierung von NCAM, weder des Wildtyps noch der Δ ENESKA-Mutante, an Zell-Zell-Kontakten sichtbar ist, wäre dennoch denkbar, dass *in vivo* die ENESKA-Domäne wichtig für die Lokalisierung von NCAM180 und NCAM140 in bestimmten Membranbereichen ist.

Mit den stabil mit NCAM140/180- Δ ENESKA transfizierten B35-Zellen wurden ebenfalls Neuritenmessungen durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der NCAM140/180-WT-transfizierten Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Deletion der letzten sechs C-terminalen Aminosäuren keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum auf PLL hat. Lediglich bzgl. der Neuritenanzahl nach Ausdifferenzierung mit dbcAMP zeigten die NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen einen geringfügig höheren Wert im Vergleich zu den NCAM180-exprimierenden Zellen (s. Abb. 3.11b.: 3,0 \rightarrow 2,5). Aufgrund dieses geringen Unterschiedes ist trotz der errechneten Signifikanz vermutlich aber nicht davon auszugehen, dass dieser tatsächlich durch die Mutation hervorgerufen wurde. Kolkova et al. (2000) hatten außerdem bereits experimentell nachweisen können, dass sogar das Fehlen der letzten 15 Aminosäuren vom C-terminalen Ende von NCAM140 keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum hat.

Auch diese Ergebnisse mit den NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen sprechen gegen eine Beteiligung der ENESKA-Domäne an der Bindung zu LANP, da gezeigt werden konnte, dass LANP am Neuritenwachstum beteiligt ist. Während der Neuritogenese wird es aus dem Zellkern in das Cytoplasma überführt und hemmt dort die Bindungsrate des „microtubule-associated protein 1B“ (MAP1B) an Mikrotubuli und erleichtert dadurch vermutlich das Neuritenwachstum (Opal et al., 2003). Büttner et al. (2005) vermuteten außerdem, dass LANP ein neues Signalmolekül in einem NCAM-abhängigen Signalweg sein

könnte oder als Linker-Protein zwischen NCAM180 und MAP1A, welches ebenfalls als Bindungspartner von NCAM180 identifiziert wurde (Büttner et al., 2003), fungieren könnte. Daher wäre es sehr wahrscheinlich, dass es durch eine Verhinderung der Interaktion von NCAM180 und/oder NCAM140 mit LANP aufgrund des Fehlens der ENESKA-Domäne zu Unterschieden in den Neuritenlängen zwischen den NCAM140/180-WT- und den NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen gekommen wäre.

Auch die an den mit der Doppelmutante NCAM140-T803A/ Δ ENESKA transfizierten B35-Zellen durchgeführten Neuritenmessungen zeigen keinen Einfluss der ENESKA-Deletion auf das Neuritenwachstum. Diese Versuche bestätigten die Ergebnisse von R. Quade (2004) und machen gleichzeitig deutlich, dass lediglich der Austausch T803A das Neuritenwachstum beeinflusst.

Interessanter sind die Untersuchungen der Endocytose von NCAM140-T803A/ Δ ENESKA, da die NCAM140-T803A/ Δ ENESKA-transfizierten Zellen hochsignifikant weniger Vesikel nach AK-, „Clustern“ aufwiesen als die NCAM140-WT-transfizierten Zellen. Dieses Ergebnis unterscheidet sich deutlich von dem der NCAM140-T803A-transfizierten Zellen, bei denen allenfalls ein schwachsignifikanter Unterschied bzgl. der Vesikelanzahl im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden konnte. Somit scheint bei dieser Mutante die Kombination der beiden Mutationen für die drastischen Effekte nach AK-induzierter Endocytose verantwortlich zu sein, da die Mutationen einzeln keinen oder nur einen schwachen Einfluss auf die Endocytose von NCAM haben. Damit bestätigt sich die Vermutung früherer Arbeiten (Quade, 2004; Kominek, 2005), dass die Funktion von T803 möglicherweise aufgrund einer speziellen 3D-Struktur der cytosolischen Domäne oder über Interaktionspartner durch das C-terminale Hexapeptid beeinflusst werden könnte.

Eine Bedeutung der ENESKA-Deletion von NCAM140 und vor allem von NCAM180 konnte für die Zellmigration auf Laminin als Substrat beobachtet werden, da im Vergleich zu den NCAM140/180-WT-exprimierenden B35-Zellen die NCAM140/180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen auf diesem ECM-Bestandteil signifikant schneller wanderten.

Der gleiche Effekt konnte auch mit transient mit NCAM140-WT und NCAM140- Δ ENESKA transfizierten HEK-Zellen auf Laminin festgestellt werden (Salomon, 2009). Die HEK-Zellen wurden in dieser Arbeit verwendet, da sich die B35-Zellen vor allem auf PLL aufgrund ihrer insgesamt geringen Migrationsstärke als nur bedingt geeignet für Migrationsuntersuchungen erwiesen hatten, obwohl der Einsatz von B35-Zellen für Timelapse-Untersuchungen auch bereits in der Literatur beschrieben wurde (Dai et al., 2005). Die Kontrollversuche mit

transient transfizierten HEK-Zellen auf PLL zeigten wie die Versuche mit stabil transfizierten B35-Zellen keine hochsignifikanten Unterschiede zwischen NCAM140-WT- und NCAM140- Δ ENESKA-transfizierten Zellen. Wie erwartet lagen sowohl auf PLL als auch auf Laminin die absoluten Werte der HEK-Zellmigration deutlich über denen der B35-Zellen.

Von Salomon (2009) wurden in derselben Arbeit zunächst Neuritenmessungen von nicht ausdifferenzierten B35-Zellen auf Laminin als Substrat 5 und 24 Stunden nach dem Ausplattieren durchgeführt, und zwar mit NCAM140-WT/- Δ ENESKA- und mit NCAM180-WT/- Δ ENESKA-exprimierenden Zellen. Hierbei zeigte sich, dass die NCAM140- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen auf Laminin nach 5 Stunden sehr viel längere Neuriten aufwiesen als die NCAM140-WT-exprimierenden Zellen (Neuritenlänge: 55 μ m gegenüber 33 μ m); nach 24 Stunden bildeten jedoch beide Zelllinien gleich lange Neuriten aus (Neuritenlänge: 59 μ m). Die mit NCAM140- Δ ENESKA-transfizierten Zellen hatten auf Laminin offensichtlich das in Zellkultur mögliche maximale Wachstum bereits nach 5 Stunden erreicht, während im Gegensatz dazu die NCAM140-WT-exprimierenden Zellen praktisch dieselbe Neuritenlänge erst nach 24 Stunden erreichten. Die NCAM180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen hingegen zeigten nach 24 Stunden geringfügig, jedoch signifikant kürzere Neuriten als die NCAM180-WT-transfizierten Zellen (Neuritenlänge: 50 μ m gegenüber 57 μ m), dieser Unterschied war nach 5 Stunden noch nicht sichtbar.

