

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere
Abteilung Biochemie
Leiterin: Prof. Dr. B. Schmitz

Die Bedeutung NCAM-vermittelter Signaltransduktion für Endozytose und
Neuritenwachstum

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Grades

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

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am

27.01.2004

von

Reinhild Quade

aus Hennef

Referent:	Prof. Dr. Brigitte Schmitz
Korreferent:	Prof. Dr. Klaus Pietrzik
Tag der mündlichen Prüfung:	28.07.2004

Danksagung

Frau Prof. Dr. Brigitte Schmitz herzlichen Dank für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes sowie ihrer steten Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Klaus Pietrzik danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Der Graduiertenförderung des Landes Nordrhein Westfalen möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Ich bedanke mich bei meinen Mitarbeitern für das gute Berufsklima, die stete Hilfsbereitschaft und Aufmunterung bei jeglichen Laborproblemen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Langenfeld-Oster, Herrn Dr. Karsten Thelen und Frau Sabine Werner für die zahlreichen Anregungen und fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen. Frau Marie-Theres Fergen und Frau Claudia Müller danke ich für ihre Hilfe in der Zellkultur, Herrn Bernd Gehrig für seine Hilfe in der Proteinchemie.

Für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung organisatorischer Probleme bedanke ich mich besonders bei Frau Ursula Munzel.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie:

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich zu jeder Zeit unterstützt und aufgemuntert haben, vielen Dank!

Meinem Mann, mit dem ich zu jeder Zeit über Probleme reden konnte und der mich immer unterstützt und motiviert hat, vielen Dank!

Importance of NCAM-mediated Signaltransduction for Endocytosis and Neurite outgrowth

The neural cell adhesion molecule NCAM is a membrane-associated glycoprotein expressed on the surface of neural cells. NCAM plays a pivotal role in neuronal development and regeneration and is involved in synaptic plasticity associated with learning and memory in the adult.

NCAM is a member of the immunoglobuline superfamily and exists in three major isoforms. NCAM180 and NCAM140 are transmembrane proteins with cytoplasmic tails of different length, NCAM120 is bound to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol anchor. All three isoforms have an extracellular domain consisting of five Ig-like domains and two fibronectin type-III domains (Cunningham et al., 1987).

Since the PEST sequence of aplysia apCAM – a homologue of NCAM – plays a key role in endocytosis of apCAM (Bailey et al., 1997), we investigated whether the PEST sequence of human NCAM140 is also important for its internalization, which may trigger signal transduction mechanisms implicated in neurite outgrowth in a similar way as has been shown for the neural cell adhesion molecule L1 (Schmid et al., 2000).

The presented results indicate an influence of the PEST sequence of human NCAM140 on its internalization and on neurite outgrowth in rat B35 neuroblastoma cells.

Die Bedeutung NCAM-vermittelter Signaltransduktion für Endozytose und Neuritenwachstum

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist ein membran-assoziiertes Glykoprotein, das auf der Oberfläche von Nervenzellen exprimiert wird. NCAM spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems und ist beteiligt an der Synapsenbildung sowie Lernprozessen und der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses beim Erwachsenen.

NCAM ist ein Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie und existiert in drei Hauptisoformen. NCAM180 und NCAM140 sind Transmembranproteine mit unterschiedlich langen zytoplasmatischen Anteilen. NCAM120 ist durch Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol in der Plasmamembran verankert.

Alle drei Isoformen beinhalten in ihrem extrazellulären Anteil fünf Ig-ähnliche und zwei Fibronektion Typ-III homologe Domänen (Cunningham et al., 1987).

Da die PEST Sequenz des zu NCAM analogen neuronalen Zelladhäsionsmoleküls apCAM in der Meeresschnecke *Aplysia* eine Schlüsselrolle in der Endozytose von apCAM spielt (Bailey et al., 1997), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch die PEST Sequenz von humanem NCAM140 wichtig für die Internalisierung von NCAM140 ist, welche dann einen Signaltransduktionsmechanismus für das Neuritenwachstum auslöst, wie es für das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 gezeigt wurde (Schmid et al., 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen den Einfluss der PEST Sequenz von humanem NCAM140 auf die Internalisierung von NCAM140 und auf das Neuritenwachstum in B35 Neuroblastomzellen aus Ratten.

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:Strukturen verschiedener Mitglieder der Ig-Superfamilie	S. 3
Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM	S. 5
Abb. 3: Schematisches Modell der L1/NCAM cis-Interaktion	S. 8
Abb. 4: Modell der NCAM-vermittelten Signaltransduktion	S. 12
Abb. 5: Modell der Serotonin-induzierten Internalisierung von apCAM	S. 15
Abb. 6: Agarosegel der cDNA von NCAM140 nach PCR	S. 51
Abb. 7: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> -Klonierungsvektors pGEM [®] -T	S. 52
Abb. 8: Restriktionsanalyse des richtigen Einbaus des NCAM140 Inserts in den pGemT-Vektor	S. 53
Abb. 9: Schematische Darstellung des <i>in vitro</i> -Transkriptionsvektors pNKS2	S. 54

Abb. 10: Restriktionsanalyse des richtigen Einbaus des NCAM140 Inserts in den pNKS2-Vektor	S. 55
Abb. 11: Nachweis der Expression von L1 und NCAM140 in <i>Xenopus</i> Oozyten und der Endoglycosidase H-sensitiven N-Glykane auf L1 und der PNGase F-sensitiven Kohlenhydrate von L1 und NCAM140	S. 57
Abb. 12: Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3	S. 59
Abb. 13: Agarosegel des Vektors pcDNA3 mit NCAM140 Wildtyp cDNA und NCAM140 Mutanten nach Restriktion mit BAMH1 und XHO1	S. 62
Abb. 14: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse zur Identifikation NCAM140 positiver Klone	S. 63
Abb. 15: Vergleich der Expressionsstärke von mit NCAM140 bzw. NCAM140 Mutanten transfizierten Zellklonen	S. 64
Abb. 16: Endozytose von NCAM140-WT (A), NCAM140- δ PEST (B) und NCAM140-T781A (C) in B35 Neuroblastomzellen	S. 67
Abb. 17: Darstellung der Anzahl der Endozytosevesikel in den transfizierten Zellen NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A	S. 68

- Abb. 18: Darstellung der Anzahl der Endozytosevesikel in den transfizierten Zellen NCAM140-WT und NCAM140-WT, behandelt mit U0126 S. 69
- Abb. 19: NCAM140-WT Kontrollzellen (A), NCAM140-WT mit U0126 S. 70
- Abb. 20: NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierte Zellen im ausdifferenzierten Zustand S. 71
- Abb. 21: Neuritenlängenvergleich nicht ausdifferenzierter und ausdifferenzierter Zellen S. 72/73
- Abb. 22: Zelloberflächenbiotinylierung der NCAM140-WT (Lane 1), NCAM140- δ PEST (Lane 2) und NCAM140-T781A (Lane 3) transfizierten Zellen S. 76
- Abb. 23: CREB-Level der NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen ohne 10 minütige Induktion der Endozytose bzw. bei 10minütiger Induktion der Endozytose S. 78
- Abb 24: P-CREB-Level der NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen ohne 10 minütige Induktion der Endozytose bzw. bei 10minütiger Induktion der Endozytose S. 78

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
AA	Arachidonsäure
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-Ethyl-Benzthiazolinsulfonat (6))
AMOG	Adhesion Molecule on Glia
AP	alkalische Phosphatase
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumpersulfat
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BME	Basalmedium nach Eagle
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin
CAM	Cell Adhesion Molecule
CaMKs	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinasen
cAMP	Zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
Ci	Curi
CNBr	Cyanogenbromid
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding protein
Cy3	Indocarbocyanin
DAB	Diaminobenzidin

DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
dbcAMP	Dibutyl-cAMP
DNAse	Desoxyribonuklease
DMEM H	Dulbecco`s Modified Eagle Medium High Glucose
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonucleotidtriphosphate
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N'-Tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
G	Gauge
G	Guanin
GAP-43	Growth-Associated protein 43
GlcNac	N-Acetyl-Glucosamin
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HBSS ⁻	Hank`s Balanced Salt Solution ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺ -Ionen
HNK	Human Natural Killer

Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethylsulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
IP3	Inositoltrisphosphat
IPG	Inositolphosphatidylglycan
kDa	Kilodalton
LC	Long Chain
MAG	Myelin Associated Glycoprotein
Man	Mannose
MEM	Minimal Essential Medium
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NGF	Nerve Growth Factor
NHS	N-Hydroxy-Sulfosuccinimidester
NMRI	Noval Medical Research Institute
NP-40	Nonidet P-40
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PIP2	Phosphatidyinositol-Biphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

PLC	Phospholipase C
POD	Peroxidase
PSA	Polysialinsäure
U	Uracil
RSK	ribosomale Protein S6 Kinase Familie
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
T	Thymin
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
V	Volt
v	Volumen
VASE	Variable Alternatively Spliced Exon
w	weight

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	S. 1
1.1.	Zelladhäsionsmoleküle	S. 1
1.2.	Die Immunglobulin-Superfamilie	S. 2
1.2.1.	Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM	S. 4
1.2.1.1.	Molekulare Struktur von NCAM	S. 4
1.2.1.2.	Interaktionen von NCAM und NCAM-vermittelte Signaltransduktionswege	S. 6
1.2.1.3.	Clathrin-abhängige Endozytose von NCAM	S. 14
1.3.	Ziele dieser Arbeit	S. 16
2.	Material und Methoden	S. 17
2.1.	Materialien	S. 17
2.1.1.	Vektoren	S. 17
2.1.2.	Primäre Antikörper	S. 17
2.1.3.	Sekundäre Antikörper	S. 18
2.1.4.	Enzyme	S. 19
2.1.5.	Inhibitoren	S. 19
2.1.6.	Allgemeine Geräte	S. 19
2.1.7.	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	S. 20
2.1.8.	Lösungen und Puffer	S. 20
2.1.9.	Radioaktiv markierte Verbindungen	S. 27
2.1.10.	Tiere aus institutseigener Haltung	S. 27
2.1.11.	Zellen	S. 28
2.2.	Molekularbiologische Methoden	S. 28
2.2.1.	Allgemeines	S. 28

2.2.2.	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	S. 28
2.2.3.	Transformation kompetenter Bakterien	S. 29
2.2.4.	Anlegen einer E. coli Flüssigkultur	S. 29
2.2.5.	Isolierung von bakterieller Plasmid-DNA	S. 29
2.2.6.	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	S. 30
2.2.7.	Elution von DNA aus Agarosegelen	S. 30
2.2.8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 30
2.2.9.	Spaltung von DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen	S. 31
2.2.10.	Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren	S. 31
2.2.11.	Präzipitation von DNA mittels Ethanol	S. 32
2.2.12.	DNA-Sequenzierung	S. 32
2.2.13.	Ligation von DNA-Fragmenten	S. 33
2.2.14.	Einbau von Schnittstellen ins NCAM140 Insert für Klonierungen in verschiedene Vektoren	S. 33
2.2.15.	Erzeugung der NCAM140 Mutante δ PEST	S. 34
2.2.16.	Mutagenese zur Erzeugung der NCAM 140 Mutante T781A	S. 34
2.2.17.	<i>in vitro</i> Transkription	S. 35
2.3.	Proteinexpression in <i>Xenopus</i> Oozyten	S. 35
2.3.1.	Haltung von <i>Xenopus laevis</i>	S. 35
2.3.2.	Entnahme von <i>Xenopus</i> -Oozyten	S. 36
2.3.3.	Vereinzelung von Oozyten	S. 37
2.3.4.	Mikroinjektion von cRNA in Oozyten	S. 37
2.3.5.	Markierung von Oozyten mit ^{35}S -Methionin	S. 38

2.3.6.	Herstellung von Oozytensolubilisaten	S. 38
2.4.	Zellkultur	S. 39
2.4.1.	Kultivierung und Subkultivierung von B35 Zellen	S. 39
2.4.2.	Stabile Transfektion von Säugerzellen	S. 40
2.4.3.	Einfrieren von Zellen	S. 40
2.4.4.	Behandlung von Zellen mit pharmakologischen Substanzen	S. 41
2.4.4.1.	Behandlung von B35 Zellen mit dbcAMP	S. 41
2.4.5.	Biosynthetische Markierung von Säugerzellen	S. 41
2.4.5.1.	Zelloberflächenbiotinylierung von B35 Zellen	S. 41
2.4.6.	Induktion der Endozytose von Antigen- Antikörper-Komplexen	S. 42
2.4.7.	Herstellung von Zelllysaten	S. 42
2.5.	Immunzytochemie	S. 43
2.5.1.	Indirekte Immunfluoreszenz	S. 43
2.5.2.	Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Endozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen	S. 43
2.5.3.	Antikörperverdünnungen für die Immunfluoreszenz	S. 44
2.6.	Proteinchemische Methoden	S. 45
2.6.1.	Immunpräzipitation von NCAM und L1 aus Oozytensolubilisaten	S. 45
2.6.2.	Immunpräzipitation von NCAM aus Zelllysaten	S. 45
2.6.3.	Proteinbestimmung	S. 46
2.6.4.	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE	S. 46
2.6.5.	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	S. 47
2.6.6.	Fluorographie	S. 47
2.6.7.	Western Blot nach dem Semi-dry Verfahren	S. 47

2.6.8.	Ponceau S-Färbung	S. 48
2.6.9.	Protein-Detektion	S. 48
2.6.10.	Antikörperverdünnungen für Western Blots	S. 49
3.	Ergebnisse	S. 50
3.1.	Untersuchung der Glykosylierung von humanem L1 und humanem NCAM140 in <i>Xenopus</i> Oozyten	S. 50
3.1.1.	Einbau von Schnittstellen in das NCAM140 Insert für Klonierungen in verschiedene Vektoren	S. 50
3.1.2.	Einbau der cDNA für humanes NCAM140 in den Klonierungs-vektor pGEM [®] -T (Promega)	S. 51
3.1.3.	Einbau der cDNA für humanes NCAM140 in den eukaryotischen Transkriptionsvektor pNKS2	S. 53
3.1.4.	³⁵ S-Methionin-Markierung von L1- und NCAM140-Proteinen in <i>Xenopus</i> Oozyten	S. 55
3.2.	Untersuchung des Einflusses der PEST Sequenz auf die Endozytose von humanem NCAM140 in B35 Neuroblastomzellen	S. 58
3.1.4.	Einbau der cDNA für NCAM140 in den euk Eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3	S. 58
3.2.2.	Erzeugung von NCAM140 Mutanten	S. 60
3.2.2.1.	Erzeugung der NCAM140 Mutante NCAM- δ PEST	S. 60
3.2.2.2.	Erzeugung der NCAM140 Mutante NCAM140-T781A	S. 61
3.2.3.	Stabile Transfektion von NCAM negativen B35 Zellen	S. 62
3.2.4.	Untersuchung der Threonin-Phosphorylierung in NCAM140	S. 64

3.2.5.	Untersuchung der Endozytose von NCAM140 in B35 Neuroblastomzellen	S. 65
3.2.6.	Untersuchung des Einflusses der Deletion der PEST Sequenz und der Mutation T781A von NCAM140 auf das Neuritenwachstum	S. 71
3.2.7.	Zelloberflächenbiotinylierung von NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A	S. 72
3.2.8.	Untersuchung des Einflusses der Endozytose auf die Aktivierung von CREB	S. 73
4.	Diskussion	S. 79
5.	Zusammenfassung	S. 96
6.	Literaturverzeichnis	S. 98
7.	Anhang	S. 109

1. Einleitung

Die Entwicklung des Nervensystems unterliegt einer genau aufeinander abgestimmten sowohl zeitlichen als auch räumlichen Kooperation und Koordination von Nervenzellen, die sich spezifisch mit anderen Zellen verbinden, um ein komplexes und fein reguliertes Schaltnetz auszubilden. Durch Senden und Empfangen von Signalen und Informationen über spezifische Zell-Zell-Interaktionen können die Zellen ihre korrekte Form und Position innerhalb des Nervensystems einnehmen. Dafür sind neben Rezeptoren und Kanälen vor allem Zelladhäsionsmoleküle zuständig, indem sie Zellkontakte ermöglichen, Informationen ins Innere der Zelle weiterleiten bzw. von dort empfangen und so entsprechende Reaktionen der Nervenzellen bewirken.

1.1. Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind membranständige Zelloberflächenglykoproteine. Sie dienen der Adhäsion von Zellen mit der umgebenden Extrazellulärmatrix. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Zellinteraktion, der Zellmigration, der Zellerkennung und der Zelldifferenzierung. Erstmals wurden sie von Edelman im Jahre 1983 entdeckt, der in seinen Arbeiten durch den Einsatz von Antikörpern gegen Proteine der Zelloberfläche Zell-Zell-Adhäsion nachweisen konnte. Zelladhäsionsmoleküle können außerdem als Transmembranproteine auf beiden Seiten der Zellmembran Bindungen eingehen und so Informationen zwischen Komponenten der Extrazellulärmatrix und des Cytoskeletts weiterleiten. Des Weiteren tragen sie zur dreidimensionalen Stabilität einer Zelle bei (Gumbiner, 1996).

In ihrem Aufbau sind Zelladhäsionsmoleküle sehr komplex und unterscheiden sich in Größe und Zusammensetzung ihrer Strukturelemente. Sie bestehen in der Regel aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kürzeren cytoplasmatischen Domäne. Aufgrund bestimmter Struktur- und Funktionsmerkmale lassen sie sich in Gruppen zusammenfassen und in vier Proteinfamilien unterteilen (Aplin, 1998):

1. Immunglobulin-Superfamilie (Brümmendorf und Rathjen, 1996)
2. Cadherine (Takeichi, 1990)
3. Integrine (Reichardt und Tomaselli, 1991)
4. Selektine (Lasky, 1995)

Im Rahmen dieser Arbeit soll auf die Immunglobulin-Superfamilie eingegangen werden, insbesondere auf NCAM, seine Endozytose und die NCAM vermittelte Signaltransduktion.