Aufgrund der von Salomon beschriebenen teilweisen Unterschiede der Neuritenlängen auf Laminin nach 5 und 24 Stunden wurden auch die Timelapse-Versuche mit den NCAM140/180- Δ ENESKA-transfizierten Zellen nach 5 und nach 16 Stunden ausgewertet. Allerdings sind die Neuritenwachstums- und Zellmigrationsversuche nur bedingt miteinander vergleichbar, da die Timelapse-Messungen erst 24 Stunden nach dem Ausplattieren begannen und somit zum Zeitpunkt der ersten Migrationsmessung (nach 24 + 5 Stunden) bereits die Angleichung (NCAM140-WT \leftrightarrow NCAM140- Δ ENESKA) bzw. die Abweichung (NCAM180-WT \leftrightarrow NCAM180- Δ ENESKA) der Neuritenlängen zu beobachten waren.

Für die NCAM180- Δ ENESKA-transfizierten B35-Zellen konnte Salomon erst nach 24 Stunden signifikant kürzere Neuriten im Vergleich zu den NCAM180-WT-exprimierenden Zellen zeigen. Nach 24 + 5 Stunden liegt auch die Migration dieser Zellen bereits deutlich über der der NCAM180-WT-exprimierenden Zellen. Ob lediglich die relativ geringfügig kürzeren Neuriten (50 μ m statt 57 μ m) - wie schon bei den in Kapitel 4.1. genannten Werten der NCAM140-T803D-exprimierenden Zellen diskutiert - allein die schnellere Migration bedingen, ist fraglich. Vor allem die starke Zunahme der Migration der NCAM180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen nach 16 Stunden auf den höchsten in dieser Arbeit

beobachteten Migrationswert lässt vermuten, dass noch andere Mechanismen für die schnellere Migration auf Laminin verantwortlich sind. Denkbar wäre hier, ähnlich wie bei den „Shedding“-Experimenten vermutet (s. Kapitel 4.3.), dass durch das Fehlen der ENESKA-Domäne die Interaktion mit einem Bindungspartner des Cytoskeletts oder mit einem über eine PDZ-Domäne verfügenden Gerüstprotein verhindert wird und diese Interaktion normalerweise nach extrazellulärer Bindung von Laminin z. B. über Integrine die Zellmigration reguliert. Weitere Untersuchungen, in denen gezielt Unterschiede von mit NCAM \pm ENESKA interagierenden Bindungspartnern analysiert werden, sollten die Beantwortung der Frage ermöglichen, welches Protein dieser Bindungspartner sein könnte.

Eine Methode zur Identifizierung dieses Bindungspartners könnte ein Protein-Microarray sein. Nach Herstellung der cytosolischen Domänen (NCAM140/180cyt- Δ ENESKA sowie NCAM140/180cyt-WT) und erfolgreicher Isolierung der Proteine nach Expression in Bakterien könnte mit einem solchen Array ein Bindungspartner identifiziert werden, der nur mit dem Wildtyp, nicht jedoch mit der Δ ENESKA-Mutante interagiert. Weitere Experimente wie eine Co-Immunpräzipitation müssten im Fall eines positiven Fundes den potentiellen Bindungspartner bestätigen. Darüber hinaus könnten Kollokalisationsstudien Aufschluss über einen möglichen Ort innerhalb der Zellmembran (z. B. in der postsynaptischen Membran) geben, an dem NCAM über die ENESKA-Domäne an den potentiellen Interaktionspartner bindet.

Kapitel 5

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Funktionen von definierten Epitopen der cytosolischen Domänen von NCAM140 und NCAM180, der beiden Transmembran-Isoformen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls, untersucht.

Durch den Austausch des innerhalb einer PEST-Sequenz gelegenen Threonins 803 von NCAM140 gegen Aspartat (T803D) oder Alanin (T803A) konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung dieser Aminosäure für die Endocytose von NCAM sowie das Neuritenwachstum von NCAM140-transfizierten B35-Zellen von Bedeutung ist. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse stark darauf hin, dass die MAP-Kinase direkt oder indirekt an dieser Phosphorylierung beteiligt ist.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit die letzten sechs C-terminalen Aminosäuren (ENESKA) von NCAM140 und NCAM180 deletiert, welche ein PDZ-Bindemotiv enthalten. Die NCAM140- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen zeigten allerdings weder bzgl. des Neuritenwachstums noch der Endocytose signifikante Unterschiede im Vergleich zu NCAM140-WT-exprimierenden Zellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das PDZ-Bindemotiv keinen Einfluss auf diese Prozesse hat.

Weiterhin wurde das durch eine Metalloprotease katalysierte und durch den Tyrosinphosphatase-Inhibitor Pervanadat induzierte „Shedding“ der extrazellulären Domäne von NCAM untersucht. Es konnten keine Unterschiede zwischen NCAM140/180-WT- und NCAM140/180- Δ ENESKA-exprimierenden B35-Zellen festgestellt werden. Jedoch konnte mit Hilfe von NCAM140/180-eGFP-Fusionsproteinen gezeigt werden, dass sich nach Pervanadat-Behandlung die NCAM-Internalisierung ins Cytosol signifikant erhöht. Aus den Experimenten lässt sich schließen, dass Endocytose von NCAM während des Pervanadat-induzierten, Metalloprotease-abhängigen „Sheddings“ durch einen MAP-Kinase-abhängigen

Mechanismus verstärkt wird. Allerdings konnte nicht festgestellt werden, ob sich in den Vesikeln nur vollständiges NCAM oder auch „gesheddete“ intrazelluläre oder extrazelluläre NCAM-Fragmente befinden.

Außerdem wurde auch die Migration der mit den genannten mutierten cDNAs stabil transfizierten B35-Zellen untersucht. Dabei konnten allerdings mittels Timelapse-Messungen lediglich geringfügig hemmende (NCAM140-T803A) bzw. fördernde (NCAM140-T803D) Einflüsse dieser Mutationen \pm homophiler NCAM-NCAM-Interaktion festgestellt werden.

Migrationsstudien der NCAM140/180- Δ ENESKA-exprimierenden Zellen führten zu der Erkenntnis, dass ein Fehlen der ENESKA-Domäne für die Zellmotilität auf dem ECM-Protein Laminin von Bedeutung ist. Während diese Mutation ähnlich wie die T803A- und T803D-Mutationen nur geringe Effekte bzgl. der Zellwanderung auf PLL und COS-7- sowie NCAM140-exprimierenden COS140-Zellen zeigten, migrierten die Δ ENESKA-Mutanten, vor allem NCAM180- Δ ENESKA, auf Laminin hochsignifikant schneller als die entsprechenden NCAM-WT-exprimierenden Zellen. Es ist anzunehmen, dass durch das Fehlen der ENESKA-Domäne die Interaktion mit einem möglichen cytoskelettalen Bindungspartner verhindert wird, wodurch die korrekte Zellmigration auf Laminin gestört wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass bestimmte cytosolische Epitope von NCAM bei Neuritenwachstum, Endocytose und Zellmigration von Bedeutung sind.

Literaturverzeichnis

- Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K. & Walter,P.** 2008. Molecular Biology of the Cell. *Garland Science*, Taylor & Francis Group
- Ananthakrishnan,R. & Ehrlicher,A.** 2007. The forces behind cell movement. *Int J Biol Sci.* 3(5): 303-17.PM:17589565
- Arribas,J. & Borroto,A.** 2002. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev.* 102(12):4627-38.
- Bailey,C.H., Chen,M., Keller,F. & Kandel,E.R.** 1992. Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning-related synaptic growth in Aplysia. *Science.* 256:645-9.
- Bailey,C.H., Kaang,B.K., Chen,M., Martin,K.C., Lim,C.S., Casadio,A. & Kandel,E.R.** 1997. Mutation in the phosphorylation sites of MAP kinase blocks learning-related internalization of apCAM in Aplysia sensory neurons. *Neuron.* 18:913-24.
- Beggs,H.E., Baragona,S.C., Hemperly,J.J. & Maness,P.F.** 1997. NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J Biol Chem.* 272:8310-9.
- Blobel,C.P.** 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:32-43.
- Bodrikov,V., Leshchyn'ska,I., Sytnyk,V., Overvoorde,J., den Hertog,J., Schachner,M.** 2005. RPTPalpha is essential for NCAM-mediated p59fyn activation and neurite elongation. *J Cell Biol.* 168(1):127-39.
- Brümmendorf,T. & Rathjen,F.G.**1993. Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem.* 61(4):1207-19. Review.
- Burg,M.A., Halfter,W. & Cole,G.J.** 1995. Analysis of proteoglycan expression in developing chicken brain: characterization of a heparan sulfate proteoglycan that interacts with the neural cell adhesion molecule. *J Neurosci Res.* 41:49-64.
- Büttner,B., Kannicht,C., Reutter,W. & Horstkorte,R.** 2003 The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(3):967-71.
- Büttner,B., Reutter,W. & Horstkorte,R.** 2004. Cytoplasmic domain of NCAM 180 reduces NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Neurosci Res.* 75(6):854-60.
- Büttner,B., Kannicht,C., Reutter,W. & Horstkorte,R.** 2005. Novel cytosolic binding partners of the neural cell adhesion molecule: mapping the binding domains of PLC gamma, LANP, TOAD-64, syndapin, PP1, and PP2A. *Biochemistry.* 44(18):6938-47.
- Carreno,S., Engqvist-Goldstein,A.E., Zhang,C.X., McDonald,K.L. & Drubin,D.G.** 2004. Actin dynamics coupled to clathrin-coated vesicle formation at the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 165(6):781-8.
- Carter,R.E. & Sorkin,A.** 1998. Endocytosis of Functional Epidermal Growth Factor Receptor-Green Fluorescent Protein Chimera. *J Biol Chem.* 273(52):35000-7.
- Chen,A., Haines,S., Maxson,K. & Akeson,R.A.** 1994. VASE exon expression alters NCAM-mediated cell-cell interactions. *J Neurosci Res.* 38(5):483-92.

- Choi,J., Krushel,L.A. & Crossin,K.L.** 2001. NF-kappaB activation by N-CAM and cytokines in astrocytes is regulated by multiple protein kinases and redox modulation. *Glia*. 33(1):45-56.
- Conner,S.D. & Schmid,S.L.** 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422(6927):37-44. Review.
- Colwell,G., Li,B., Forrest,D. & Brackenbury,R.** 1992. Conserved regulatory elements in the promoter region of the N-CAM gene. *Genomics*. 14(4):875-82.
- Cremer,H., Lange,R., Christoph,A., Plomann,M., Vopper,G., Roes,J., Brown,R., Baldwin,S., Kraemer,P., Scheff,S. et al.** 1994. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature*. 367:455-9.
- Dai,L., Alt,W., Schilling,K., Retzlik,J., Gieselmann,V., Magin,T.M. & Kappler,J.** 2005. A fast and robust quantitative time-lapse assay for cell migration. *Exp Cell Res*. 311(2):272-80.
- D'Arcangelo,G., Miao,G.G., Chen,S.C., Soares,H.D., Morgan,J.I. & Curran,T.** 1995. A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature*. 374(6524):719-23.
- Dell'Acqua,M.L., Smith,K.E., Gorski,J.A., Horne,E.A., Gibson,E.S. & Gomez,L.L.** 2006. Regulation of neuronal PKA signaling through AKAP targeting dynamics. *Eur J Cell Biol*. 85(7):627-33. Review.
- Dickson,B.J.** 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*. 298(5600):1959-64. Review.
- Diestel,S., Laurini,C., Traub,O. & Schmitz,B.** 2004. Tyrosine 734 of NCAM180 interferes with FGF receptor-dependent signaling implicated in neurite growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 322(1): 186-96.PM:15313190.
- Diestel,S., Hinkle,C.L., Schmitz,B. & Maness,P.F.** 2005. NCAM140 stimulates integrin-dependent cell migration by ectodomain shedding. *J Neurochem*. 95(6): 1777-84.PM:16277615.
- Diestel,S., Schaefer,D., Cremer,H. & Schmitz,B.** 2007. NCAM is ubiquitinated, endocytosed and recycled in neurons. *J Cell Sci*. 120(Pt 22):4035-49.
- DiMilla,P.A., Stone,J.A., Quinn,J.A., Albelda,S.M. & Lauffenburger,D.A.** 1993. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol*. 122(3):729-37.
- Ditlevsen,D.K., Köhler,L.B., Pedersen,M.V., Risell,M., Kolkova,K., Meyer,M., Berezin,V. & Bock,E.** 2003. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in neural cell adhesion molecule-mediated neuronal differentiation and survival. *J Neurochem*. 84(3):546-56.
- Ditlevsen,D.K., Köhler,L.B., Berezin,V. & Bock,E.** 2007. Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway plays a role in neural cell adhesion molecule-mediated neurite outgrowth and survival. *J Neurosci Res*. 85(4):703-11.
- Ditlevsen,D.K., Povlsen,G.K., Berezin,V. & Bock,E.** 2008. NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res*. 86(4): 727-43.PM:17975827.