1.2. Die Immunglobulin-Superfamilie

1977 wurde mit der Entdeckung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM die Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) begründet. Sie umfasst eine Vielzahl verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, die sich aufgrund typischer Strukturelemente im extrazellulären Bereich, der sogenannten Immunglobulin-ähnlichen Domänen, auszeichnen. Vaughn und Bjorkman (1996) konnten zeigen, dass diese Strukturähnlichkeit mit den Immunglobulin-Klassen der Antikörper aufweisen und gewöhnlich aus 55-75 Aminosäuren besteht, die jeweils eine spezifische Disulfid-Brücke enthalten. Die Anzahl der Ig-ähnlichen Domänen kann innerhalb der Ig-Superfamilie stark variieren. Viele Vertreter dieser Familie besitzen zusätzlich Fibronectin Typ III-homologe Domänen, die sich von den typischen Strukturelementen des Fibronectins ableiten und zur Adhäsion beitragen (Kimizuka et al., 1991). Die meisten Mitglieder der Ig-Superfamilie besitzen eine cytoplasmatische Domäne. Mitglieder, denen die Transmembrandomäne fehlt, sind über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) in der Plasmamembran verankert. Hierzu gehören TAG-1, F3 oder die NCAM-Isoform NCAM120.

Im Gegensatz zu der Familie der Cadherine und der Integrine, die eine Ca^{2+} -abhängige Adhäsion vermitteln, üben die Mitglieder der Ig-Superfamilie eine Ca^{2+} -unabhängige Wirkung aus. Ihre Bindungseigenschaften sind sowohl homophiler als auch heterophiler Natur. Sie können in cis- (innerhalb einer Zellmembran) und trans-Konstellation (Zell-Zell-Kontakt) erfolgen.

Über die Ig-ähnlichen Domänen, die auch glykosyliert sind, werden die meisten Adhäsionsvorgänge vermittelt. Bei Zell-Zell-Interaktionen spielen neben den

Proteinen oft N- oder O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate eine wichtige Rolle (Varki, 1993 , Schachner und Martini, 1995).

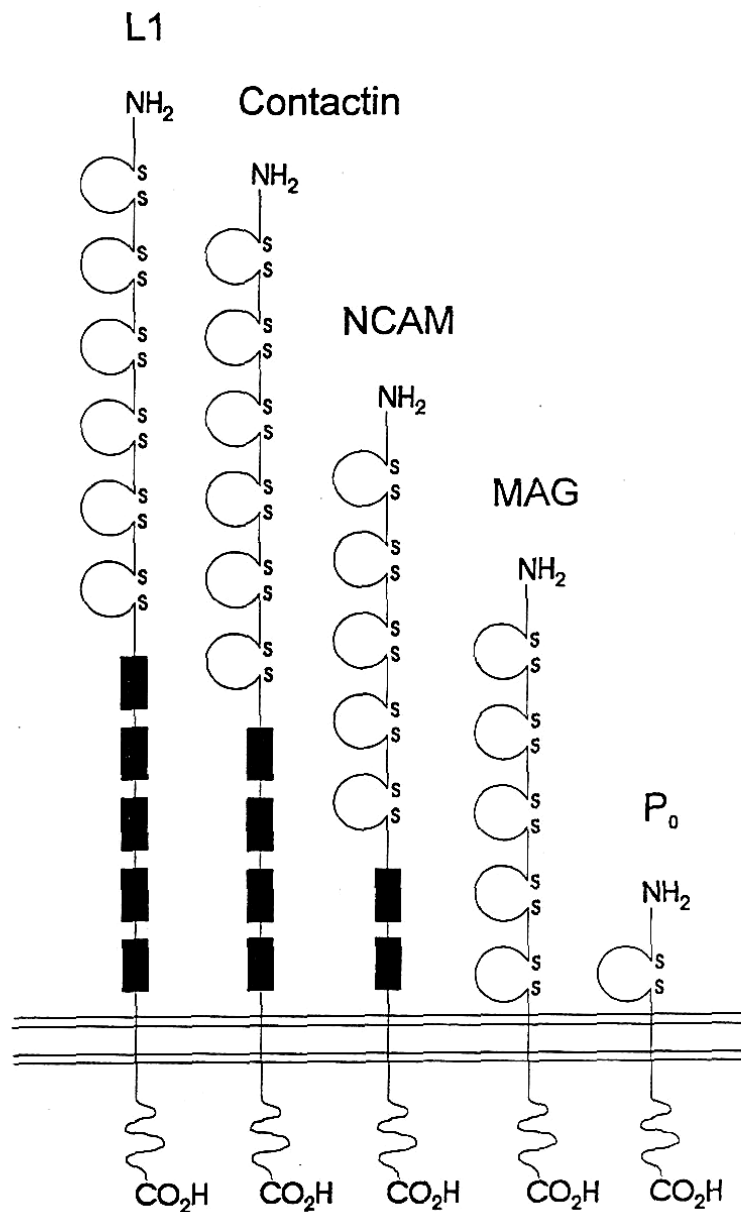


Abb. 1: Strukturen verschiedener Mitglieder der Ig-Superfamilie. Die Ig-Domänen sind als Halbkreise dargestellt, die Fibronektin Typ III-homologen Domänen als Rechtecke. Mit S sind die Cysteinreste bezeichnet, die die für Ig-Domänen typischen Disulfid-Brücken ausbilden. Die dargestellten Zelladhäsionsmoleküle zählen zu den Typ 1-Transmembranproteinen.

1.2.1. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist ein Zelloberflächenglykoprotein, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Erstmals entdeckt wurde es im Nervensystem embryonaler Hühner (Brackenbury et al., 1977; Thiery et al., 1977). Spezies-homologe Proteine wurden später auch in Ratte (Jorgensen et al., 1980), Maus (Hirn et al., 1982), Rind (Premont, 1991); Mensch (Thompson et al., 1989), Huhn (Hemperly et al., 1986) und *Xenopus* (Balak et al., 1987) identifiziert. NCAM-ähnliche Proteine sind apCAM, ein neurales Zelladhäsionsmolekül im Nervensystem der Meeresschnecke *Aplysia* (Mayford et al., 1992), Fascilin, ein Zelladhäsionsmolekül im Nervensystem von *Drosophila* (Grenningloh et al., 1992) und das im Blutegel-Nervensystem exprimierte Zelladhäsionsmolekül Leech-Cam (Huang et al., 1997). Alle vier Proteine enthalten in ihren extrazellulären Bereichen 5 Ig-ähnliche Domänen und 2 Fibronectin Typ III-homologe Domänen.

1.2.1.1. Molekulare Struktur von NCAM

NCAM wird von einem singulären, aus mindestens 25 Exons zusammengesetzten Gen kodiert, das beim Menschen auf Chromosom 11 und bei der Maus auf Chromosom 9 lokalisiert ist (Nguyen et al., 1986; D'Eustachio et al., 1985). Durch alternatives Spleißen entstehen im wesentlichen drei verschiedene Isoformen von NCAM (Owens et al., 1987; Barbas et al., 1988), die im SDS-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 120, 140 bzw. 180 kDa aufweisen (Cunningham et al., 1987). NCAM140 und NCAM180 sind Transmembranproteine. Sie unterscheiden sich in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domänen. NCAM120 dagegen ist über einen GPI-Linker in der Zellmembran verankert. Alle NCAM-Isoformen besitzen fünf Ig-ähnliche Domänen (Chothia und Jones, 1997) und zwei Fibronectin Typ III-homologe Domänen (Jørgensen et al., 1995).

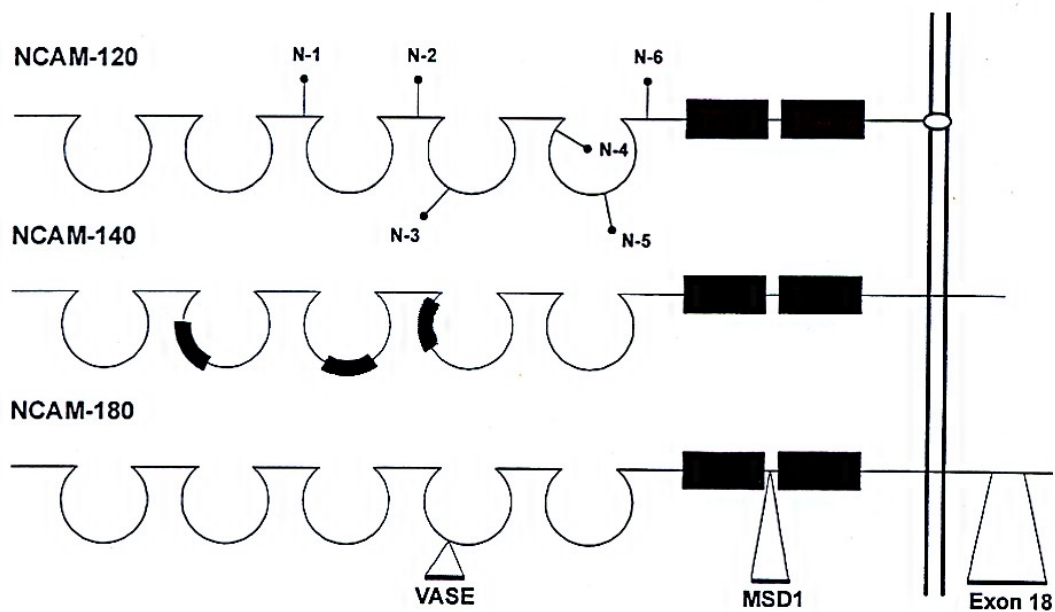


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM. Von oben nach unten sind die drei Hauptisoformen von NCAM mit den apparenten Molekulargewichten von 120, 140 und 180 gezeigt. Die Halbkreise stellen die Ig-ähnlichen Domänen dar, die Rechtecke symbolisieren die Fibronectin Typ III-homologen Domänen. NCAM 120 ist über GPI in der Zellmembran verankert. Die sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen von NCAM (N-1 bis N-6) sind im oberen Teil der Abbildung durch Antennen markiert. Im Mittelteil der Abbildung sind verschiedene Abschnitte von NCAM hervorgehoben, die als Bindungsstellen fungieren (von links nach rechts: Heparin-, NCAM (homophil)-, Oligomannosid-Bindungsstelle). Im unteren Teil sind die alternativen Spleißvarianten angedeutet. In der 4. Ig-Domäne ist das durch VASE-Exon kodierte Peptid lokalisiert. Das durch das MSD-Exon kodierte Peptid befindet sich zwischen den beiden Fibronectin-homologen Domänen und das durch das Exon 18 kodierte Peptid ist in der zytoplasmatischen Domäne aller NCAM-Isoformen enthalten.

Eine besondere Eigenschaft, die Insertion der 10 Aminosäuren des VASE-Exons, weist die 4. Ig-ähnliche Domäne auf. Das VASE-Exon wird entwicklungspezifisch exprimiert. Es tritt im embryonalen bzw. frühpostnatalen Stadium nicht auf. Im Laufe der Entwicklung zum adulten Organismus kann hingegen eine Zunahme VASE positiver NCAM-Moleküle im olfaktorischen System und Hippocampus festgestellt werden (Walsh et al., 1992), jedoch nicht in Gehirnarealen mit hoher Plastizität (Small et al., 1988), was darauf hindeutet, dass die VASE-Expression reziprok zur Expression von Polysialinsäure (PSA) exprimiert wird (Doherty et al., 1995). PSA ist ein negativ geladenes Kohlenhydrat, das aus bis zu 40 Einheiten von α -2,8-glykosidisch verknüpften Sialinsäuren besteht. PSA ist an komplexe N-Glykane an zwei Konsensussequenzen für N-Glykane in der 5. Ig-ähnlichen Domäne von NCAM

gebunden (Chiedtke et al., 2001). Rothbard et al. (1982) konnten zeigen, dass der PSA-Anteil bei NCAM aus Hühnerembryonen bis zu 30% und bei NCAM aus adulten Tieren bis zu 10% des apparenten Molekulargewichts ausmacht. Die minimale strukturelle Voraussetzung für die Bindung von Polysialinsäuren ist die Existenz der 4. und 5. Ig-ähnlichen Domäne sowie der ersten Fibronectin Typ III-homologen Domäne. Durch seine stark negative Ladung und dadurch bedingte Hydrathülle sorgt PSA für eine wirkungsvolle Abstoßung. Zwei NCAM-Moleküle können aufgrund dieses repulsiven Effektes schlechter durch trans-Interaktionen miteinander assoziieren. Es wurde gezeigt, dass ihre homophile Interaktion um den Faktor 4 verringert ist (Hoffmann und Edelmann, 1983; Edelmann, 1988). Die dadurch bedingte verminderte Adhäsion zwischen Zellen begünstigt Prozesse wie Zellwanderung und Neuritenwachstum und ist für sowohl morphogenetische Prozesse während der Entwicklung des Nervensystems als auch für die Erhaltung der synaptischen Plastizität im adulten Gehirn. Die PSA-Expression korreliert daher mit der Beendigung dieser Prozesse, wodurch homophile und heterophile Interaktionen von NCAM möglich werden (Zhang et al., 1992).

1.2.1.2. Interaktionen von NCAM und NCAM-vermittelte Signaltransduktionswege

Die homophile NCAM/NCAM trans-Interaktion

NCAM besitzt homophile und heterophile Bindungseigenschaften. Die extrazelluläre Domäne von NCAM kann mit einem auf einer benachbarten Zelle gelegenen NCAM-Molekül eine homophile trans-Interaktion eingehen (Hoffmann und Edelmann, 1983). Ranheim et al. (1996) konnten zeigen, dass alle fünf Ig-Domänen in einer antiparallelen Interaktion involviert sind. Kiselyov et al. (1997) fanden dagegen heraus, dass die 1. Ig-Domäne an die 2. bindet. Die letztgenannten Interaktionen konnten Jensen et al. (1999) mittels Computer-Simulationen darlegen. Bereits 1993 konnten Rao et al. die homophile Interaktion der 3. Ig-ähnlichen Domänen zeigen.

Die Stärke einer solchen Bindung hängt allerdings stark von der PSA-Modifikation der jeweiligen Moleküle ab.

Die Kohlenhydrat-abhängige L1/NCAM cis-Interaktion

Die beiden neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM kommen innerhalb der Zellmembran co-lokalisiert vor, und zwar primär an Kontaktstellen zwischen Neuronen (Pollerberg et al., 1987; 1990). Kadmon et al. (1990a) konnten zeigen, dass L1 und NCAM auf der Zelloberfläche eine cis-Interaktion eingehen. Diese hat verstärkte trans-Interaktionen zur Folge im Vergleich zur L1-L1-Interaktion. Diesen Bindungsmechanismus bezeichnet man auch als „assisted homophilic binding“.

Die L1/NCAM cis-Interaktion wird durch Kohlenhydrate vermittelt (Kadmon et al., 1990b). Des Weiteren konnten Horstkorte et al. (1993) zeigen, dass die von L1 exprimierten oligomannosidischen Kohlenhydrate für eine Lektin-ähnliche Bindung an NCAM verantwortlich sind. Vermutlich ist die oligomannosidische Kohlenhydrate bindende Region von NCAM in der 4. Ig-ähnlichen Domäne lokalisiert. So konnten beispielsweise Horstkorte et al. (1993) zeigen, dass ein synthetisch hergestelltes Peptid, welches in seiner Sequenz einen spezifischen Ausschnitt der 4. Ig-ähnlichen Domäne von NCAM darstellt, die L1/NCAM cis-Interaktion inhibieren kann.

Die L1/NCAM cis-Interaktion ist für das basale Neuritenwachstum von Bedeutung. Unter dem basalen Neuritenwachstum versteht man die Ausbildung und Elongation von Neuriten auf einem inerten Substrat wie PLL in Abwesenheit stimulierender Agentien. Stimuliertes Neuritenwachstum findet hingegen in Gegenwart von z.B. Extrazellulärmatrixproteinen wie Laminin statt oder wird durch homo- oder heterophile trans-Interaktionen bestimmter Zelloberflächenproteine vermittelt. Horstkorte et al. (1993) konnten zeigen, dass in Gegenwart von oligomannosidischen Kohlenhydraten oder des o.g. synthetischen Peptids aus der 4. Ig-ähnlichen Domäne von NCAM das Neuritenwachstum von auf Poly-L-Lysin kultivierten Kleinhirnneuronen drastisch reduziert ist. Kontroll-Glykokonjugate sowie Kontroll-Peptide inhibieren das Neuritenwachstum dagegen nicht.

Die Komplexität des Bindungsmechanismus zwischen L1 und NCAM wird in Abb. 3 dargestellt.

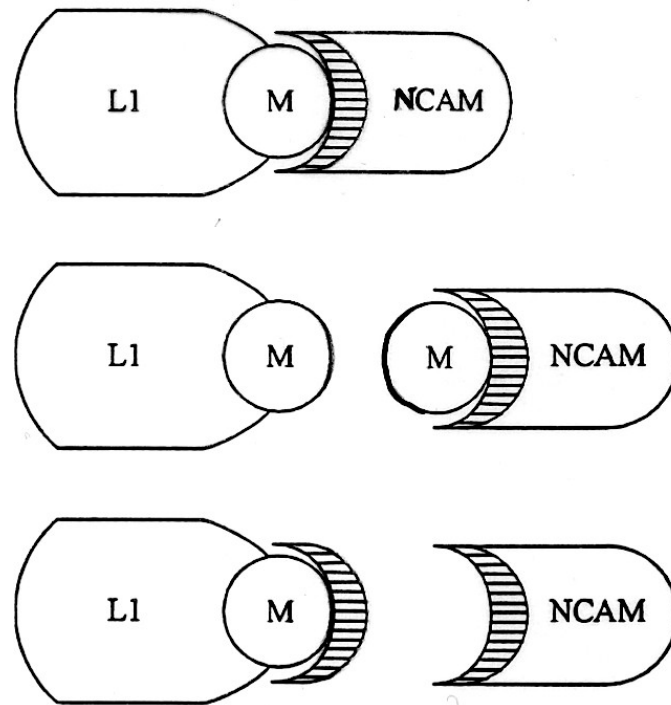


Abb. 3: Schematisches Modell der L1/NCAM cis-Interaktion. Oligomannosidische Kohlenhydrate (M) sind durch einen Kreis, die Kohlenhydrat-bindende Region von NCAM durch eine schraffierte Sichel dargestellt. L1 exprimiert oligomannosidische Kohlenhydrate, die an die 4. Ig-ähnliche Domäne von NCAM binden. Die L1/NCAM Interaktion kann kompetitiv durch ein synthetisches Peptid aus der Kohlenhydrat-bindenden Domäne von NCAM gestört werden.

Die Rolle des Rezeptors für den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGFR) in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion

Der FGFR ist im sich entwickelten Nervensystem weit verbreitet. Seine Aktivierung stimuliert in primären Neuronen und in PC12 Zellen das Neuritenwachstum (Williams et al., 1994). Die Funktion des FGFR bei der NCAM-vermittelten Signaltransduktion konnte bisher in zahlreichen Studien gezeigt werden. Williams et al (1994), Meiri et al (1998) und Kolkova et al. (2000) konnten zeigen, dass FGFR-Antikörper das NCAM-induzierte Neuritenwachstum inhibieren, vermutlich indem sie mit NCAM um die vorhandenen FGFR-Bindungsstellen kompetieren. Allerdings konnte bis heute nicht bewiesen werden, dass NCAM tatsächlich mit dem FGFR interagiert. Bereits 1992 konnten Saffel et al. zeigen, dass der Anstieg von intrazellulärem Ca^{2+} das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in PC12 Zellen induziert. 1997 stellten Saffel et al. fest, dass die Inkubation von PC12 Zellen mit einem zellpermeablen Protein, welches in seiner Struktur der Bindungsstelle des FCFR für die $PLC\gamma$ entsprach, das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum inhibierte. Desweiteren konnte die Inkubation mit Arachidonsäure (AA) das durch eine dominant negative Form des FGFR blockierte Neuritenwachstum wiederherstellen. Die Autoren nehmen daher an, dass der FGFR die Phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$) aktiviert. Dies bewirkt die Bildung von Diazylglycerol (DAG). Durch die nachfolgende Aktivierung der DAG-Lipase wird aus DAG AA freigesetzt. Als Folge kann ein Anstieg von intrazellulären Ca^{2+} beobachtet werden, da AA durch Binden an ladungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle den Einstrom von Ca^{2+} stimuliert. Dass der o.g. Signaltransduktionsweg in einem gesteigerten Neuritenwachstum führt, konnten Doherty et al. (1996) und Ronn et al. (2000) nachweisen.

Die Bedeutung der mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) für die NCAM vermittelte Signaltransduktion

Außer der NCAM-vermittelten Signaltransduktion via FGFR- $PLC\gamma$ -DAG-AA kann NCAM die MAPK-Kaskade aktivieren. An dem NCAM140-vermittelten Neuritenwachstum ist die zur Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehörende

Kinase p59fyn beteiligt. P59fyn interagiert mit NCAM140 in der Plasmamembran neuronaler Zellen, nicht aber mit NCAM180 oder NCAM120 (Beggs et al., 1997). Diese Interaktion induziert die Rekrutierung und transiente Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (p125fak) (Beggs et al., 1997). Schmid et al. (1999) konnten zeigen, dass Antikörper-vermitteltes Vernetzen von NCAM140 auf der Oberfläche neuronaler Zellen zur Aktivierung von c-RAS1, MEK und anschließend zur Phosphorylierung der MAP Kinasen ERK1 und ERK2 führt. Dieser Signaltransduktionsweg (siehe Abb.) konnten Kolkova et al. (2000) bestätigen. Sie konnten zeigen, dass das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum in PC12 Zellen von der Aktivierung von p59fyn, p125fak, ras und MAPK abhängig ist. Die Wirkungsweise der MAPK auf das Neuritenwachstum kann zum einen über die Aktivierung zytoplasmatischer oder membranassoziierter Zielproteine laufen, die ihrerseits Signaltransduktionsprozesse aktivieren, zum anderen besteht die Möglichkeit der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits zur Expression von Proteinen führt, welche am Neuritenwachstum beteiligt sind. So konnten Schmid et al. (1999) zeigen, dass Antikörper-vermittelte Vernetzung von NCAM140 auf der Oberfläche neuronaler Zellen die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 und im weiteren Verlauf die Phosphorylierung von CREB an Serin 133 induziert. Jessen et al. (2001) konnten zeigen, dass sowohl CREB als auch der Transkriptionsfaktor c-FOS notwendig für das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum in PC12 Zellen sind und dass weder CREB noch c-FOS die Inaktivierung des jeweils anderen Transkriptionsfaktors kompensieren können.

NCAM-induzierte Aktivierung von NF κ B

Der Transkriptionsfaktor NF κ B wurde erstmalig in der Rolle als Aktivator der Transkription der leichten Kette des Immunglobulins κ in B-Lymphozyten entdeckt (Sen et Baltimore, 1986). Er ist ein aus p50 und p65 Untereinheiten bestehendes Heterodimer und ist normalerweise im Zytoplasma an eine dritte Untereinheit I κ B gebunden, welche das Protein durch Maskierung des nukleären Lokalisationssignals in seiner inaktiven Form hält. NF κ B kann durch verschiedene Zytokine, neurotrophe Faktoren und nach verschiedenen Formen von Stress aktiviert werden (siehe Review

Baeuerle et Baltimore, 1996). Diese Faktoren stimulieren die Phosphorylierung und anschließende Degradation von I κ B, wodurch die Translokation von NF κ B in den Kern ermöglicht wird. May und Ghosh (1999) konnten zeigen, dass NF κ B eine Rolle bei der Regulation der Expression anti-apoptotischer Gene spielt und so das Überleben von Zellen fördert. Desweiteren schreiben Middleton et al. (2000) NF κ B eine Bedeutung für die Lebensfähigkeit von Neuronen zu. Little et al (2001) konnten zum einen zeigen, dass die Inkubation von Astrozyten mit löslichem NCAM, d.h. NCAM-NCAM trans-Interaktionen, zur Degradation von I κ B und nachfolgend gesteigerter NF- κ B gesteuerter Transkription führt. Zum anderen identifizierten sie eine kurze Sequenz in der zytoplasmatischen Domäne von NCAM, die notwendig für die NCAM-induzierte NF κ B Aktivierung zu sein scheint.

Die Rolle von Proteinkinase C (PKC) und Proteinkinase A (PKA) im NCAM-stimulierten Neuritenwachstum

Die NCAM-vermittelte Signaltransduktion scheint durch die Aktivierung zweier verschiedener Wege charakterisiert zu sein, zum einen durch Aktivierung des FGFR-abhängigen Signalwegs, zum anderen durch Aktivierung fyn-fak-ras-Pathways. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, dass beide Signaltransduktionswege in die Aktivierung von MEK münden. So konnte in PC12 Zellen gezeigt werden, dass sowohl durch den Einsatz von FGFR-Inhibitoren als auch durch den Einsatz von fyn-Inhibitoren bzw. von dominant negativen Formen der fak oder von ras das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum inhibiert wird und dass die Überexpression der MEK diesen Effekt wieder rückgängig macht (Kolkova et al., 2000). Ein mögliches Verbindungsglied zwischen beiden Wegen der NCAM-vermittelten Signaltransduktion ist durch die PKC gegeben. Die Verknüpfung beider Signaltransduktionswege wird durch folgende Ergebnisse gestützt: Kolkova et al. (2000) konnten zum einen zeigen, dass die Behandlung von PC12 Zellen mit dem spezifischen PKC-inhibitor Calphostin C zur Inhibierung des NCAM-stimulierten Neuritenwachstums führte, dass zum anderen die Stimulierung der PKC durch PMA das Neuritenwachstum stimuliert. Des weiteren konnte die Stimulierung der PKA mit PMA die Hemmung des Neuritenwachstums durch den Einsatz der Inhibitoren des

FGFR, von fyn und fak und der PLC γ wieder rückgängig machen, aber nicht wenn die MEK inhibiert wurde. Die Autoren schlussfolgern daher, dass die PKC als Regulator des NCAM-stimulierten Neuritenwachstums fungiert und dass die PKC möglicherweise die beiden oben genannten Arme der Signaltransduktion stromaufwärts von MEK verbindet.

Jessen et al. (2001) konnten zeigen, dass die Inkubation von PC12 Zellen, die auf NCAM-exprimierenden Fibroblasten ausplattiert wurden, mit einem spezifischen PKA-Inhibitor das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum hemmt, was auf eine mögliche Beteiligung der PKA hinweist. Die Rolle der PKA als Aktivator des zuvor beschriebenen Transkriptionsfaktors CREB ist bekannt. (Mayr et al., 2001). Aktivierung der PKA mit cAMP löst die Translokation der aktiven Untereinheiten der PKA in den Zellkern aus, wo sie CREB an Ser133 phosphoryliert.

In Abb. 4 werden die verschiedenen NCAM-vermittelten Signaltransduktionswege anhand eines schematischen Modells dargestellt:

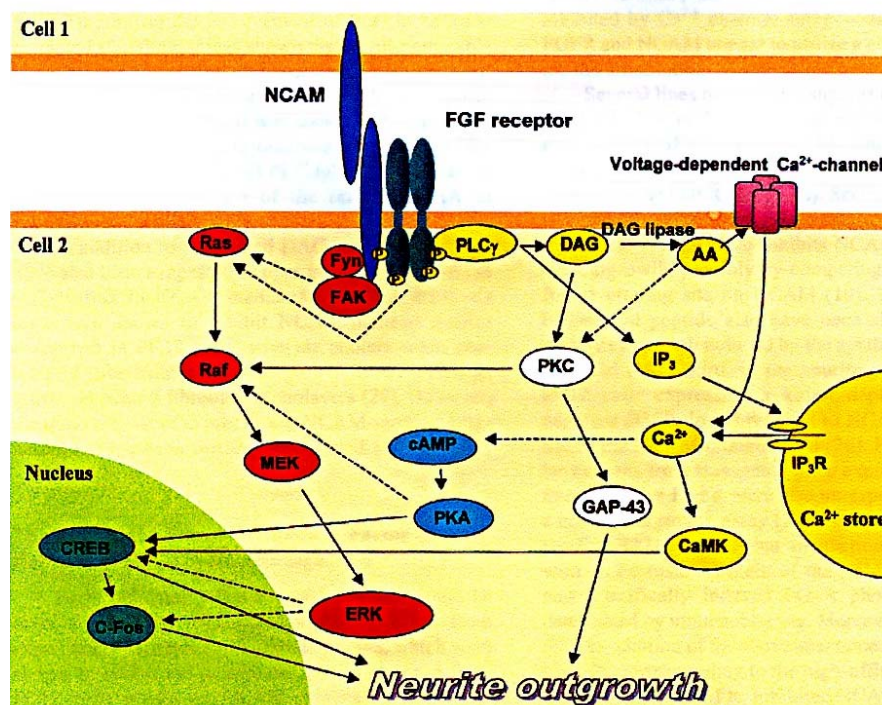


Abb. 4: Modell der NCAM-vermittelten Signaltransduktion (Povlsen et al., 2003). NCAM (neural cell adhesion molecule); FGF (fibroblast growth factor); PLC (phospholipase C); DAG (diacyl glycerol); AA (arachidonic acid); CaMK (Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase); cAMP (cyclic adenosine monophosphate); PKA (protein kinase A); PKC (protein kinase C); GAP-43 (growth-associated protein 43); FAK (focal adhesion kinase).

Trotz der in zahlreichen in vitro Versuchen nachgewiesenen funktionellen Bedeutung von NCAM sind NCAM-knock-out-Mäuse, bei denen entweder alle drei Hauptisoformen oder nur NCAM180 deletiert wurde, lebens- und fortpflanzungsfähig (Cremer et al., 1994). Der Phänotyp zeigt lediglich eine um 10% reduzierte Hirnmasse und ein an Größe über 30% reduziertes olfaktorisches System. Das bedeutet, dass im wesentlichen Regionen hoher Plastizität betroffen sind, die auch im adulten Stadium polysialysiertes NCAM exprimieren (Muller et al., 1996). Charakteristika dieser Mäuse sind eine auffällige Antriebslosigkeit und deutlich verminderte Lernfähigkeit. Diese Symptome korrelieren mit dem Fehlen von polysialysiertem NCAM im Hippocampus und im olfaktorischen System und scheinen primär durch das Fehlen von PSA charakterisiert zu sein. Ansonsten verfügen redundante Proteine wie z.B. das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül (OCAM) über das Potential, das Fehlen der NCAM-Isoformen zu kompensieren (Hu et al., 1996; Muller et al., 1996).

1.2.1.3. Clathrin-abhängige Endozytose von NCAM

Die Clathrin-abhängige Endozytose ist ein wichtiger Prozess, der zum einen der Regenerierung von Rezeptoren durch Recycling, zum anderen der Regulation der Dichte von Zelloberflächenglykoproteinen dient (Goldstein et al., 1985). Im Verlaufe der Bildung von Clathrin-coated pits bildet sich zwischen der faserigen Clathrinhülle und der Membran ein 20 nm breiter Zwischenraum, der Vernetzungspartikel enthält. Man kennt drei Arten von Vernetzungspartikeln - AP-1, AP-2, AP-3 - , die sich jeweils aus vier unterschiedlichen, jedoch verwandten Adaptorproteinen zusammensetzen (Chang et al., 1993). Der Adaptor Komplex AP-2 besteht aus zwei großen Ketten (α oder β Untereinheit), einer mittleren μ Untereinheit und einer kurzen σ Untereinheit (Pearse und Robinson, 1990). Die Interaktion zwischen AP-2 und den in der zytosolischen Domäne von Membranproteinen gelegenen Internalisierungssignalen, die Tyrosin-reiche Sequenzen und Dileucin-Motive enthalten, wird als Mechanismus für die selektive Erkennung durch die coated pits erachtet (Mellman, 1996).

Minana et al (2001) konnten an Astrozyten zeigen, dass NCAM sowohl mit Clathrin als auch mit α -Adaptin, einer Untereinheit des AP-2 Komplexes, colokalisiert ist. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch NCAM mittels Clathrin-abhängiger Endozytose internalisiert wird.

Es wurde bisher für die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und apCAM gezeigt, dass ihre Zelloberflächenexpression durch Endozytose kontrolliert wird. Für L1 wurde gezeigt, dass Clathrin-abhängige Endozytose eine Signaltransduktion auslöst, welche zur Aktivierung der MAPKinase und damit zu nachfolgenden Prozessen führt, die zur Stimulierung des Neuritenwachstums mittels ähnlicher Mechanismen wie für NCAM beschrieben beitragen (Schmid et al., 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass nach Endozytose von L1 L1 wieder in die Lamellopodien des aktiven Wachstumskegels eingebaut wird, ein Prozess, der ebenfalls essentiell für L1-stimuliertes Neuritenwachstum ist (Schäfer et al., 1999).

ApCAM ist ein neuronales Zelladhäsionsmolekül, das im Nervensystem der Meeresschnecke *Aplysia* exprimiert ist und das große Homologien zu NCAM aufweist. Besonders auffällig ist, dass NCAM genauso wie apCAM eine PEST Sequenz besitzt (Mayford et al., 1992). PEST Sequenzen sind reich an Serin, Prolin, Threonin- und Glutaminsäure und kommen häufig in Proteinen mit kurzen

Halbwertszeiten vor. Sie scheinen auch Signale zur Internalisierung und Degradation eines Proteins zu sein (Rechsteiner et Rogers, 1996).

Bailey et al. (1997) konnten zeigen, dass die Deletion sowohl der gesamten PEST Sequenz als auch der Austausch eines der beiden in der PEST Sequenz befindlichen Threonine, das durch die MAPK phosphoryliert werden kann, durch ein Alanin die Serotonin-stimulierte Endozytose von apCAM verhinderte. Der Mechanismus der Endozytose von apCAM wird in Abb. 5 schematisch dargestellt.

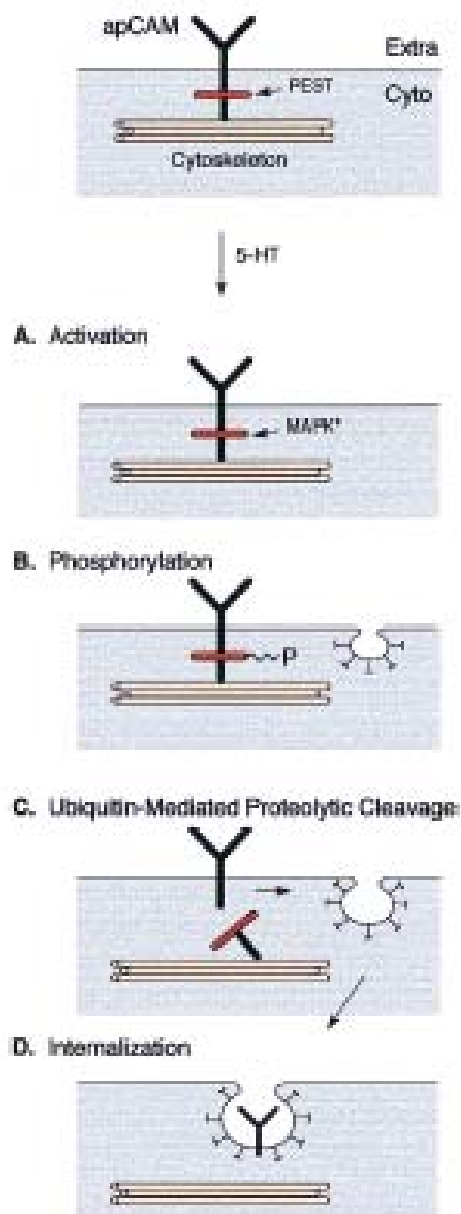


Figure 6. Schematic Model of Molecular Steps Underlying the 5-HT-Induced Internalization of apCAM

Abb. 5: Modell der Serotonin-induzierten Internalisierung von apCAM (Bailey et al., 1997).

Wiederholte oder anhaltende Applikation von Serotonin führt zur Aktivierung der MAPK und daraus resultierender Phosphorylierung des zytoplasmatischen Bereichs von apCAM. Diese Phosphorylierung scheint die Konformation der intrazellulären Domäne von apCAM zu verändern und zur anschließenden Degradation und Clathrin-abhängigen Endozytose zu führen.