- Dzhandzhugazyan, K. & Bock, E.** 1993. Demonstration of (Ca²⁺)-Mg²⁺)-ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett.* 336(2):279-83.
- Dzhandzhugazyan, K. & Bock, E.** 1997. Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding. *Biochemistry.* 36(49):15381-95.
- Eckhardt, M.** 1995. Posttranslationale Modifikationen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM. Dissertation.
- Eddy, R.J., Pierini, L.M., Matsumura, F. & Maxfield, F.R.** 2000. Ca²⁺-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J Cell Sci.* 113 (Pt 7): 1287-98. PM:10704379.
- Evers, E.E., Zondag, G.C., Malliri, A., Price, L.S., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A. & Collard, J.G.** 2000. Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer.* 36(10):1269-74. Review.
- Feng, W. & Zhang, M.** 2009. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci.* 10(2):87-99.
- Gascon, E., Vutskits, L. & Kiss, J.Z.** 2007. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Rev.* 56(1):101-18.
- Gascon, E., Vutskits, L. & Kiss, J.Z.** 2008. The Role of PSA-NCAM in Adult Neurogenesis. *Neurochem Res.* [Epub ahead of print]
- Glading, A., Lauffenburger, D.A. & Wells, A.** 2002. Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* 12(1):46-54. Review.
- Glickman, M.H. & Ciechanover, A.** 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82, 373-428.
- Goschzik, T.** 2004. Einfluss von Aminosäuremutationen im cytosolischen Bereich von NCAM auf Neuritenlängenwachstum und Endocytose. Diplomarbeit.
- Gower, H.J., Barton, C.H., Elsom, V.L., Thompson, J., Moore, S.E., Dickson, G. & Walsh, F.S.** 1988. Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell.* 55:955-64.
- Gutwein, P., Oleszewski, M., Mechttersheimer, S., Agmon-Levin, N., Krauss, K. & Altevogt, P.** 2000. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem.* 275(20):15490-7.
- Hayes, N., Howard-Cofield, E. & Gullick, W.** 2004. Green fluorescent protein as a tool to study epidermal growth factor receptor function. *Cancer Lett.* 206(2):129-35.
- He, Q. & Meiri, K.F.** 2002. Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signaling from growth cones. *Mol Cell Neurosci.* 19:18-31.
- Hendey, B., Klee, C.B. & Maxfield, F.R.** 1992. Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science.* 258(5080):296-9.
- Hieda, M., Isokane, M., Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Shudou, M., Taguchi, T., Hieda, Y. & Higashiyama, S.** 2008. Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. *J Cell Biol.* 180(4):763-9.

- Hinkle,C.L., Diestel,S., Lieberman,J. & Maness,P.F.** 2006. Metalloprotease-induced ectodomain shedding of neural cell adhesion molecule (NCAM). *J Neurobiol.* 66(12): 1378-95.PM:16967505.
- Hinsby,A.M., Berezin,V. & Bock,E.** 2004. Molecular mechanisms of NCAM function. *Front Biosci.* 9: 2227-44.PM:15353284.
- Hoffman,S., Sorkin,B.C., White,P.C., Brackenbury,R., Mailhammer,R., Rutishauser,U., Cunningham,B.A. & Edelman,G.M.** 1982. Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem.* 257(13): 7720-9.PM:7085646.
- Hong,T. & Grabel,L.B.** 2006. Migration of F9 parietal endoderm cells is regulated by the ERK pathway. *J Cell Biochem.* 97(6):1339-49.
- Horstkorte,R., Schachner,M., Magyar,J.P., Vorherr,T. & Schmitz,B.** 1993. The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 121(6):1409-21.
- Huang,C., Jacobsen,K. & Schaller,M.D.** 2004. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 117(Pt 20):4619-28.
- Hübschmann,M.V., Skladchikova,G., Bock,E. & Berezin,V.** 2005. Neural cell adhesion molecule function is regulated by metalloproteinase-mediated ectodomain release. *J Neurosci Res.* 80(6):826-37.
- Hupfeld,C.J., Resnik,J.L., Ugi,S. & Olefsky,J.M.** 2005. Insulin-induced betaarrestin1 Ser-412 phosphorylation is a mechanism for desensitization of ERK activation by Galphai-coupled receptors. *J Biol Chem.* 280, 1016-23.
- Impey,S., Obrietan,K., Wong,S.T., Poser,S., Yano,S., Wayman,G., Deloulme,J.C., Chan,G. & Storm,D.R.** 1998. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron.* 21:869-83.
- Itoh,T. & Takenawa,T.** 2004. Regulation of endocytosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and ENTH proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 282:31-47. Review.
- Jay,P.Y., Pham,P.A., Wong,S.A. & Elson,E.L.** 1995. A mechanical function of myosin II in cell motility. *J Cell Sci.* 108 (Pt 1): 387-93.PM:7738114.
- Jessen,U., Novitskaya,V., Pedersen,N., Serup,P., Berezin,V. & Bock,E.** 2001. The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritogenesis in PC12-E2 cells. *J Neurochem.* 79:1149-60.
- Johannes,L. & Lamaze,C.** 2002. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic.* 3(7):443-51.
- Jørgensen,O.S.** 1995. Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem Res.* 20(5):533-47. Review.
- Jørgensen,O.S. & Bock,E.** 1974. Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J Neurochem.* 23(4): 879-80.PM:4430927.

- Jurado,C., Haserick,J.R. & Lee,J.** 2005. Slipping or gripping? Fluorescent speckle microscopy in fish keratocytes reveals two different mechanisms for generating a retrograde flow of actin. *Mol Biol Cell*. 16(2):507-18.
- Kamiguchi,H., Long,K.E., Pendergast,M., Schaefer,A.W., Rapoport,I., Kirchhausen,T. & Lemmon,V.** 1998. The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci*. 18:5311-21.
- Kamiguchi,H. & Lemmon,V.** 2000. Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J Neurosci*. 20:3676-86.
- Kamiguchi,H.** 2003. The mechanism of axon growth: what we have learned from the cell adhesion molecule L1. *Mol Neurobiol*. 28(3):219-28. Review.
- Kaup,M., Dassler,K., Weise,C. & Fuchs,H.** 2002. Shedding of the transferrin receptor is mediated constitutively by an integral membrane metalloprotease sensitive to tumor necrosis factor alpha protease inhibitor-2. *J Biol Chem*. 277:38494-38502.
- Kim,E. & Sheng,M.** 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*. 5(10):771-81. Review.
- Kiryushko,D., Korshunova,I., Berezin,V. & Bock,E.** 2006. Neural cell adhesion molecule induces intracellular signaling via multiple mechanisms of Ca²⁺ homeostasis. *Mol Biol Cell*. 17(5):2278-86.
- Kiselyov,V.V., Skladchikova,G., Hinsby,A.M., Jensen,P.H., Kulahin,N., Soroka,V., Pedersen,N., Tsetlin,V., Poulsen,F.M., Berezin,V. & Bock,E.** 2003. Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure (Camb)*. 11:691-701.
- Kiselyov,V.V., Soroka,V., Berezin,V. & Bock,E.** 2005. Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. *J Neurochem*. 94(5): 1169-79.PM:16045455.
- Kleene,R. & Schachner,M.** 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci*. 5(3): 195-208.PM:14976519.
- Klemke,R.L., Cai,S., Giannini,A.L., Gallagher,P.J., de Lanerolle,P. & Cheresch,D.A.** 1997. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol*. 137(2):481-92.
- Knowles,R.G., Palacios,M., Palmer,R.M. & Moncada,S.** 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86(13):5159-62.
- Kolkova,K., Pedersen,N., Berezin,V. & Bock,E.** 2000. Identification of an amino acid sequence motif in the cytoplasmic domain of the NCAM-140 kDa isoform essential for its neuritogenic activity. *J Neurochem*. 75(3):1274-82.
- Kolkova,K., Stensman,H., Berezin,V., Bock,E. & Larsson,C.** 2005. Distinct roles of PKC isoforms in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem*. 92(4):886-94.
- Kominek,V.** 2004. Untersuchungen zur Funktion der cytosolischen Domäne der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1 bei Endocytose und Neuritenwachstum. Diplomarbeit.
- Korobova,F. & Svitkina,T.** 2008. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell*. 19(4):1561-74.

- Korshunova,I., Novitskaya,V., Kiryushko,D., Pedersen,N., Kolkova,K., Kropotova,E., Mosevitsky,M., Rayko,M., Morrow,J.S., Ginzburg,I., Berezin,V. & Bock,E.** 2007. GAP-43 regulates NCAM-180-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem.* 100(6):1599-612.
- Krushel,L.A., Cunningham,B.A., Edelman,G.M. & Crossin,K.L.** 1999. NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J Biol Chem.* 274:2432-9.
- Lanier,L.L., Chang,C., Azuma,M., Ruitenberg,J.J., Hemperly,J.J. & Phillips,J.H.** 1991. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol.* 146(12): 4421-6.PM:1710251.
- Le,P.U., Guay,G., Altschuler,Y. & Nabi,I.R.** 2002. Caveolin-1 is a negative regulator of caveolae-mediated endocytosis to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 277(5):3371-9.
- Leshchyn'ska,I., Sytnyk,V., Morrow,J.S. & Schachner,M.** 2003. Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via betaI spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 161(3):625-39.
- Lin,C.H., Espreafico,E.M., Mooseker,M.S. & Forscher,P.** 1996. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron.* 16(4):769-82.
- Little,E.B., Edelman,G.M. & Cunningham,B.A.** 1998. Palmitoylation of the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM serves as an anchor to cellular membranes. *Cell Adhes Commun.* 6:415-30.
- Long,K.E., Asou,H., Snider,M.D. & Lemmon,V.** 2001. The role of endocytosis in regulation L1-mediated adhesion. *J Biol Chem.* 276, 1285-1290.
- Luo,L.** 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci.* 1(3):173-80. Review.
- Lyons,F., Martin,M.L., Maguire,C., Jackson,A., Regan,C.M., Shelley,R.K.** 1988. The expression of an N-CAM serum fragment is positively correlated with severity of negative features in type II schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 23(8):769-75.
- Mackie,K., Sorkin,B.C., Nairn,A.C., Greengard,P., Edelman,G.M. & Cunningham,B.A.** 1989. Identification of two protein kinases that phosphorylate the neural cell-adhesion molecule, N-CAM. *J Neurosci.* 9:1883-96.
- Main,A.L., Harvey,T.S., Baron,M., Boyd,J. & Campbell,I.D.** 1992. The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell.* 71(4):671-8.
- Malenka,R.C.** 2002. Synaptic Plasticity. In K.L.D. et al., ed., *Neuropsychopharmacology - The Fifth Generation of Progress.* Lippincott Williams & Wilkins.
- Mallavarapu,A. & Mitchison,T.** 1999. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol.* 146(5):1097-106.
- Margolis,R.K., Rauch,U., Maurel,P. & Margolis,R.U.** 1996. Neurocan and phosphacan: two major nervous tissue-specific chondroitin sulfate proteoglycans. *Perspect Dev Neurobiol.* 3:273-90.
- Marshall,C.J.** 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80, 179-85.