1.3. Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erörtert werden, ob in Anlehnung an die unter Kapitel 1.2.3. beschriebene Arbeit von Bailey et al. (1997), ob die der PEST Sequenz von apCAM in *Aplysia* stark ähnelnde, im cytoplasmatischen Teil gelegene Sequenz von humanem NCAM140 für seine Endozytose in NCAM negativen B35 Neuroblastomzellen von Bedeutung ist und ob das innerhalb der PEST Sequenz befindliche Threonin (T781) als potentielles Phosphorylierungsziel durch die MAPK die Endozytose initialisiert.

Des weiteren sollte untersucht werden, ob die Endozytose von NCAM140 bzw. die Inhibierung der Endozytose von NCAM140 durch Deletion der PEST Sequenz oder Mutation des phosphorylierbaren Threonin-Rests innerhalb der PEST Sequenz Einfluss auf das Neuritenwachstum und die CREB-Aktivierung hat.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Vektoren

pcDNA3 Invitrogen, Karlsruhe

pGEM[®]-T Easy Promega, Mannheim

pNKS2 Transkriptionsvektor, beschrieben von Reinhardt-Maelicke et al., 1993

2.1.2. Primäre Antikörper

123C3: Humanspezifischer monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes NCAM, Aliquots mit Glycerin im Verhältnis 1:1 (v/v), Antikörperkonzentration: 4,5 µg/µl, Hybridoma-Zelllinie zur Verfügung gestellt von R. Michalides, Amsterdam

anti-L1: polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen murines L1 (anti-L1 pAK, Rathjen und Schachner, 1984), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Schachner (Zentrum für molekulare Neurobiologie, Hamburg)

anti-CREB, human: polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanspezifisches CREB, Fa. Calbiochem, Bad Soden

anti-P-CREB, human: polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen humanspezifisches, an Serin 133 phosphoryliertes CREB, Fa. Calbiochem, Bad Soden

anti-P-Threonin: polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes Threonin, Fa. Cell Signaling TechnologyTM, Frankfurt am Main

2.1.3. Sekundäre Antikörper

Die aufgeführten Antikörper wurden von der Fa. Dianova (Hamburg) bezogen.

anti-Maus-POD: polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen Maus-Antikörper der Subklassen IgG und IgM gerichtet, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase

anti-Ratten-POD: polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen Ratten-Antikörper der Subklassen IgG und IgM gerichtet, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase

anti-Kaninchen-POD: polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen-Antikörper der Subklassen IgG und IgM gerichtet, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase

anti-Maus-Cy3: polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen Maus-Antikörper der Subklasse IgG gerichtet, konjugiert an Indocarbocyanin

anti-Maus-DTAF: polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen Maus-Antikörper der Subklasse IgG gerichtet, konjugiert an Dichlorotriazinylamino-Fluorescein

2.1.4. Enzyme

Endoglukosidase H (Roche, Mannheim)

N-Glukosidase F: PNGaseF (Roche, Mannheim)

Trypsin (Sigma, Deisenhofen)

Streptavidin-Peroxidase (Roche, Mannheim)

2.1.5. Inhibitoren

MEK Inhibitor: U0126 (Promega, Mannheim)

2.1.6. Allgemeine Geräte

Elektrophoresensystem zur Proteinauftrennung:

Mini-Protean II (Bio-Rad, München)

Protean II (Bio-Rad, München)

Power Pac 200 (Bio-Rad, München) als Spannungsquelle

Elektrophoresensystem zur Nucleinsäureaufrennung:

200/2.0 Power Supply (Bio-Rad, München) als Spannungsquelle

Microinjector (Drummond, Nanoject, Bachhofer, Reutlingen)

Micromanipulator (Brinkmann, Mannheim)

31/2 Mikrokapillare (Drummond, USA)

Mikroskope:

TCS SP2 Laser Scanning Spectral Confocal Microscope (Leica, Bensheim)

Inverses Mikroskop Axiovert 200 M (Zeiss, Aachen)

Titertek Plus MS2 ELISA Reader (ICN, USA)

Trans Blot SD (Semi-Dry Transfer cell) (Bio-Rad, München)

UV-Transluminator (2011 Macrovue, LKB, Schweden)

Zentrifugen:

Biofuge 15R, Rotor 3751 (Heraeus, Osterode)

2K15 Zentrifuge, Rotor 12145 (Sigma, Deisenhofen)

Laborzentrifuge 2K15, Rotor 12145 (Sigma, Deisenhofen)

202 MK Zentrifuge, Rotortyp 12145 (Sigma, Deisenhofen)

2.1.7. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, rund, 15 mm Durchmesser (Menzel, Braunschweig)

Falcon 3912 Mikrotiterplatten (Becton-Dickinson, USA)

Filterpapier (3MM, Whatmann, Maldstone GB)

Kryogefäße, 1 ml (Grainer)

Maxi Sorb Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden)

Mikroreaktionsgefäße (Sigma, Deisenhofen)

Neubauer Zählkammer (Brand, Wertheim)

Nitrocellulose-Membran (Satorius, Göttingen)

Petrischalen, 35 mm und 100 mm Durchmesser (Corning, New York, USA)

Pipettenspitzen, diverse (Sarstedt, Nümbrecht)

Polyethylengefäße (Packard, USA)

Röntgenfilme X-OMAT AR (Eastman-Kodak, München)

Säulen zur Antikörperaufreinigung (Alltech, München)

Zellkulturflaschen, T 40 und T 75 (Sarstedt, Nümbrecht)

Zentrifugenröhrchen (Falcon®, Becton-Dickinson, Plymouth, GB)

2.1.8. Lösungen und Puffer

Häufig verwendete Stammlösungen:

Aprotinin/Leupeptin-	10 mg/ml	Aprotinin (Roche/Mannheim)
Stammlösung (10000fach):	10 mg/ml	Leupeptin (Sigma, Deisenhofen)
HEPES:	200 mM	HEPES (Na-Salz) (Merck, Darmstadt) pH 7,4
PBS:	137 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	16 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,2-7,4

Pepstatin-Stammlösung: 1 mg/ml Pepstatin (Roche/Mannheim)
in Methanol

PMSF-Stammlösung: 1 mM PMSF (Sigma/ Deisenhofen)
in Isopropylalkohol

TBS: 25 mM Tris-HCl
135 mM NaCl
25 mM KCl
pH 7,5

Häufig verwendete Lösungen für molekularbiologische Arbeiten:

LB-Medium: 1% (w/v) Trypton (Gibco, Karlsruhe)
(Luria-Bertani) 0,5% (w/v) NaCl
0,5% (w/v) Hefeextrakt (Difco, Detroit, USA)
Ampicillin (100 µg/ml) (Sigma, Deisenhofen)
pH 7,0

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat
1 mM EDTA (Boehringer, Mannheim)
pH 8,0

TE-Puffer: 10 mM Tris (Serva, Heidelberg)
1 mM EDTA (Roche, Mannheim)
pH 7,4

Häufig verwendete Lösungen und Puffer für Oozytenarbeiten:

Original Ringer (Ori)
(Ca²⁺/Mg²⁺ frei):

- 90 mM NaCl
- 1 mM KCl
- 5 mM HEPES (Serva, Heidelberg)
- 70 mg/ml Gentamycin (Gibco, Karlsruhe)
- pH 7,4

Ori:

- Ori (Ca²⁺/Mg²⁺ frei)
- 1 mM CaCl₂ x 2H₂O
- 1 mM MgCl₂ x 6H₂O
- pH 7,4

Solubilisierungspuffer:

- 100 mM NaCl
- 20 mM Tris
- 4 mM EDTA (Boehringer, Mannheim)
- 4 mM EGTA
- 1 mM PMSF
- 0,5% Triton X 100 (Sigma, Deisenhofen)
- pH 7,4

Häufig verwendete Lösungen für Zellkulturarbeiten:

HBSS⁻, Ca²⁺ und Mg²⁺ frei:

- 5,4 mM KCl
- 0,4 mM KH₂PO₄
- 136,9 mM NaCl
- 4,2 mM NaHCO₃
- 0,3 mM Na₂HPO₄ x H₂O
- 5,5 mM D-Glucose (Serva, Heidelberg)

0,03 mM Phenolrot
pH 7,2

PLL: 0,02% Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma, Deisenhofen)

Trypsin/HBSS: 0,125% Trypsin (w/v) (Roche, Mannheim)

Kulturmedium für B35 Zellen: DMEM H (Sigma, Deisenhofen)
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Sigma, Deisenhofen)
10% (v/v) FCS (Sigma, Deisenhofen)
0,2% (w/v) Geneticin 418 (ICN, Eschwege) bei stabil transfizierten Zellen
OptiMem Plus (Gibco, Karlsruhe)

Ripa-Lysis-Puffer zur Aufbereitung von Zelloberflächenmolekülen:

50 mM Tris
1% (w/v) NP-40
5 mM Deoxycholat
150 mM NaCl
1 mM NaF
1 mM Na₃VO₄
1 mM EGTA
1 mg/ml Aprotinin
1 mg/ml Leupeptin
1 mg/ml Pepstatin
1 mM PMSF
pH 7,2

Für den Nachweis von O-GlucNAc:

100 mM N-Acetylglucosamin

Lysis-Puffer zur Aufbereitung von Zellkernproteinen:

1% (w/v) NP40
0,25% (w/v) Na-Deoxycholat
50 mM Hepes
137 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM NaF
1 mM Na₃VO₄
10 mM p-Nitrophenylphosphat
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
1 mg/ml Aprotinin
1 mg/ml Leupeptin
1 mg/ml Pepstatin
1 mM PMSF
2 μM Caliculin A (Calbiochem, Bad Soden)
10% (v/v) Glycerin (Merck, Darmstadt)
pH 7,4

Häufig verwendete Lösungen für proteinchemische Methoden:

Fixierlösung für SDS-Gele: 25% Isopropanol
10% Essigsäure

Coomassie-Lösung: 0,25% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, Heidelberg)

Entfärber-Lösung: 25% Methanol
7% Essigsäure

Acrylamid-Stammlösung: 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid

APS-Lösung: 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (Pharmacia,
München)

TEMED (Pharmacia, Freiburg)

Probenpuffer (5fach): 250 mM Tris-HCl
7,5% (w/v) SDS
30% (w/v) Glyzerin
25% (w/v) Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
1% (v/v) β -Mercaptoethanol
(Sigma, Deisenhofen)
pH 6,8

ProteinAssayDC Kit (Bio-Rad, München)

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
pH 8,3

Anodenpuffer I: 300 mM Tris
20% (v/v) Methanol
pH 10,4

Anodenpuffer II: 25 mM Tris
20% (v/v) Methanol
pH 10,4

Kathodenpuffer: 25 mM Tris
40 mM Amino-n-capronsäure (Sigma, Deisenhofen)
20% (v/v) Methanol
pH 9,4

Ponceau S-Lösung: 0,2% (w/v) Ponceau-S (Serva, Heidelberg)
3% (v/v) Trichloressigsäure

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a. Qualität von Merck (Darmstadt) bezogen; die Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt, sofern nicht anders beschrieben.

2.1.9. Radioaktiv markierte Verbindungen

³⁵S-L-Methionin (ICN, Eschwege)

2.1.10. Tiere aus institutseigener Haltung

Xenopus Oozyten wurden aus dem südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) gewonnen.

Für die Präparation von Kleinhirnneuronen wurden NMRI Mäuse verwendet.

2.1.11. Zellen

B35 (NCAM negativ): Ratten-Neuroblastomzellen (wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Patricia Maness, Department of Biochemistry, School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill zur Verfügung gestellt)

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Allgemeines

Für die molekularbiologischen Arbeiten wird der *E. coli*-Stamm *DH5 α* verwendet, der gemäß der Gentechnik-Verordnung in die Gefahrenklasse S1 eingeordnet ist. Die Bakterienamplifikationen erfolgen über Nacht bei einer Temperatur von 37°C. Flüssigkulturen werden mit einer Frequenz von 200 rpm geschüttelt. Für die Selektion transformierter Bakterien wird das LB-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 100 μ g/ml versetzt.

2.2.2. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien werden 50 ml LB-Medium mit 2 ml einer *DH5 α* -Flüssigkultur beimpft und bis zu einer Absorption von 0,5 amplifiziert. Ist die entsprechende Bakteriendichte erreicht, wird das Wachstum durch eine 30minütige Kühlung auf Eis unterbunden. Anschließend werden die Bakterien 10 min bei 500•g zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das entstandene Pellet in 30 ml einer eiskalten 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis werden die Bakterien erneut durch Zentrifugation pelletiert und in 2 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die nun transformationskompetenten Bakterien sind auf Eis maximal 4 Tage lagerfähig.

2.2.3. Transformation kompetenter Bakterien

Zunächst werden 100 µl kompetenter Bakterien mit 10 ng bzw. 2 µl eines Ligationsansatzes vorsichtig gemischt und auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Ansatz im Wasserbad bei 42°C 90 sec lang erwärmt und sofort auf Eis für 2 min abgekühlt. 400 µl eines vorgewärmten LB-Mediums werden nun zum Transformationsansatz pipettiert und für 30 min bei 37°C auf einem Schüttelinkubator bei 200 rpm inkubiert. Dadurch werden Bakterienwachstum angeregt und die Transkription des Resistenzgens induziert. Nach Ende der Inkubationszeit werden 100 µl des Transformationsansatzes auf einer ampicillinhaltigen Selektions-LB-Agarplatte mit Hilfe eines Drigalsky-Spatels ausgestrichen. Die Agarplatte wird dann bei 37°C über Nacht inkubiert

2.2.4. Anlegen einer E. coli Flüssigkultur

Mit Hilfe einer abgeflämmten Impföse wird ein einzelner Bakterienklon in 7 ml ampicillinhaltigen LB-Mediums überführt und bei 37°C und 200 rpm über Nacht kultiviert. Für die Gewinnung größerer Mengen an Bakterien werden 200 µl der angelegten Übernachtskultur in 100 ml ampicillinhaltigen LB-Mediums überführt und erneut über Nacht kultiviert.

2.2.5. Isolierung von bakterieller Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA basiert auf der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979). Das Spin-Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden) dient der Minipräparation, das NucleoBond-Kit (Macherey-Nagel, Düren) der Midipräparation. Die Handhabung erfolgt entsprechend der Herstelleranleitung.

2.2.6. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die Herstellung der Trennmatrix wird 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen) versetzt und anschließend zur Erstarrung zum Gel in eine Gießform gegossen. Vor dem Einfüllen in die Beladetaschen werden die DNA-Proben und der Standard (DNA-Ladder, MBI, St. Leon-Rot) mit 1/6 Vol. sechsfachen Probenpuffers (MBI, St. Leon-Rot) gemischt. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei einer Spannung von 70 – 100 Volt. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelhelixstruktur. Durch UV-Licht-Anregung bei einer Wellenlänge von 300 – 360 nm wird die DNA sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.7. Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente können mit Hilfe des QIAextraction-Kits (Fa. Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen eluiert werden. Der Anleitung des Herstellers entsprechend wird die das DNA-Fragment enthaltene Agarose aus dem Gesamtgel herausgeschnitten, aufgelöst und die DNA an eine Silika-Matrix gebunden. Die DNA wird mehrmals mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in TE-Puffer oder H₂O eluiert.

2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Typischer Verlauf einer PCR:			
1.	Denaturierung	95°C	5 min
2.	Denaturierung	95°C	30 sec
3.	Annealing	T _D - 2°C	30 sec
4.	Extension	72°C	1 min/1000 bp
5.	Extension	72°C	10 min

Die Annealing-Temperatur T_D wird nach der Formel $T_D = (A + T) \cdot 2 + (G + C) \cdot 4$ errechnet. Aufgrund von Optimierungsversuchen werden die Schritte 2 bis 4 16 bis 20 mal wiederholt.

PCR-Ansatz:	
dNTPs	200 μ M
5' Primer	200 nM
3' Primer	200 nM
Polymerase-Puffer	10 μ l
DNA-Template	10 - 50 ng
Polymerase	1 - 2 Units
Mit H ₂ O ad	50 - 100 μ l Endvolumen

2.2.9. Spaltung von DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen

1 – 5 μ g DNA werden mit 2 – 50 Units der entsprechenden Restriktionsendonukleasen XHO1 oder BAMH1 (MBI, St.Leon-ROT), 2 μ l eines 10fach konzentrierten Restriktionspuffers und H₂O in einem Reaktionsvolumen von 20 μ l für 2 h bei 37°C inkubiert. Dabei ist die Zusammensetzung des Restriktionspuffers auf das jeweilige Enzym abgestimmt und wird mit diesem von der entsprechenden Firma geliefert.

2.2.10. Bestimmung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Die photometrische Messung der Absorption bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm ermöglicht die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

(Sambrook et al., 1989). Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgt durch die folgende Formel:

$$C_{\text{DNA}} = E_{260} \cdot 50$$

$$C_{\text{DNA}} = E_{260} \cdot 40$$

Für eine ausreichende Reinheit soll der Quotient aus E_{260}/E_{280} zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.2.11. Präzipitation von DNA mittels Ethanol

DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen 100%-igen Ethanols versetzt und 60 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wird der Ansatz 10 min bei $13000 \cdot g$ und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

2.2.12. DNA-Sequenzierung

Primer zur Sequenzierung der NCAM cDNA:

5'CGC GGA TCC ATG CTG CAA ACT AAG GAT CTC 3'

5'CAT CTG GAA ACA CAA AGG CCG AGA TGT CAT 3'

5'GCT GAG TAC ATC TGC ATT GCT GAG AAC AAG 3'

5'CAG CTG CTG CCA AGC TCC AAT TAC AGC AAT 3'

5'GCA CCT AAG CTC GAA GGG CAG ATG GGA 3'

5'CCG CTC GAG TCA TGC TTT GC CTC GTT CTC 3'

Für die durch die Fa. MWG durchgeführten Sequenzierungen werden pro Reaktion $10 \mu\text{g}$ Ethanol-präzipitierte DNA benötigt. Die garantierte Basengenauigkeit liegt bei 99,5%.

Die Sequenzierungen werden außerdem mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer und den dafür benötigten ABI PRISM DNA Sequencing and Sizing Reagents der Fa. Applied Biosystems (Foster City, Ca, USA) durchgeführt.