- Matthias,S. & Horstkorte,R.** 2006. Phosphorylation of the neural cell adhesion molecule on serine or threonine residues is induced by adhesion or nerve growth factor. *J Neurosci Res.* 84(1):142-50.
- Mayford,M., Barzilai,A., Keller,F., Schacher,S. & Kandel,E.R.** 1992. Modulation of and NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia*. *Science* 256, 638–644.
- Mecham,R.P.** 1991. Laminin receptors. *Annu Rev Cell Biol.* 7:71-91. Review.
- Meiri,K.F., Saffell,J.L., Walsh,F.S. & Doherty,P.** 1998. Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci.* 18:10429-37.
- Merlot,S. & Firtel,R.A.** 2003. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci.* 116(Pt 17):3471-8. Review.
- Michael,D., Martin,K.C., Seger,R., Ning,M.M., Baston,R. & Kandel,E.R.** 1998. Repeated pulses of serotonin required for long-term facilitation activate mitogen-activated protein kinase in sensory neurons of *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:1864-9.
- Minana,R., Duran,J.M., Tomas,M., Renau-Piqueras,J. & Guerri,C.** 2001. Neural cell adhesion molecule is endocytosed via a clathrin-dependent pathway. *Eur J Neurosci.* 13:749-56.
- Mousavi,S.A., Malerød,L., Berg,T. & Kjekken,R.** 2004. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J.* 377(Pt 1):1-16. Review.
- Naito,Y., Kinoshita,H., Okabe,Y., Kawahara,R., Sakai,T., Suga,H., Arikawa,S., Oshima,K. & Kojiro,M.** 2006. CD56 (NCAM) expression in pancreatic carcinoma and the surrounding pancreatic tissue. *Kurume Med J.* 53(3-4): 59-62.PM:17317933.
- Nelson,R.W., Bates,P.A. & Rutishauser,U.** 1995. Protein Determinants for Specific Polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule. *J. Biol. Chem.* 270: 17171-17179
- Nicholson,C. & Sykova,E.** 1998. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci.* 21(5):207-15. Review.
- Niethammer,P., Delling,M., Sytnyk,V., Dityatev,A., Fukami,K. & Schachner,M.** 2002. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritegenesis. *J Cell Biol.* 157:521-32.
- Noble,M., Albrechtsen,M., Møller,C., Lyles,J., Bock,E., Goridis,C., Watanabe,M. & Rutishauser,U.** 1985. Glial cells express N-CAM/D2-CAM-like polypeptides in vitro. *Nature.* 316(6030):725-8.
- Nybroe,O., Linnemann,D. & Bock,E.** 1989. Heterogeneity of soluble neural cell adhesion molecule. *J Neurochem.* 53(5):1372-8.
- Opal,P., Garcia,J.J., Propst,F., Matilla,A., Orr,H.T. & Zoghbi,H.Y.** 2003. Mapmodulin/leucine-rich acidic nuclear protein binds the light chain of microtubule-associated protein 1B and modulates neuritegenesis. *J Biol Chem.* 278(36):34691-9.
- Pollard, T.D. & Borisy,G.G.** 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 112(4):453-65. Review.

- Pollard,T.D. & Earnshaw,W.C.** 2008. *Cell Biology*, Saunders Elsevier.
- Pollerberg,G.E., Burridge,K., Krebs,K.E., Goodman,S.R. & Schachner,M.** 1987. The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res.* 250:227-36.
- Pollerberg,G.E., Sadoul,R., Goridis,C. & Schachner,M.** 1985. Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development. *J Cell Biol.* 101:1921-9.
- Pollerberg,G.E., Schachner,M. & Davoust,J.** 1986. Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature.* 324:462-5.
- Polo-Parada,L., Bose,C.M., Plattner,F. & Landmesser,L.T.** 2004. Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice. *J Neurosci.* 24(8):1852-64.
- Polo-Parada,L., Plattner,F., Bose,C. & Landmesser,L.T.** 2005. NCAM 180 acting via a conserved C-terminal domain and MLCK is essential for effective transmission with repetitive stimulation. *Neuron.* 46(6):917-31.
- Prag,S., Lepekhin,E.A., Kolkova,K., Hartmann-Petersen,R., Kawa,A., Walmod,P.S., Belman,V., Gallagher,H.C., Berezin,V., Bock,E. & Pedersen,N.** 2002. NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci.* 115:283-92.
- Probstmeier,R., Kuhn,K. & Schachner,M.** 1989. Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J Neurochem.* 53:1794-801.
- Quade,R.** 2004. Die Bedeutung NCAM-vermittelter Signaltransduktion für Endozytose und Neuritenwachstum. Dissertation.
- Rauch,U.** 2007. Brain matrix: structure, turnover and necessity. *Biochem Soc Trans.* 35(Pt 4):656-60. Review.
- Rice,D.S. & Curran,T.** 2001. Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu Rev Neurosci.* 24:1005-39. Review.
- Ridley,A.J., Schwartz,M.A., Burridge,K., Firtel,R.A., Ginsberg,M.H., Borisy,G., Parsons,J.T. & Horwitz,A.R.** 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651): 1704-9.PM:14657486.
- Rodriguez,O.C., Schaefer,A.W., Mandato,C.A., Forscher,P., Bement,W.M. & Waterman-Storer,C.M.** 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 5(7):599-609. Review.
- Rogers,S., Wells,R. & Rechsteiner,M.** 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 234:364-8.
- Rønn,L.C., Berezin,V. & Bock,E.** 2000. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci.* 18:193-9.
- Rønn,L.C., Dissing,S., Holm,A., Berezin,V. & Bock,E.** 2002. Increased intracellular calcium is required for neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of NCAM. *FEBS Lett.* 518(1-3):60-6.