DNA-Präparation und -Sequenzierung werden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 20 µl enthält bis zu 1 µg der zu sequenzierenden DNA, bis zu 5 pmol Primer, 4 µl BigDye-Mix mit entsprechender DNA-Polymerase und ddNTPs, 4 µl 2,5-fach Sample-Buffer und 1 µl DMSO. Nach Durchführung der PCR (Kapitel 2.2.8.) und anschließender Ethanol-Fällung (Kapitel 2.2.11.) wird das DNA-Pellet getrocknet, in 5 µl H₂O angelöst, mit 20 µl Sequenzierungspuffer versetzt und gut durchmischt. Vor dem Start des Sequenziergellaufs wird die Probe 10 min bei 60°C und 3 min bei 96°C inkubiert und auf Eis abgekühlt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der zu sequenzierenden DNA zu verhindern.

2.2.13. Ligation von DNA-Fragmenten

Zunächst werden die zu ligierenden DNA-Fragmente mithilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten (Kapitel 2.2.9.) und aufgereinigt. Dann werden sie in einem Verhältnis Vektor:Insert 1:5 in einem Reaktionsvolumen von 20 µl gemischt, zum Ready-to-Go-T₄-Ligation-Kit (Pharmacia, Freiburg) gegeben und über Nacht bei 13°C inkubiert.

2.2.14. Einbau von Schnittstellen ins NCAM140 Insert für Klonierungen in verschiedene Vektoren

Primer:

5'CGC GGA TCC ATG CTG CAA ACT AAG GAT CTC 3'

5'CCG CTC GAG TCA TGC TTT GCT CTC GTT CTC 3'

Um die NCAM140 in die Vektoren pNKS2 und pcDNA3 überführen zu können, werden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BAMHI* und *XHOI* in die cDNA eingebaut werden. Dies geschieht mittels PCR (2.2.8.), wobei die Primer die Schnittstellen für die oben genannten Restriktionsenzyme enthalten.

2.2.15. Erzeugung der NCAM140 Mutante δ PEST

Primer zur Deletion der PEST Sequenz:

5' TTT CCC TCC ATC ATG GTTT TGG 3'

5' AAG GGC CCC GTA GAG GCA AAG 3'

Die PEST Sequenz wird mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.2.8.) deletiert. Der zum 5'-3'-DNA-Strang komplementäre, mit 5'-Phosphat modifizierte Primer wird so gewählt, dass er der Basensequenz vor der zu deletierenden PEST-Sequenz entspricht. Der zum 3'-5'-Strang komplementäre Primer hingegen wird so gewählt, dass die Amplifizierung vor der PEST-Sequenz endet. Das Reaktionsprodukt der PCR trägt aufgrund der Verwendung 5'-Phosphat modifizierter Primer 5'-phosphorylierte Enden. Dadurch wird die anschließende Religation des Vektors (Kap. 2.2.13.) erheblich vereinfacht.

2.2.16. Mutagenese zur Erzeugung der NCAM 140 Mutante T781A

Primer zur Einführung der Punktmutation:

5' GGT CTC GTT GGG CTC TGT GTG 3'

5' ACG GAG CCC GAG AAG GGC CCC 3'

Die Erzeugung von Punktmutationen innerhalb eines DNA-Inserts in einem Vektor wird mit dem QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Im Verlaufe einer PCR wird das Plasmid zuerst denaturiert, um das Annealing der die gewünschte Mutation enthaltenden Primer und eine Vervielfältigung der so mutierten DNA zu gewährleisten. Im Anschluss an die PCR wird durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym DPNI methylierte, nicht mutierte

DNA abgebaut, sodass bei der anschließenden Transformation nur die die Mutation enthaltenden Plasmide von den Bakterien inkorporiert werden.

2.2.17. *in vitro* Transkription

Die cRNA-Synthese erfolgt entsprechend der Anleitung des verwendeten SP6-
<mMessageMMachine>Kits (Ambion, Huntingdon, Cambridge). Der Reaktionsansatz enthält 1 µg linearisierte Template-DNA, die Nukleotide ATP, GTP, CTP, UTP und m⁷G(5')ppp(5')G, einen RNase-Inhibitor, Reaktionspuffer und die SP6-RNA-Polymerase. Diese erzeugt innerhalb von 2 h bei 37°C circa 15 µg cRNA, von der 80% ein 5'-CAP tragen.

2.3. Proteinexpression in Xenopus Oozyten

2.3.1. Haltung von *Xenopus laevis*

Frösche der Gattung *Xenopus laevis* werden in Becken mit einem Wasserstand von 25 cm gehalten. Dabei steht jedem Krallenfrosch ein Volumen von 30 Litern zur Verfügung. Innerhalb einer Woche wird in kleinen Schritten ein kompletter Wasseraustausch vorgenommen. Durch eine UV-Lampe mit Zeitschaltuhr wird ein 12stündiger Tag/Nacht-Rhythmus nachgeahmt. Die Nahrung besteht aus kleingehackten Rinderherzen und Rinderlebern sowie aus Forellen-Trockenfutter und wird mit einem Vitaminpräparat angereichert. Zur Vermeidung von Hautkrankheiten werden Becken und Tiere regelmäßig in dreimonatigen Abständen für 16 h mit Kalium-Permanganat (eine Messerspitze pro Becken) desinfiziert.

2.3.2. Entnahme von Xenopus-Oozyten

Die zur Proteinexpression benötigten Oozyten werden durch Operation weiblicher Krallenfrösche gewonnen. Zuerst wird jeder Frosch in 0,2% MS-222 (Triacin, Sigma, Deisenhofen) solange narkotisiert (ca. 1 min), bis er beim Streicheln der Bauchoberfläche keine Reflexe mehr zeigt. Anschließend wird er mit der Bauchseite nach oben auf ein feuchtes Papier gelegt. Das Austrocknen der Haut wird durch regelmäßiges Benetzen mit Wasser verhindert. Mit einem Skalpell wird die Bauchhöhle durch einen kurzen Schnitt 1 cm oberhalb des rechten oder linken Beinansatzes geöffnet. Dieser Schnitt wird mit Hilfe einer Schere nach außen hin auf insgesamt 2 cm Länge erweitert. Danach wird die darunter liegende Bauchmuskelschicht ebenfalls mit der Schere geöffnet. Mit einer Pinzette werden nun die im Bauchraum befindlichen in Lobuli gefalteten Oozytenstränge vorsichtig herausgezogen und bei Verspüren eines Widerstandes von den im Bauchraum verbliebenen Oozytensträngen mit der Schere abgetrennt. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis keine Oozytenstränge mehr greifbar sind. Damit der spätere Neubildungsprozess gleichmäßig ablaufen kann, ist es notwendig, möglichst viele Oozyten zu entnehmen. Mehrere hundert bis tausend Oozyten können bei einer Operation gewonnen werden. Die Oozyten werden in Ori gegeben und bei 19°C gelagert.

Nach Entnahme wird der Bauch des Frosches in zwei Schritten vernäht: Zunächst wird die Bauchmuskelschicht mit einer dreistichigen Naht geschlossen, dann die darüber liegende Bauchdecke mit einer vier- bis fünfstichigen Naht. Das Verwachsen von Bauchdecke und Bauchmuskelschicht wird so verhindert und weitere Operationen durch eine verminderte Narbenentstehung erleichtert. Nach dem Erwachen aus der Narkose wird der Frosch zur Erholung isoliert und für 16 h in einem flachen Becken gehalten.

Vier bis fünf Monate später ist die Neubildung der Oozyten abgeschlossen. Eine erneute Operation kann erfolgen.

2.3.3. Vereinzelnung von Oozyten

Die in den zu Lobuli gefalteten Oozytensträngen vorliegenden Oozyten werden einige Stunden nach der Entnahme mit zwei Pinzetten in kleine Stücke gerissen, in Ca^{2+} -freiem Ori gewaschen, in Ca^{2+} -freies Ori mit 0,2% Collagenase (Sigma, Deisenhofen) gegeben und 16 h bei 19°C inkubiert.

Durch die Enzymbehandlung werden die Oozyten freigesetzt. Um sie von toten Zellen und Gewebsresten zu befreien, werden die Oozyten in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach dem Absetzen wird der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Anschließend werden 30 ml Ca^{2+} -freies Ori zugegeben. Die gesunden Zellen der Stadien IV bis VI sinken schnell zu Boden, während Gewebsreste, tote Zellen und Zellen der Stadien I bis III längere Zeit benötigen. Letztere werden durch schnelles Absaugen entfernt. Das zehnmalige Wiederholen des Waschvorgangs führt zu einer Anreicherung der für die nachfolgend beschriebenen Experimente notwendigen Oozyten. Anschließend erfolgen zwei Waschvorgänge mit Ca^{2+} -haltigem Ori. Mit Hilfe einer Lupe und einer gekürzten Pasteurpipette werden für die Injektionen gut erhaltene Oozyten der Reifestadien V und VI aussortiert und in Ori bei 19°C gelagert.

2.3.4. Mikroinjektion von cRNA in Oozyten

Nukleinsäuren werden mit Hilfe eines Microinjectors in Oozyten injiziert. Für die Injektion müssen Mikro-Glaskapillaren an einem Ende so ausgezogen werden, dass Spitzen mit einem Durchmesser von 20-30 μm entstehen. Mit einer Pinzette wird das ausgezogene Ende vorsichtig aufgebrochen und die Kapillare mit Mineralöl gefüllt. Anschließend wird sie auf den beweglichen Stift des Microinjectors geschoben.

In einen mit Mineralöl (Sigma, Deisenhofen) gefüllten Deckel eines 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßes wird die zu injizierende Nukleinsäure pipettiert und von dort aus mit Hilfe des Microinjectors in die Kapillare eingezogen. Um eine Veränderung ihrer Lage während der Injektion zu verhindern, werden die Oozyten mit Ori in die eingefrästen Vertiefungen eines Plexiglasblocks gegeben. Vor der Injektion werden die Oozyten so ausgerichtet, dass ein Eindringen der Kapillare in einem Winkel von

30° durch die Äquatorialebene in die vegetative Hemisphäre und die anschließende Injektion der Nukleinsäure durch den Microinjector erfolgen können. In jede Oozyte werden pro cRNA 10-15 ng in einem Volumen von 46 µl injiziert. In Kontrolloozyten wird ausschließlich Wasser injiziert.

2.3.5. Markierung von Oozyten mit ³⁵S-Methionin

Die mit Nukleinsäuren injizierten Oozyten werden einige Stunden nach der cRNA-Injektion in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Überstand an Ori wird abgenommen, anschließend werden Ori und ³⁵S-Methionin hinzu pipettiert.

Oozytenzahl	µl Ori	³⁵ S-Methionin-Aktivität
bis 20	40 µl	40 µCi
bis 30	50 µl	50 µCi
bis 40	60 µl	60 µCi

Sollen mehr als 40 Oozyten markiert werden, werden sie auf mehrere Mikroinjektionsgefäße verteilt. Nach der vierstündigen Markierung (Pulse) werden die Oozyten dreimal mit Ca²⁺-freiem Ori und einmal mit Ori gewaschen und anschließend für 48 h in Ori mit 5 mM L-Methionin kultiviert (Chase).

2.3.6. Herstellung von Oozytenolubilisaten

Zur Vorbereitung der Immunpräzipitation von Proteinen werden die Oozyten homogenisiert (Schmalzing et al., 1992). Um eine Proteindegradation zu verhindern, werden alle Homogenisierungsschritte auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Zunächst werden die Oozyten in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und dreimal in Ori-Puffer gewaschen. Der Überstand des Waschpuffers wird vollständig entfernt. Pro Oozyte werden 20 µl eiskalter Homogenisierungspuffer hinzugegeben. Durch 20maliges Auf- und Abpipettieren mit einer 200 µl-Pipettenspitze werden die Oozyten

zerstört. Anschließend wird der Homogenisierungsansatz dreimal mit je einer einminütigen Pause auf Eis für ca. 30 sec auf dem Vortexer gemischt. Nach einer Wartezeit von 15 min auf Eis erfolgt eine 10minütige Zentrifugation des Homogenats bei 13000•g. Während der Zentrifugation bilden sich drei Phasen aus:

1. das Pigment-/Dotterproteinpellet
2. die detergenzlösliche Fraktion (Solubilisat)
3. die Lipidschicht

Mit einer Pipette wird das Solubilisat vorsichtig in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Durch Wiederholung dieses Vorgangs erhält man das aufgereinigte Solubilisat, das anschließend für die Immunpräzipitation eingesetzt wird.

2.4. Zellkultur

Die Kultivierung von Säugetierzelllinien erfolgt in Plastikwaren der Firmen Falcon und Sarsted. Alle Zellen werden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert.

2.4.1. Kultivierung und Subkultivierung von B35 Zellen

Die Kultivierung von B35 Zellen erfolgt in mit PLL (0,02%) beschichteten T75 Zellkulturflaschen in DMEM H Kulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂. Zur Selektion von stabil transfizierten Zellen wird entsprechend der Selektionsmarker Geneticin 418 (ICN, Eschwege) (250 µg/ml) dem Kulturmedium zugefügt. Nach Erreichen von 95-100% Konfluenz werden die Zellen dreimal mit HBSS⁻ gewaschen und dann zur Dissoziation für ca. 5 min mit Trypsin/HBSS⁻ inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Vol. FCS wird der Prozess gestoppt. Die Zellsuspension wird in 10 ml HBSS⁻

aufgenommen und bei RT für 7 min bei 150•g abzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in Zellkulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:10 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.4.2. Stabile Transfektion von Säugerzellen

Am Tag vor der Transfektion werden die zu transfizierenden B35 Zellen auf einer mit PLL beschichteten Petrischale (100 mm Durchmesser) so ausplattiert, dass sie am Tag der Transfektion zu 60% dicht gewachsen sind. 10 µg DNA werden mit 500 µl OptiMEM plus (Gibco, Karlsruhe) vermischt. Das DNA-OptiMEM-Gemisch wird mit 7 µl Plus-Reagenz gemischt, gut geschüttelt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren Gefäß werden 10 µl Lipofectamin Plus Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) und 500 µl OptiMEM Plus vermischt. Anschließend werden das DNA-OptiMEM Plus-Gemisch und das Lipofectamin Plus-Gemisch zusammengegeben, gut gemischt und für 20 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit werden die zu transfizierenden Zellen zweimal mit HBSS⁻ gewaschen. Das DNA-Lipofectamin Plus-Gemisch wird zu den Zellen pipettiert und leicht geschwenkt. Anschließend folgt eine dreistündige Inkubation im Brutschrank. Das Medium wird dann abgenommen und durch neues ersetzt. Nach zwei Tagen werden die Zellen gesplittet und in Selektionsmedium kultiviert. Das Medium wird solange alle zwei Tage gewechselt, bis sich Zellklone ausbilden, die mit einer Pipette aufgenommen und in Selektionsmedium in Mikrotiterplatten mit je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellklone zunehmender Größe weiterkultiviert werden.

2.4.3. Einfrieren von Zellen

Konfluent gewachsene Zellen werden vom Flaschenboden abdissoziiert und pelletiert. Das Pellet wird in 800 µl Zellkulturmedium resuspendiert und mit 100 µl DMSO (Sigma, Deisenhofen) und 100 µl FCS versetzt und in 1 ml Kryoröhrchen

pipettiert. Die Zellen werden zunächst für 1 h bei -20°C eingefroren, dann ca. 1 Woche bei -80°C aufbewahrt, um dann zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt zu werden.

2.4.4. Behandlung von Zellen mit pharmakologischen Substanzen

2.4.4.1. Behandlung von B35 Zellen mit dbcAMP

Vor der Ausdifferenzierung der Neuroblastomzellen in einen neuronalen Typ werden die Zellen in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Schale für 24 h in mit PLL beschichteten 60 mm Schalen in Kulturmedium für B35 Neuroblastomzellen kultiviert (Kap. 2.4.1.). Anschließend wird das Medium abgenommen, die Zellen mit OptiMEM Plus (Gibco, Karlsruhe) einmal gewaschen und für weitere 24 h mit 1 mM dbcAMP (Sigma, Deisenhofen) in OptiMEM Plus inkubiert.

2.4.5. Biosynthetische Markierung von Säugerzellen

2.4.5.1. Zelloberflächenbiotinylierung von B35 Zellen

Die Membranproteine auf der Zelloberfläche von B35 Zellen werden nach einer von Boxberg et al. (1990) modifizierten Methode biotinyliert. Vor der Ausdifferenzierung der Neuroblastomzellen in einen neuronalen Typ werden die Zellen in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Schale für 24 h in mit PLL beschichteten 60 mm Schalen in Kulturmedium für B35 Neuroblastomzellen kultiviert (Kap. 2.4.1.). Anschließend wird das Medium abgenommen, die Zellen mit OptiMEM Plus (Gibco, Karlsruhe) einmal gewaschen und für weitere 24 h mit 1 mM dbcAMP (Sigma, Deisenhofen) in OptiMEM Plus inkubiert. Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit $40 \mu\text{g}$ Sulfo-NHS-LC Biotin (Pierce, Rochester, USA)/ml

PBS inkubiert. Durch einmaliges Waschen mit TBS wird die Biotinylierung gestoppt. Die Zellen werden anschließend lysiert (Kap. 2.4.7.) und eine Immunpräzipitation mit dem anti NCAM Antikörper 123C3 (Kap. 2.6.2.) durchgeführt. Mittels Streptavidin-Peroxidase in einer Verdünnung von 1:10000 wird das zelloberflächenassoziierte NCAM im Western Blot detektiert (Kap. 2.6.7.).

2.4.6. Induktion der Endozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen

Die stabil transfizierten Zellen werden zwei Tage vor Beginn des Experiments in einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen/ml Zellkulturmedium auf mit PLL beschichteten, runden Deckgläschen mit 15 mm Durchmesser (Fa. Menzel, Braunschweig) ausgesät. Nach 20 bis 24 Stunden wird das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit DMEM H gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 1 mM dbcAMP in OptiMEM Plus (Kap. 2.4.6.2.) behandelt. Nach weiteren 20 bis 24 Stunden wird das Medium abgenommen und die Zellen erneut gewaschen. Zur Induktion der Endozytose werden die Zellen für 30 min mit dem in vorgewärmtem Medium verdünnten anti NCAM Antikörper 123C3 (25 µg/ml OptiMEM Plus) inkubiert. Um die Endozytose zu stoppen, wird das Medium abgenommen, die Zellen dreimal mit 4°C kaltem DMEM H gewaschen und weiterbehandelt (Kap. 2.5.2.).