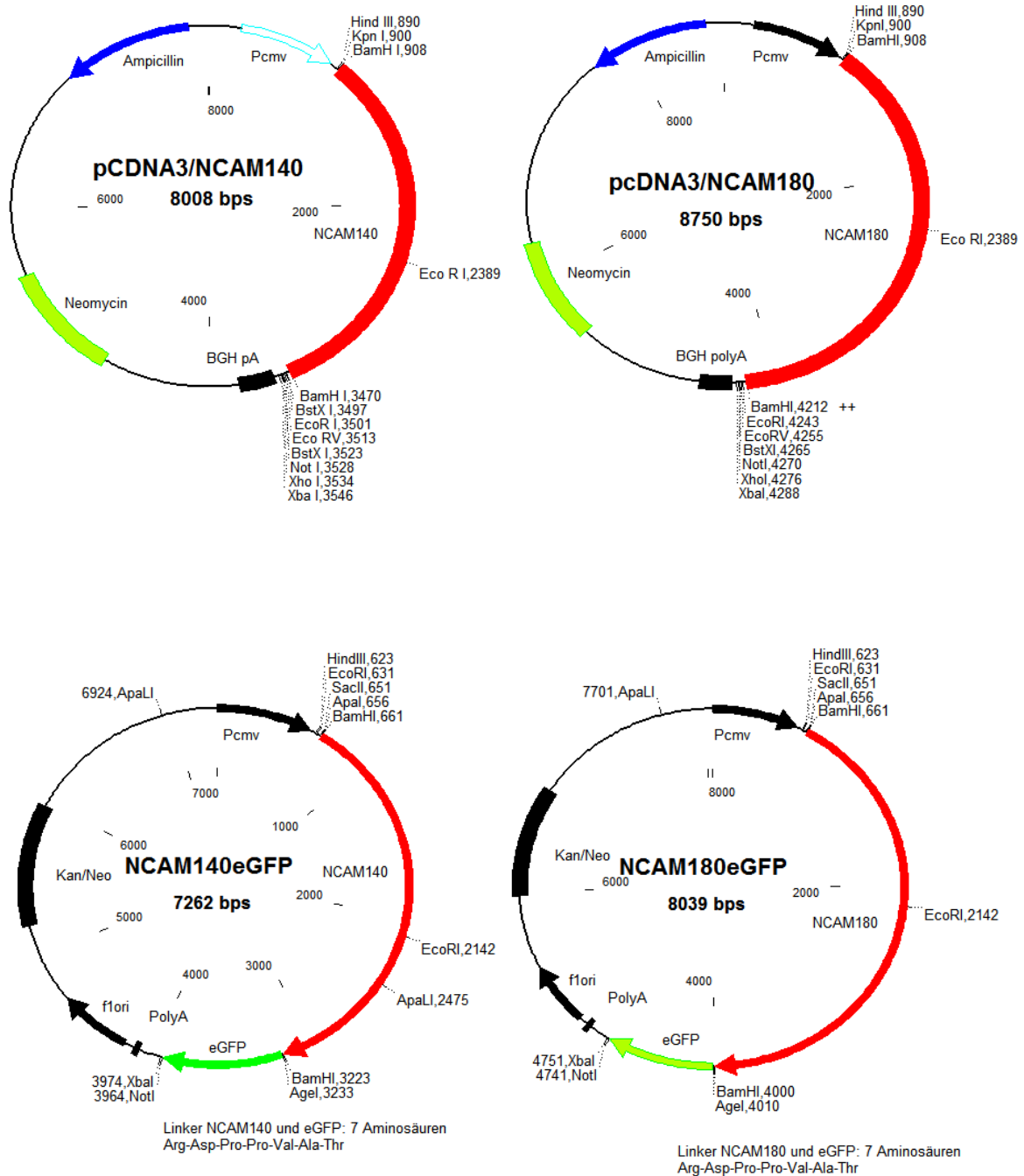
- Rutishauser,U., Grumet,M. & Edelman,G.M.** 1983. Neural cell adhesion molecule mediates initial interactions between spinal cord neurons and muscle cells in culture. *J Cell Biol.* 97:145-52.
- Rutishauser,U. & Landmesser,L.** 1996. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci.* 19(10):422-7. Review.
- Sadoul,R., Hirn,M., Deagostini-Bazin,H., Rougon,G. & Goridis,C.** 1983. Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature.* 304:347-9.
- Saffell,J.L., Williams,E.J., Mason,I.J., Walsh,F.S. & Doherty,P.** 1997. Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron.* 18:231-42.
- Salomon,A.** 2009. Einfluss der ENESKA-Deletion in der cytosolischen Domäne von NCAM auf Neuritenwachstum und Zellmigration. Diplomarbeit.
- Santoni,M.J., Barthels,D., Vopper,G., Boned,A., Goridis,C. & Wille,W.** 1989. Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *EMBO J.* 8(2):385-92.
- Santuccione,A., Sytnyk,V., Leshchyn'ska,I. & Schachner,M.** 2005. Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol.* 169(2):341-54.
- Schachner,M. & Martini,R.** 1995. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* 18(4):183-91. Review.
- Schäfer,A.W., Kamei,Y., Kamiguchi,H., Wong,E.V., Rapoport,I., Kirchhausen,T., Beach,C.M., Landreth,G., Lemmon,S.K. & Lemmon,V.** 2002. L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J. Cell Biol.* 157, 1223-232.
- Schaefer,D.** 2006. Untersuchungen zu intrazellulären Transportvorgängen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM. Diplomarbeit.
- Schmid,R.S., Graff,R.D., Schaller,M.D., Chen,S., Schachner,M., Hemperly,J.J. & Maness,P.F.** 1999. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol.* 38:542-58.
- Schmid,R.S., Pruitt,W.M. & Maness,P.F.** 2000. A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J Neurosci.* 20(11):4177-88.
- Schubert,D., Heinemann,S., Carlisle,W., Tarikas,H., Kimes,B., Patrick,J., Steinbach,J.H., Culp,W. & Brandt,B.L.** 1974. Clonal cell lines from the rat central nervous system. *Nature.* 249:224-7.
- Seki,T. & Arai,Y.** 1993. Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system. *Neurosci Res.* 17(4):265-90
- Skladchikova,G., Ronn,L.C., Berezin,V. & Bock,E.** 1999. Extracellular adenosine triphosphate affects neural cell adhesion molecule (NCAM)-mediated cell adhesion and neurite outgrowth. *J Neurosci Res.* 57(2):207-18.

- Small,S.J. & Akeson,R.A.** 1990. Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development. *J Cell Biol.* 111:2089-96.
- Small,S.J., Haines,S.L. & Akeson,R.A.** 1988. Polypeptide variation in an N-CAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally regulated through alternative splicing. *Neuron.* 1:1007-17.
- Sorkin,B.C., Hoffman,S., Edelman,G.M. & Cunningham,B.A.** 1984. Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Science.* 225(4669):1476-8.
- Spicer,A.P., Joo,A. & Bowling,R.A. Jr.** 2003. A hyaluronan binding link protein gene family whose members are physically linked adjacent to chondroitin sulfate proteoglycan core protein genes: the missing links. *J Biol Chem.* 278(23):21083-91.
- Storms,S.D. & Rutishauser,U.** 1998. A role for polysialic acid in neural cell adhesion molecule heterophilic binding to proteoglycans. *J Biol Chem.* 273:27124-9.
- Takeichi, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem.* 59:237-52.
- Sun,W., Gan,Y., Fu1,Y., Lu1,D. & Chiang,H.** 2008. An Incoherent Magnetic Field Inhibited EGF Receptor Clustering and Phosphorylation Induced by a 50-Hz Magnetic Field in Cultured FL Cells. *Cell Physiol Biochem.* 22:507-514.
- Sytnyk,V., Leshchyns'ka,I., Nikonenko,A.G. & Schachner,M.** 2006. NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *J Cell Biol.* 174(7):1071-85.
- Takada,Y., Ye,X. & Simon,S.** 2007. The integrins. *Genome Biol.* 8(5):215. Review.
- Tessier-Lavigne,M. & Goodman,C.S.** 1996. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 274(5290):1123-33. Review.
- Thiery,J.P., Duband,J.L., Rutishauser,U. & Edelman,G.M.** 1982. Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:6737-41.
- Tomasiewicz,H., Ono,K., Yee,D., Thompson,C., Goridis,C., Rutishauser,U. & Magnuson,T.** 1993. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron.* Vol.11, 1163-1174.
- van Kammen,D.P., Poltorak,M., Kelley,M.E., Yao,J.K., Gurklis,J.A., Peters,J.L., Hemperly,J.J., Wright,R.D. & Freed,W.J.** 1998. Further studies of elevated cerebrospinal fluid neuronal cell adhesion molecule in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 43(9):680-6.
- Vaughn,D.E. & Bjorkman,P.J.** 1996. The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron.* 16(2):261-73. Review.
- Vawter,M.P.** 2000. Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders. *Eur J Pharmacol.* 405(1-3): 385-95.PM:11033343.
- Vawter,M.P., Usen,N., Thatcher,L., Ladenheim,B., Zhang,P., VanderPutten,D.M., Conant,K., Herman,M.M., van Kammen,D.P., Sedvall,G., Garver,D.L. & Freed,W.J.** 2001. Characterization of human cleaved N-CAM and association with schizophrenia. *Exp Neurol.* 172(1):29-46.