2.4.7. Herstellung von Zelllysaten

Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums werden die Zellen einmal mit TBS gewaschen. Anschließend werden sie durch Zugabe des je nach Versuchs zu verwendenden eiskalten Lysis-Puffers für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei werden 500 µl/35 mm Petrischale benötigt. Nach Ende der Inkubationszeit wird das Lysat bei $14000 \times g$ für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Nach Bestimmung des Proteingehalts wird das Lysat für weitere Versuche eingesetzt oder bis zu seiner Verwendung bei -80°C tiefgefroren.

2.5. Immunzytochemie

2.5.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Die in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml auf mit 0,2% PLL vorbeschichteten Deckgläschen ausgesäten Zellen werden nach 24 h des Wachstums mit dcAMP (Kapitel 2.4.4.1.) ausdifferenziert und nach Absaugen des Mediums einmal mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgt eine 30minütige Fixierung mit einer frisch angesetzten 8%igen (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (in 200 mM HEPES, pH 7,4). Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen 5 min für 30 min mit 0,5% Triton X-100 in TBS permeabilisiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen werden die Zellen in Blockierungspuffer, bestehend aus 1% BSA in TBS, für 15 min bei RT inkubiert. Die anschließende Inkubation mit dem in Blockierungspuffer gelösten Primärantikörper erfolgt über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit TBS erfolgt bei RT eine 30minütige, lichtgeschützte Inkubation mit dem in Blockierungspuffer gelösten Sekundärantikörper, der mit einem der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 oder DTAF gekoppelt ist. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS werden die Deckgläschen kurz in aqua dem. getaucht, um Salze des Waschpuffers zu entfernen. Dann werden sie an der Luft getrocknet und in Glyzeringelatine (Merck, Darmstadt) eingebettet. Die Präparate werden im Confocal- oder Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Für die Anregung von Cy3 ist eine Wellenlänge von 546-580 nm erforderlich, für die von DTAF eine Wellenlänge von 496-528 nm.

2.5.2. Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis der Endozytose von Antigen-Antikörper-Komplexen

Die wie in Kapitel 2.4.4.1. beschrieben behandelten Zellen werden nach dem Waschen für 30 min mit einer frisch angesetzten 8%igen (w/v) Paraformaldehyd-Lösung (in 200 mM HEPES, pH 7,4) fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS werden die Zellen für 30 min unter Lichtabschutz bei RT mit dem in

Blockierungspuffer (1% (w/v) BSA in TBS) gelösten Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, um zelloberflächenassoziiertes NCAM zu detektieren. Nach einmaligem Waschen mit TBS werden die Zellen für 5 min nachfixiert (s.o.), wieder einmal gewaschen und für 30 min mit 0,5% Triton X-100 in 3%BSA/TBS permeabilisiert. Zur Detektion endozytierter NCAM-Antikörperkomplexe erfolgt nach dreimaligem Waschen mit TBS bei RT eine 30minütige, lichtgeschützte Inkubation mit dem in Blockierungspuffer gelösten DTAF-gekoppelten Sekundärantikörper. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TBS werden die Deckgläschen kurz in aqua dem. getaucht, um Salze des Waschpuffers zu entfernen. Dann werden sie an der Luft getrocknet und in Glyzeringelatine eingebettet. Die Analyse der Präparate erfolgt mit dem Laser Scanning Spectral Confocal Microscop der Fa. Leica. Für die Anregung von Cy3 ist eine Wellenlänge von 546-580 nm erforderlich, für die von DTAF eine Wellenlänge von 496-528 nm.

2.5.3. Antikörperverdünnungen für die Immunfluoreszenz

Antikörper-Verdünnungen:	123C3	1:50 in Blockierungspuffer
	H28	1:30 in Blockierungspuffer
	anti-Maus-Cy3	1:150 in Blockierungspuffer
	anti-Maus-DTAF	1:100 in Blockierungspuffer

2.6. Proteinchemische Methoden

2.6.1. Immunpräzipitation von NCAM und L1 aus Oozytensolubilisaten

In einem Eppendorfgefäß werden 100 µl Solubilisat, 400 µl Solubilisierungspuffer, 20 µl Protein G-Sepharose (Pharmacia, Freiburg) und 10 µg anti NCAM Antikörper 123C3 und/oder anti L1 Antikörper für 16 h bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 6000•g wird der Antigen-Antikörper-Protein G-Sepharose-Komplex pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 500 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Insgesamt wird dieser Waschvorgang fünfmal wiederholt. Um den Antigen-Antikörper-Protein G-Sepharose-Komplex zu dissoziieren, wird nach Entfernen des letzten Waschpuffers das Pellet in 50 µl 2x Probenpuffers aufgenommen und für 20 min auf 37°C erwärmt. Die Protein G-Sepharose wird anschließend abzentrifugiert und der Überstand bis zur Auftrennung im SDS-Gel bei -20°C gelagert.

2.6.2. Immunpräzipitation von NCAM aus Zelllysaten

In einem Eppendorfgefäß werden 1000 µl Lysat mit ca. 5 µg des anti NCAM Antikörpers 123C3 für 16 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit ca. 40 µl Protein G-Sepharose versetzt und für eine weitere h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4000•g und 4°C wird der Antigen-Antikörper-Protein G-Sepharose-Komplex pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Insgesamt wird dieser Waschvorgang dreimal wiederholt. Nach Entfernen des letzten Waschpuffers wird das Pellet in 50 µl reduzierenden 2x Probenpuffers aufgenommen und bei 100°C 10

min gekocht. Die Protein G-Sepharose wird anschließend abzentrifugiert und der Überstand zur Auftrennung der Proteine im SDS-Gel verwendet.

2.6.3. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt im DC Protein Assay (Bio-Rad, München) nach der Methode von Lowry. Zunächst wird eine Eichkurve mit BSA als Standardprotein und dem entsprechenden Puffer, in dem die zu bestimmende Probe enthalten ist, in einem Konzentrationsbereich von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis 0,004 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hergestellt. In einer Dreifachbestimmung werden jeweils 5 μl der BSA-Lösungen und der Proben in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Bio-Rad Reagenzien A und S werden im Verhältnis 50:1 frisch angesetzt. Von dem Gemisch werden je 25 μl zu den Standardlösungen und der Probe pipettiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 200 μl des Reagenz B. Nach einer 20minütigen Inkubationszeit kann die optische Dichte der sich entwickelnden Blaufärbung spektralphotometrisch bei $\lambda=690$ nm gemessen werden. Aus den Absorptionswerten der BSA-Lösungen wird eine Eichkurve erstellt, an der sich der Proteingehalt der Proben anhand der Werte der optischen Dichte in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestimmen lässt.

2.6.4. Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichtes. Bei der Herstellung der Gele und Durchführung der Elektrophorese wird das Minigel-System (Bio-Rad, München) verwendet. Je nach Größe der nachzuweisenden Proteine werden 8%ige (L1, NCAM) und 12%ige Trenngele (CREB/ERK) gegossen. Die Größe des Sammelgels beträgt 1 cm, die des Trenngels 6 cm. Die Zusammensetzung des Polyacrylamidgels und der Puffer entspricht der Vorschrift von Harlow und Lane (1988). Vor dem Auftragen in die Geltaschen werden die zu untersuchenden Proteinproben mit 1:1 mit 2x Probenpuffer gemischt und für 10 min

bei 80°C denaturiert. Zu Beginn der Auftrennung wird ein Stromfluss von 50 mA angelegt, nach Übergang der Proteinfrent vom Sammel- zum Trenngel wird dieser auf 80 mA erhöht. Als Molekulargewichtsmarker dienen entweder die Molekulargewichtsmarker der Fa. Biorad oder, bei der Auftrennung von ³⁵S-Methionin markierten Proteinen, der ¹⁴C-Protein-Standard (Amersham, Freiburg).

2.6.5. Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Das SDS-Gel wird 30 min in Fixierlösung inkubiert. Darauf folgt eine Über-Nacht-Färbung in Coomassie-Lösung. Der überschüssige, nicht gebundene Farbstoff wird solange mit Entfärber-Lösung herausgewaschen, bis die gefärbten Proteinbanden klar erkennbar sind.

2.6.6. Fluorographie

Um die ³⁵S-Methionin markierten, immunpräzipitierten und im SDS-Gel aufgetrennten Proteine detektieren zu können, wird das Gel zunächst für 1 h fixiert (Kap. 2.6.5.) und dreimal mit aqua dem. gewaschen. Zur Verstärkung der emittierten Strahlung wird es in Amplify® (Amersham, Freiburg) für 30 min inkubiert. Auf Whatman-Papier wird das Gel unter Vakuum anschließend getrocknet und in eine Röntgenfilm-Cassette eingeklebt. Bei -80°C dauert die Exposition je nach Stärke der Signale mehrere Tage bis Wochen.

2.6.7. Western Blot nach dem Semi-dry Verfahren

Mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren in einem Blot-Gerät der Fa. Biorad werden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Zunächst werden 10 Stücke Whatman-Papier und ein Stück Nitrocellulose in der Größe des entsprechenden Gels zurechtgeschnitten.

Anschließend werden fünf gestapelte Stücke Whatman-Papier in Kathodenpuffer getaucht und auf die Kathodenplatte des Geräts gelegt. Darauf wird das Gel gelegt, das mit der in Anodenpuffer II getränkten Nitrocellulose bedeckt wird. Diese wird wiederum mit zwei Stücken in Anodenpuffer II getränkten Whatman-Papieren bedeckt, die ihrerseits mit drei Stücken in Anodenpuffer I getränkten Whatman-Papieren bedeckt werden. Abgeschlossen wird der Aufbau mit der Auflage der Anodenplatte. Der Transfer erfolgt bei einem konstanten Strom von 150 mA, bis drei mA/cm² geflossen sind. Anschließend wird die Nitrocellulose kurz in aqua dem. gewaschen.

2.6.8. Ponceau S-Färbung

Mit Hilfe der reversiblen Ponceau S-Färbung wird der Transfer der Proteine von einem SDS-Gel auf Nitrocellulose kontrolliert. Die mit aqua dem. gewaschene Nitrocellulose wird für 2 min in Ponceau S-Lösung inkubiert. Anschließend wird die Färbelösung wieder entfernt und die Nitrocellulosemembran erneut mit aqua dem. gewaschen. Das Anfärben der Proteinbanden ermöglicht die Markierung des Molekulargewichtstandards.

2.6.9. Protein-Detektion

Die Nitrocellulose wird zunächst für 1 h bei RT mit 5% Milchpulver oder BSA in TBS für 1 h blockiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem gegen das jeweilige Protein gerichteten spezifischen primären Antikörper bei 4°C über Nacht.

Zur Minimierung unspezifischer Wechselwirkungen des Antikörpers mit anderen Proteinen erfolgt ein sechsmaliges Waschen der Membran mit TBS/0,5% Tween für jeweils 10 min. Darauf folgt bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit einem Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Die Antikörper werden in der Blockierungslösung verdünnt. Anschließend folgt ein sechsmaliges Waschen der Membran mit TBS/0,5% Tween für jeweils 10 min. Mittels Peroxidase katalysierter Chemilumineszenzreaktion erfolgt

der Nachweis der Bindung der Antikörper. Dafür wird das SuperSignalSubstrate® (Pierce, Rochester, USA) verwendet. Das bei der Reaktion emittierte Licht wird auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.6.10. Antikörperverdünnungen für Western Blots

Antikörper-Verdünnungen:	123C3	1:500
	anti-CREB	1:1000
	anti-P-CREB	1:1000
	anti-P-Tyr	1:1000
	anti-Maus-POD	1:15000
	anti-Kaninchen-POD	1:10000
	anti-Ratte-POD	1:10000

Verdünnt werden die Antikörper in einer Blockierungslösung aus TBS mit 1% BSA und 0,01% Tween.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung der Glykosylierung von humanem L1 und humanem NCAM140 in *Xenopus* Oozyten

3.1.1. Einbau von Schnittstellen in das NCAM140 Insert für Klonierungen in verschiedene Vektoren

Primer:

5'CGC GGA TCC ATG CTG CAA ACT AAG GAT CTC 3'

5'CCG CTC GAG TCA TGC TTT GCT CTC GTT CTC 3'

Die cDNA für humanes NCAM140 war in den Vektor pGEM3 eingebaut und wurde von Dr. Rita Gerady-Schahn (MH Hannover) zur Verfügung gestellt. Um die NCAM140 in die Vektoren pNKS2 und pcDNA3 überführen zu können, mussten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BAMHI* und *XHOI* in die cDNA eingebaut werden. Dies geschah mittels PCR (2.2.8.), wobei die Primer die Schnittstellen für die oben genannten Restriktionsenzyme enthielten. Das entstandene PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.6.) und die spezifische NCAM140 Bande aus dem Agarosegel extrahiert (2.2.7.). Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *BAMHI* und *XHO* geschnitten und aufgereinigt. Die cDNA hatte die erwartete Größe von 2537 bp (Abb. 6).

Es stellte sich heraus, dass der Primer

5'CCG CTC GAG TCA TGC TTT GCT CTC GTT CTC 3' , obwohl er richtig bei der Fa. MWG bestellt wurde, zwei ungewollte Mutationen enthielt, die leider unbemerkt blieben: 5'CCG CTC TCA TGA TTT GCT CTC GTT CTA 3'

Die Mutation TGA ist eine stille Mutation, die bei der Proteinsynthese keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz gehabt hätte. Die Mutation CTA ist allerdings ein Stopp-Codon, sodass die hier verwendete NCAM140 cDNA eine im cytoplasmatischen Bereich um 6 Aminosäuren verkürzte Sequenz aufweist. Dies bezieht sich sowohl

auf die NCAM140 WT cDNA, als auch auf die beiden erzeugten Mutanten NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A.

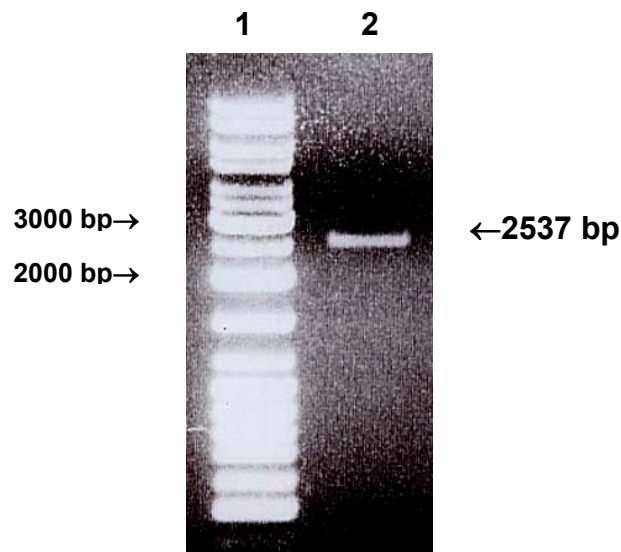


Abb. 6: Agarosegel der cDNA von NCAM140 nach PCR (2537 bp).

(1):Molekulargewichtsstandard, (2): NCAM140 Insert.

3.1.2. Einbau der cDNA für humanes NCAM140 in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T (Promega)

Das pGEM[®]-T Vektor-System (Abb. 7) ist besonders für das Klonieren von PCR-Produkten geeignet. Der Vektor ist so präpariert, dass er, geschnitten mit *EcoR* V, an beiden Enden ein 3' terminales T aufweist. Diese einzelnen 3'-T Überhänge in der Insertionsseite steigern die Ligationseffizienz eines PCR-Produkts in das Plasmid, da dieses nicht rezirkularisieren kann. Nötig für diese Art der Klonierung ist die Verwendung einer thermostabilen Polymerase, die kompatible Überhänge in dem zu klonierenden PCR-Produkt schafft. Der Vektor enthält einen Replikationsursprung sowie ein Ampicillinresistenz-Gen zur Propagierung in *E. coli*. Die kodierende Sequenz des zu transkribierenden Gens wird in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eingebaut.

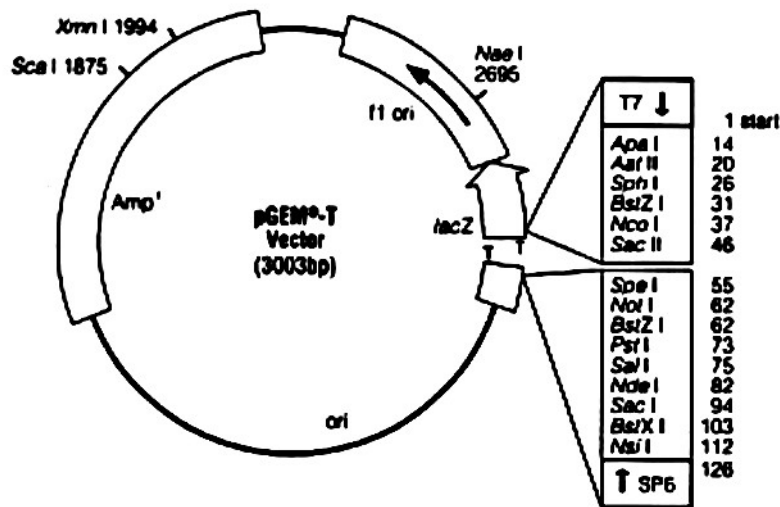


Abb. 7: Schematische Darstellung des *in vitro*-Klonierungsvektors pGEM[®]-T

Die NCAM140 cDNA wurde in die MCS inseriert.

Die Insertion der NCAM140 cDNA bewirkte zusätzlich das Einfügen zweier neuer Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BAMH1 und XHO1. Die Ligationsreaktion von Vektor und Insert ist in Kap. 2.2.13. beschrieben.

Kompetente DH5 α -Bakterien wurden mit einem Teil des Ligationsansatzes transformiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte kultiviert. Ampicillin-resistente Klone wurden in einer Flüssigkultur amplifiziert und ihre Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert. Durch Doppelrestriktion mit den beiden Enzymen BAMH1 und XHO1 konnte analysiert werden, in welchem Klon die NCAM140 cDNA in der richtigen Orientierung in den pGemT eingebaut war (Abb. 8). Der Klon, der diese Voraussetzung erfüllte, wurde weiter amplifiziert und seine Plasmid-DNA zur Sequenzierung eingeschickt.

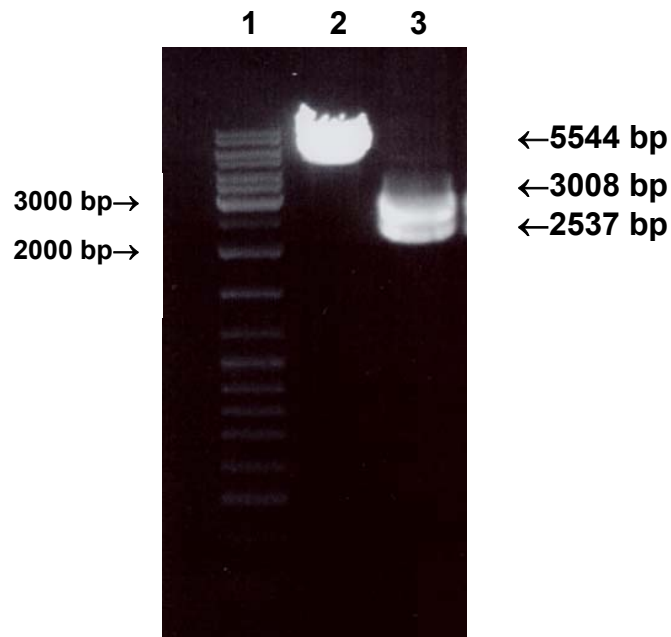


Abb. 8: Restriktionsanalyse des richtigen Einbaus des NCAM140 Inserts in den pGemT-Vektor.

(1): Molekulargewichtsstandard, (2): ungeschnittener Vektor mit NCAM140 Insert (5544 bp), (3) mit BAMH1 und XHO1 geschnittener Vektor (obere Bande:3008 bp) und das ausgeschnittene NCM140 Insert (2537 bp). Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel.

3.1.3. Einbau der cDNA für humanes NCAM140 in den eukaryotischen Transkriptionsvektor pNKS2

Die Expression exogener Proteine in Oozyten wird durch die Injektion von cRNA in das Cytoplasma, den Ort der für die Translation ermöglicht. Um eine hohe Translationseffizienz zu erhalten, muss die injizierte cRNA die typischen Merkmale einer eukaryotischen mRNA besitzen: einen m⁷G-Cap am 5'-Ende, eine Ribosomen-Bindungsstelle, die kodierende Sequenz sowie am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz. Dazu bedarf es des Einsatzes spezieller *in vitro*-Transkriptionsvektoren, zu denen auch der Vektor pNKS2 (Abb. 9) zählt (Reinhardt-Maelicke et al., 1993). Er enthält einen Replikationsursprung sowie ein Ampicillinresistenz-Gen zur Propagierung in *E. coli*. Die kodierende Sequenz des zu transkribierenden Gens wird in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eingebaut. Stromaufwärts liegt die Bindungssequenz der SP6-RNA-Polymerase. Die Ribosomenbindungsstelle befindet sich zwischen der SP6-Polymerase-Bindungsstelle und der MCS. Stromaufwärts der MCS liegt eine

aus ca. 60 aufeinanderfolgenden A-Resten bestehende Poly(A)-Sequenz. Eine RNA-Synthese kann nur dann erfolgreich durchgeführt werden, wenn der Vektor zuvor durch das Restriktionsenzym Not1 stromabwärts der Poly(A)-Sequenz linearisiert wurde. Die *in vitro*-Transkription der in die MCS inserierten cDNA erfolgt durch die SP6-RNA-Polymerase. Im Reaktionsansatz befindet sich neben den zur Synthese notwendigen Nukleotiden $m^7G(5')ppp(5')G$. Wird dieses im Verhältnis 4:1 eingesetzt, beginnt die SP6-RNA-Polymerase fast immer mit einem 5- m^7G -Cap und die synthetisierte cRNA ist vor Degradation geschützt. Auch der Poly(A)-Schwanz dient der cRNA Stabilität.

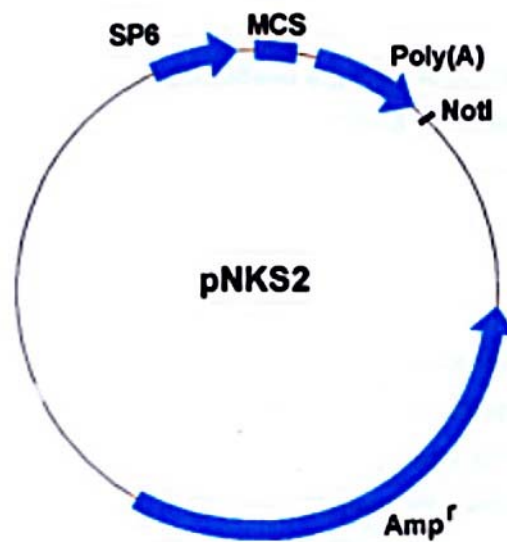


Abb. 9: Schematische Darstellung des *in vitro*-Transkriptionsvektors pNKS2.

Die zu transkribierende cDNA für NCAM140 wurde in die MCS inseriert. Die Transkription erfolgte durch die SP6-RNA-Polymerase. Sie bindet an die SP6-Polymerase-Bindungsstelle (SP6). Wenn der Vektor vor dieser Reaktion mit Not1 linearisiert wird, bricht die RNA-Synthese unmittelbar hinter der Poly(A)-Sequenz ab.

Um die cDNA von NCAM140 in den pNKS2 integrieren zu können, wurde der Vektor in der MCS mit BAMH1 und XHO1 geschnitten und aufgereinigt.

Die Ligationsreaktion von Vektor und Insert ist in Kap. 2.2.13. beschrieben.

Kompetente DH5 α -Bakterien wurden mit einem Teil des Ligationsansatzes transformiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte kultiviert. Ampicillin-resistente Klone wurden in einer Flüssigkultur amplifiziert und ihre Plasmid-DNA

mittels Minipräparation isoliert. Durch Doppelrestriktion mit den beiden Enzymen BAMH1 und XHO1 konnte analysiert werden, in welchem Klon die NCAM140 cDNA in der richtigen Orientierung in den pNKS2 eingebaut war (Abb. 10). Der Klon, der diese Voraussetzung erfüllte, wurde weiter amplifiziert und seine Plasmid-DNA zur cRNA-Synthese verwendet.

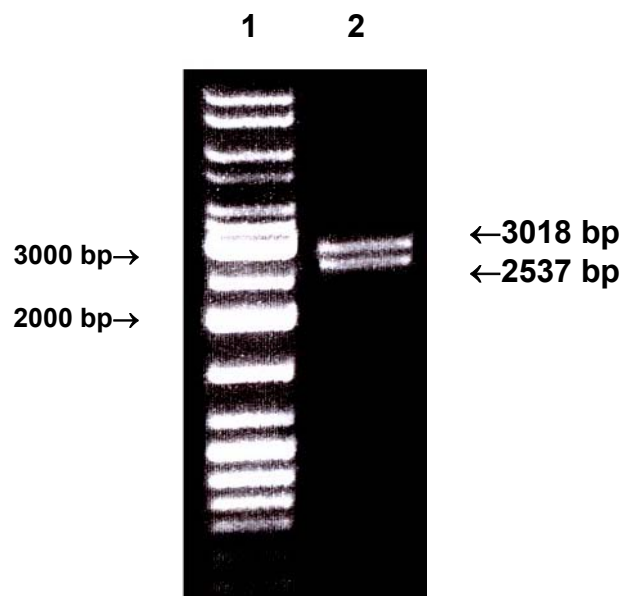


Abb. 10: Restriktionsanalyse des richtigen Einbaus des NCAM140 Inserts in den pNKS2-Vektor. (1): Molekulargewichtsstandard, (2): Kontrollrestriktion mit BAMH1 und XHO1, Vektor (3018 bp), NCAM140 Insert (2537 bp).

Die bereits in den Vektor pNKS2 einklonierte cDNA von L1 (siehe Dissertation von Karsten Thelen) konnte sofort für weitere Experimente eingesetzt werden.

3.1.4. ³⁵S-Methionin-Markierung von L1- und NCAM140-Proteinen in *Xenopus* Oozyten

Zunächst musste sichergestellt werden, dass die *in vitro* synthetisierten cRNAs in den Oozyten auch zu Proteinen translatiert werden. Dazu wurden die entsprechenden Transkripte injiziert. Um die neu entstehenden Polypeptidketten nachweisen zu können, wurde eine metabolische Markierung der Oozyten mit ³⁵S-

Methionin durchgeführt. Nach Homogenisierung der Zellen erfolgte eine Immunpräzipitation. Die so isolierten Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-Gels aufgetrennt und mittels Fluorographie (Kap. 2.6.6.) nachgewiesen (Abb. 11).

Die postulierte Interaktion zwischen L1 und NCAM setzt voraus, dass L1 oligomannosidische Kohlenhydrate besitzt. Das Glykosylierungsmuster eines Proteins kann von Zelltyp zu Zelltyp variieren, da es von der jeweiligen Ausstattung einer Zelle mit Glycosyltransferasen abhängig ist. Es sollte daher überprüft werden, welche Kohlenhydratstrukturen auf den in den Oozyten exprimierten Proteinen L1 und NCAM140 vorhanden waren. Dazu wurde nach Injektion der cRNAs von L1 und NCAM eine metabolische Markierung der Oozyten mit ^{35}S -Methionin durchgeführt und beide Proteine immunpräzipitiert. Ein Teil der Präzipitate wurde dann mit Endoglukosidase H behandelt. Dieses Enzym spaltet Kohlenhydrate vom „High Mannose- und Hybrid-Typ“, aber keine komplexen Kohlenhydrate von Proteinen ab. Ein weiterer Teil der Präzipitate wurde mit PNGase F behandelt. Dieses Enzym spaltet neben oligomannosidischen und hybriden Kohlenhydraten auch die komplexen Kohlenhydrate von Proteinen ab. Die Reaktionsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht (Abb. 11).

cRNA	L1	L1	L1	NCAM140	NCAM140
Antikörper	anti L1	anti L1	anti L1	123C3	123C3
Enzym		Endo H	PNGase F		PNGase F

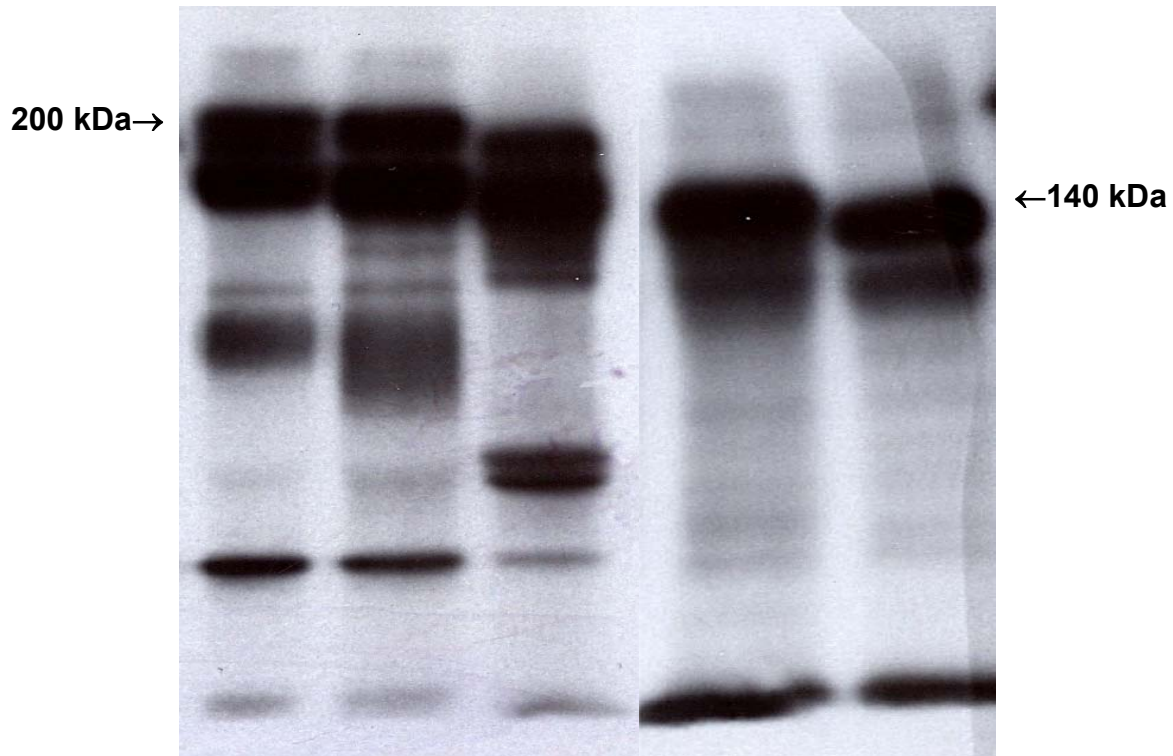


Abb. 11: Nachweis der Expression von L1 und NCAM140 in *Xenopus* Oozyten und der Endoglycosidase H-sensitiven N-Glykane auf L1 und der PNGase F-sensitiven Kohlenhydrate von L1 und NCAM140. Die cRNAs für L1 und NCAM wurden in *Xenopus* Oozyten coinjiziert. 48 h nach einer metabolischen ³⁵S-Methionin-Markierung wurden die Zellen homogenisiert. Ein Teil der Homogenate wurde mit anti L1, ein Teil mit 123C3-Antikörper immunpräzipitiert, die anschließend für 16 h mit Endoglycosidase H bzw. PNGase F inkubiert wurden. Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend durch SDS-Gel und Fluorographie nachgewiesen.

Das immunpräzipitierte L1 hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 200 kD (Abb. 11), das immunpräzipitierte NCAM140 eines von ca. 140 kD. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die L1 cRNA als auch die NCAM140 cRNA zu immunpräzipitierbaren Translationsprodukten führen. Wie in Abb. erkennbar ist, führte die Behandlung mit Endoglycosidase H bei L1 zur Entstehung einer zweiten Bande, die unter dem apparenten Molekulargewicht von 140 kDa lag. Es scheinen auch in Oozyten Endoglycosidase H-sensitive N-Glycane auf L1 zu existieren, wenn auch nur auf einer Subpopulation aller L1-Moleküle, da die 200 kD Bande auch nach

der Behandlung mit Endoglykosidase H noch sichtbar ist. Durch eine Behandlung mit PNGase F entstand eine weitere, noch schneller laufende Bande. L1 scheint in Oozyten wie auch in der Maus noch komplexe Kohlenhydrate zu tragen. Von NCAM ist bekannt, dass es Kohlenhydrate vom komplexen Typ trägt. Es wäre also zu erwarten, dass nach Behandlung mit PNGase F eine zweite Bande mit niedrigerem Molekulargewicht sichtbar wird, die das Vorhandensein von PNGase F-sensitiven komplexen Kohlenhydraten bei NCAM140 in Oozyten beweist. Dies konnte hier aber nicht bestätigt werden (Abb. 11).

Da sich die Haltung der Frösche als schwierig erwies und die Qualität der Oozyten starken saisonalen Schwankungen unterlag, konnte einer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nur unzureichend Folge geleistet werden. Daher wurden die weiteren Experimente an B35 Neuroblastomzellen, die nativ kein bzw. nur wenig NCAM auf der Zelloberfläche exprimieren, durchgeführt.

Dies setzte allerdings ein Umklonieren der NCAM140 cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor voraus.

3.2. Untersuchung des Einflusses der PEST Sequenz auf die Endozytose von humanem NCAM140 in B35 Neuroblastomzellen

3.2.1. Einbau der cDNA für NCAM140 in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3

Der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3 (Abb. 12) ist besonders für die stabile und transiente Transfektion von eukaryotischen Wirtszellen mit cDNA geeignet. Der Vektor enthält einen Replikationsursprung sowie ein Ampicillinresistenz-Gen zur Propagierung in *E. coli*. T7 und SP6 Promotor dienen der Sense und Antisense *in vitro* Transkription.

Der Vektor besitzt einen CMV (humanes Cytomegaliovirus) Promotor/Enhancer, der die Expression des inserierten Gens kontrolliert. Die Translation beginnt mit dem ersten codierenden ATG des in die MCS inserierten Gens. Das BGH (bovines

Wachstumshormon) Polyadenylierungssignal bewirkt die Polyadenylierung der transkribierten mRNA. Des weiteren enthält der Vektor einen Neomycin Resistenzmarker, der durch einen SV 40 Promotor kontrolliert wird und die stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen gewährleistet.

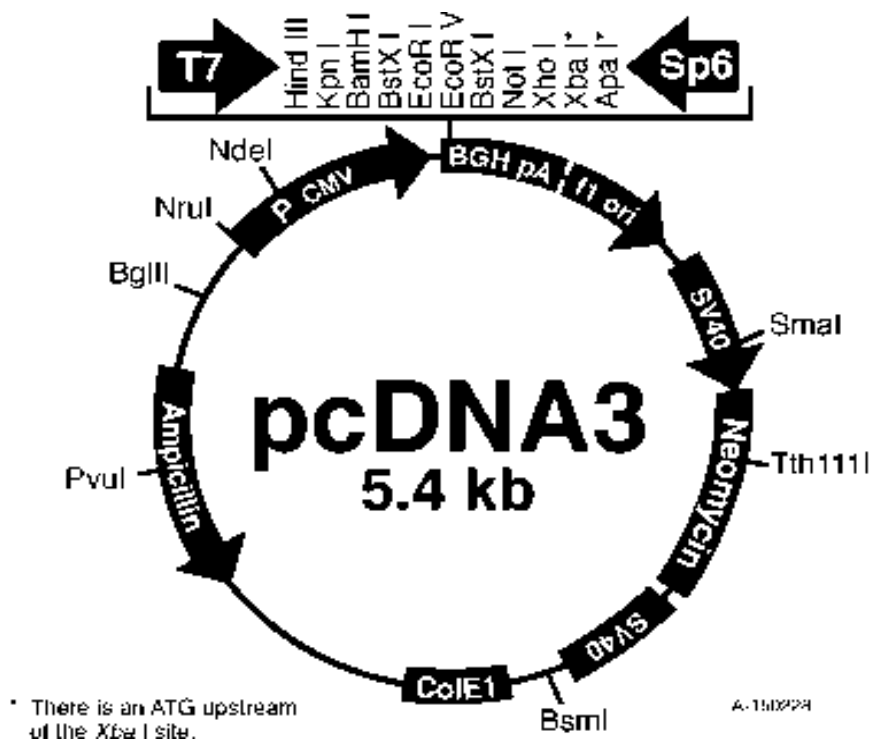


Abb. 12: Schematische Darstellung des eukaryotischen Expressionsvektors pcDNA3. Die NCAM140 cDNA wird mit Hilfe der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BAMH1 und XHO1 in die MCS inseriert.