- Velasco-Loyden,G., Arribas,J. & Lopez-Casillas,F.** 2004. The shedding of betaglycan is regulated by pervanadate and mediated by membrane type matrix metalloprotease-1. *J Biol Chem.* 279:7721-7733.
- Vutskits,L., Djebbara-Hannas,Z., Zhang,H., Paccaud,J.P., Durbec,P., Rougon,G., Muller,D. & Kiss,J.Z.** 2001. PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons. *Eur J Neurosci.* 13(7):1391-402.
- Walmod,P.S., Kolkova,K., Berezin,V. & Bock,E.** 2004. Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochem Res.* 29, 2015-35.
- Walsh,F.S., Furness,J., Moore,S.E., Ashton,S. & Doherty,P.** 1992. Use of the neural cell adhesion molecule VASE exon by neurons is associated with a specific down-regulation of neural cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth in the developing cerebellum and hippocampus. *J Neurochem.* 59:1959-62.
- Welch,M.D. & Mullins,R.D.** 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18: 247-88.PM:12142287.
- Williams,A.F. & Barclay,A.N.** 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol.* 6:381-405. Review.
- Williams,A.F., Davis,S.J., He,Q. & Barclay,A.N.**1989. Structural diversity in domains of the immunoglobulin superfamily. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 54 Pt 2:637-47.
- Xu,J., Wang,F., Van Keymeulen,A., Herzmark,P., Straight,A., Kelly,K., Takuwa,Y., Sugimoto,N., Mitchison,T. & Bourne,H.R.** 2003. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell.* 114(2):201-14.
- Yang,P., Yin,X. & Rutishauser,U.** 1992. Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J Cell Biol.* 116(6):1487-96.
- Zhang,H., Vutskits,L., Calaora,V., Durbec,P. & Kiss,J.Z.** 2004. A role for the polysialic acid-neural cell adhesion molecule in PDGF-induced chemotaxis of oligodendrocyte precursor cells. *J Cell Sci.* 117(Pt 1):93-103.

Anhang

Vektorkarten:



Aminosäuresequenzen von NCAM140 und NCAM180:

NCAM140:

1. 50.
 MLQTKDLIWTLFFLGTAVSLQVDIVPSQGEISVGESKFFLCQVAGDAKDK
 100.
 DISWFSPNGEKLTPNQQRISVWVNDSSSTLTIYNANIDDAGIYKCVVTGE
 150.
 DGSESEATVNVKIFQKLMFKNAPTPQEFREGEDAVIVCDVVSSLPPTIIWK
 200.
 HKGRDVILKKDVRFIVLSNNYLQIRGIKKTDEGTYRCEGRILARGEINFKD
 250.
 IQVIVNVPPTIQARQNIWNATANLGQSVTLVCD AEGFPEPTMSWTKDGEQI
 300.
 EQEEDDEKYIFSDDSSQLTIKKVDKNDEAEYICIAENKAGEQDATIHLKVF
 350.
 AKPKITYVENQTAMELEEQVTLTCEASGDPIPSITWRTSTRNISSEKTL D
 400.
 GHMVVRSHARVSSLTLKSIQYTDAGEYICTASNTIGQDSQSMYLEVQYAP
 450.
 KLQGPVAVYTWEGNQVNITCEVFAYPSATISWFRDGLLPSSNYSNIKIY
 500.
 NTPSASYLEVTPDSEDFGNYNCTAVNRIGQESLEFILVQADTPSSPSIDQ
 550.
 VEPYSSTAQVQFDEPEATGGVPILKYKAEWRAVGEEVWHSKWYDAKEAS
 600.
 MEGIVTIVGLKPETTYAVRLAALNGKGLGEISAASEFKTQPVQGEPSAPKL
 650.
 EGQMGEDGNSIKVNLIKQDDGGSPIRHVLRVYRALSSEWKPEIRLPSGSD
 700.
 HVMLKSLDWNAEYEVYVVAENQQGKSKAAHFVVRTSAQPTAIPANGSPT
 750.
 SGLSTGAIVGILIVIFVLLLVVVDITCYFLNKCGLFM CIAVNLCGKAGPGA
 800.
 KGKDMEEGKA AFSKDESKEPIVEVRTEEERTPNHDGGK **HTEPNETTPLTE**
 848.
PEKGPVEAKPECQETETKPAPAEVKTPNDATQTKENESKA

NCAM180 (ab Transmembrandomäne, extrazelluläre Domäne wie bei NCAM140):

750.
 GAIVGILIVIFVLLLVVVDITCYFLNKCGLFM CIAVNLCGKAGPGA KGKD
 800.
 MEEGKA AFSKDESKEPIVEVRTEEERTPNHDGGK **HTEPNETTPLTEPELPA**
 850.
DTTATVEDMLPSVTTVTTNSDTITETFATAQNSPTSETTTLTSSIAPPATTV
 900.
PDSNSVPAGQATPSKGV TASSSSPASAPKVAPLVDLSDTPTSAPSASNLSS
 950.
TVLANQGAVLSPSTPASAGETSKAPPASKASPAPTPTPAGAASPLAAVAA
 1000.
PATDAPQAKQEAPSTKGPDPEPTQP GTVKNPPEAATAPASPKSKAATTNP
 1050.
SQGEDLKMDEGNFKTPDIDLAKDVFAALGSPAPATGASGQASELAPSTAD
 1100. 1115.
 SAVPPAPAKTEKGPVEAKPECQETETKPAPAEVKTPNDATQTKENESKA

PEST-Sequenzen: **Rot**

Transmembrandomäne: **Grün**

NCAM180-Insert: *Kursiv*