Um die cDNA von NCAM140 in den pcDNA3 einbauen zu können, wurde der Vektor in der MCS mit BAMH1 und XHO1 geschnitten und aufgereinigt.

Die Ligationsreaktion von Vektor und Insert ist in Kap. 2.2.13. beschrieben.

Kompetente DH5 α -Bakterien wurden mit einem Teil des Ligationsansatzes transformiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte kultiviert. Ampicillin-resistente Klone wurden in einer Flüssigkultur amplifiziert und ihre Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert. Durch Doppelrestriktion mit den beiden Enzymen BAMH1 und XHO1 konnte analysiert werden, in welchem Klon die NCAM140 cDNA in den pcDNA3 eingebaut war (Abb. 13). Der Klon, der diese Voraussetzung erfüllte,

wurde weiter amplifiziert und seine cDNA für die Herstellung weiterer NCAM140 Mutanten und die stabile Transfektion von B35 Zellen verwendet.

3.2.2. Erzeugung von NCAM140 Mutanten

Um zu untersuchen, ob NCAM140 ähnlich wie apCAM140 durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden kann und ob die der PEST Sequenz von apCAM in *Aplysia* stark ähnelnde, im cytoplasmatischen Teil gelegene Sequenz von NCAM140 für die Endozytose von Bedeutung ist, wurden zwei verschiedene NCAM140 Mutanten erzeugt und bezüglich der Endozytose mit dem NCAM140 Wildtyp verglichen.

3.2.2.1. Erzeugung der NCAM140 Mutante NCAM- δ PEST

Primer zur Deletion der PEST Sequenz:

5' TTT CCC TCC ATC ATG GTTT TGG 3'

5' AAG GGC CCC GTA GAG GCA AAG 3'

Die PEST Sequenz HTEPNETTPLTEPE (Aminosäuren 774-787) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Kap. 2.2.8.) deletiert. Der zum 5'-3'-DNA-Strang komplementäre, mit 5'-Phosphat modifizierte Primer wurde so gewählt, daß er der Basensequenz vor der zu deletierenden PEST-Sequenz entsprach. Der zum 3'-5'-Strang komplementäre Primer hingegen wurde so gewählt, dass die Amplifizierung vor der PEST-Sequenz endete. Das entstandene Reaktionsprodukt der PCR trug aufgrund der Verwendung 5'-Phosphat modifizierter Primer 5'-phosphorylierte Enden. Dadurch wurde die anschließende Religation des Vektors (Kap. 2.2.13.) erheblich vereinfacht. Kompetente DH5 α -Bakterien wurden mit einem Teil des Ligationsansatzes transformiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte kultiviert. Ampicillin-resistente Klone wurden in einer Flüssigkultur amplifiziert und ihre Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert. Durch Doppelrestriktion mit den beiden Enzymen BAMH1 und XHO1 konnte analysiert werden, ob der Vektor richtig

religiert war (Abb. 13). Ein Klon, der diese Voraussetzung erfüllte, wurde weiter amplifiziert und seine cDNA zur Sequenzierung (Kap. 2.2.12.) verwendet und im Anschluß an die erfolgreiche Sequenzierungsanalyse für die stabile Transfektion von B35 Zellen verwendet.

3.2.2.2. Erzeugung der NCAM140 Mutante NCAM140-T781A

Primer zur Einführung der Punktmutation:

5'GGT CTC GTT GGG CTC TGT GTG 3'

5'ACG GAG CCC GAG AAG GGC CCC 3'

Die PEST Sequenz von apCAM in *Aplysia* beinhaltet eine Konsensussequenz für MAP-Kinasen. Innerhalb dieser Sequenz bewirkt die durch ERK phosphorylierbare Aminosäure Threonin in ihrem phosphorylierten Zustand die Endozytose von apCAM140.

Die PEST Sequenz HTEPNETTPLTEPE (Aminosäuren 774-787) von NCAM140 beinhaltet eine Sequenz, die der Konsensussequenz für MAP-Kinasen entspricht. Um der Frage nachgehen zu können, ob das Threonin781 dieser Sequenz (TPL) auch bei der Endozytose von NCAM140 eine Rolle spielt, wurde in einem weiteren Konstrukt die Basensequenz ACG, die für die Aminosäure Threonin codiert, durch eine für die Aminosäure Alanin codierende Basensequenz GCG substituiert. Nötig war für diese Mutation nur der Austausch einer Base: A⇒G. Die Mutation wurde mit Hilfe des QuickChange™ site-directed Mutagenesis Kits der Fa. Quiagen (Kap. 2.2.15.) durchgeführt. Kompetente DH5α-Bakterien wurden anschließend mit einem Teil des Ligationsansatzes transformiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte kultiviert. Ampicillin-resistente Klone wurden in einer Flüssigkultur amplifiziert und ihre Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert. Durch Doppelrestriktion mit den beiden Enzymen BAMH1 und XHO1 konnte analysiert werden, ob der Vektor richtig ligiert war (Abb. 13). Ein Klon, der diese Voraussetzung erfüllte, wurde weiter amplifiziert, seine cDNA zur Sequenzierung (Kap. 2.2.12.) verwendet und im Anschluß an die erfolgreiche Sequenzierungsanalyse für die stabile Transfektion von B35 Zellen verwendet.

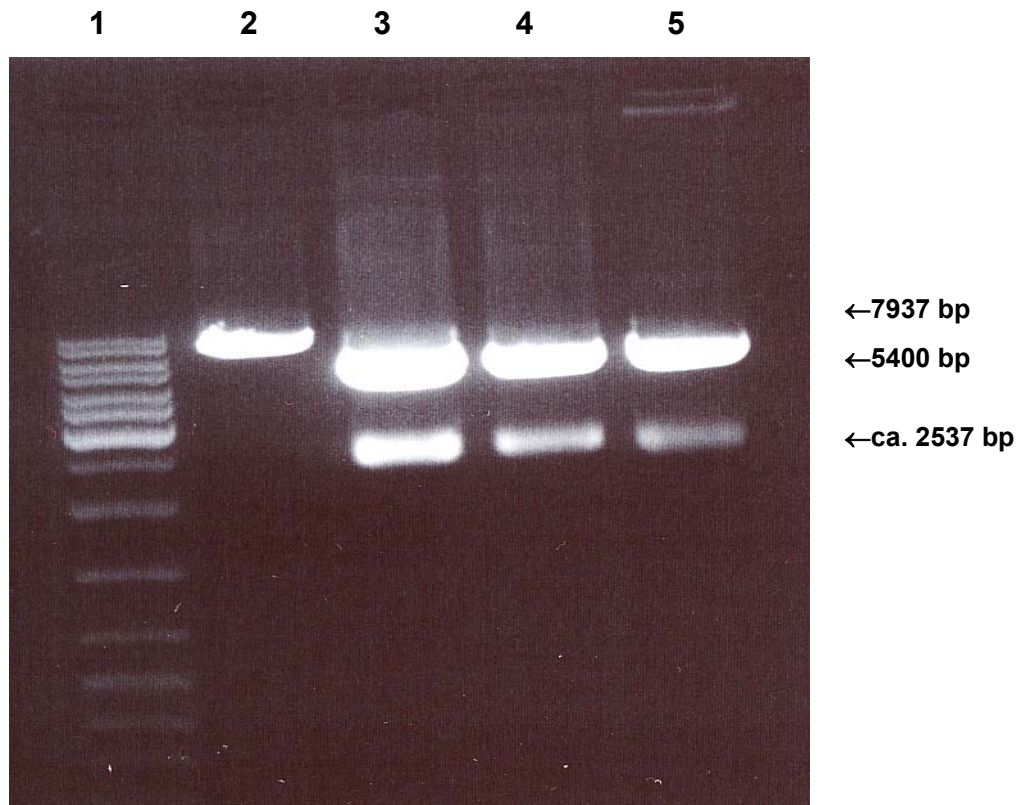


Abb. 13: Agarosegel des Vektors pcDNA3 mit NCAM140 Wildtyp cDNA und NCAM140 Mutanten nach Restriktion mit BAMH1 und XHO1. (1) Molekulargewichtsstandard, (2) ungeschnittener Vektor mit NCAM140 WT Insert (7937 bp), (3) mit BAMH1 und XHO1 geschnittener Vektor (5400 bp) und NCAM140 WT Insert (2537 bp), (4) mit BAMH1 und XHO1 geschnittener Vektor und NCAM140-T781A (2537 bp), (5) mit BAMH1 und XHO1 geschnittener Vektor und NCAM140- δ PEST (2495 bp).

3.2.3. Stabile Transfektion von NCAM negativen B35 Zellen

Die für die stabilen Transfektionen verwendeten NCAM negativen B35 Neuroblastomzellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Patricia Maness, Department of Biochemistry, School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden durch Komplementvermittelte Zellyse als NCAM-negative Zellen selektioniert. Allerdings exprimieren sie dennoch geringe Mengen NCAM auf ihrer Oberfläche (nicht gezeigt). Die Transfektion wurde wie in Kapitel 2.4.2. beschrieben durchgeführt. G-418 resistente Zellklone wurden weiterkultiviert: Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz

(Kap. 2.5.1.) konnten die Zellklone ermittelt werden, die NCAM140 bzw. die mutierten Formen auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb 14).

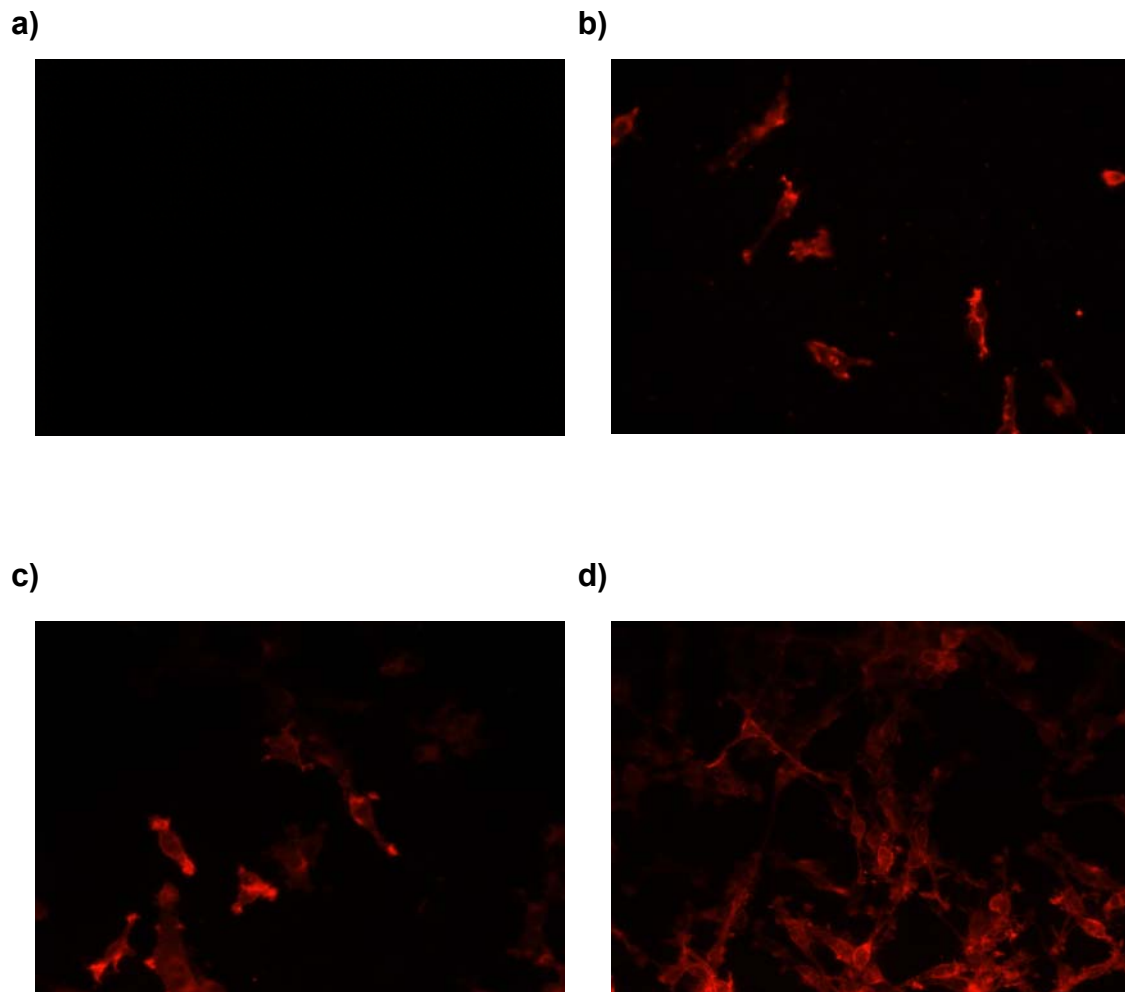


Abb. 14: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse zur Identifikation NCAM140 positiver Klone. a: nicht transfizierte B35 Zellen, b: NCAM140-WT positive Zellklone, c: NCAM- δ PEST positive Zellklone, d: NCAM140-T781A positive Zellklone. Die Zellen wurden nach der Fixierung mit dem Primärantikörper 123C3 und mit Cy3 gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert.

Zellklone, die diese Voraussetzung erfüllten, wurden solange weiterkultiviert, bis ein Teil von ihnen eingefroren werden konnte (Kap. 2.4.3.). Ein weiterer Teil wurde zur Herstellung von Zelllysaten (Kap. 2.4.7.) verwendet. Diese wurden anschließend im Western Blot (Kap. 2.6.7.) auf die Expressionsstärke von NCAM140 hin analysiert. Ziel war es, von den drei verschiedenen Transfektanten Zellklone mit vergleichbarem Expressionsniveau zu finden und für die folgenden Experimente weiterzukultivieren (Abb. 15).

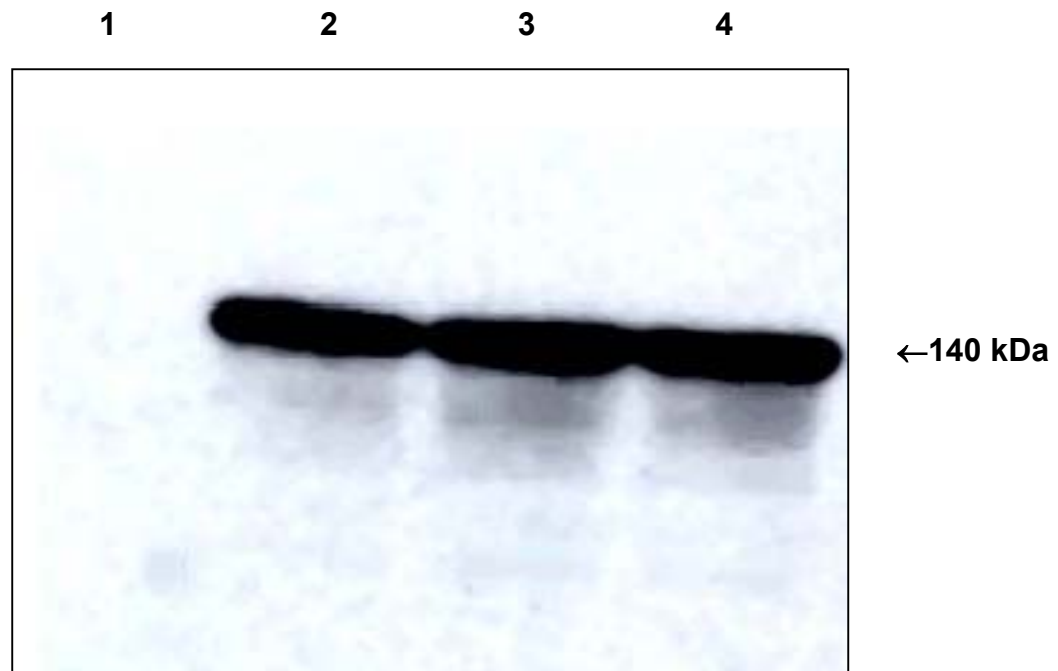


Abb. 15: Vergleich der Expressionsstärke von mit NCAM140 bzw. NCAM140 Mutanten transfizierten Zellklonen. Gleiche Proteinmengen der jeweiligen Zelllysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Im Western blot wurde NCAM140 mit dem Primärantikörper 123C3 und anti-Maus-POD detektiert. (1): nicht transfizierte B35 Zellen, (2): NCAM140-WT, (3): NCAM140- δ PEST, (4): NCAM140-T781A

3.2.4. Untersuchung der Threonin-Phosphorylierung in NCAM140

In einem weiteren Versuch sollte untersucht werden, ob durch die Deletion der PEST Sequenz bzw. den Austausch des Threonins durch Alanin eine verminderte Threonin-Phosphorylierung in den Mutanten NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A gegenüber dem NCAM140-WT feststellbar ist. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Schale für 24 h in mit PLL beschichteten 60 mm Schalen in Kulturmedium kultiviert (Kap. 2.4.1.). Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit OptiMEM Plus (Gibco, Karlsruhe) einmal gewaschen, unter Verwendung von Ripa-Lysispuffer lysiert (Kap. 2.4.7.) und NCAM140 mit jeweils 5 μ g 123C3 Antikörper immunpräzipitiert (Kap. 2.6.2.). Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.6.4.). Unter Verwendung eines anti-

Phosphothreonin-Antikörper als Primärantikörper und anti-Kaninchen-POD als Sekundärantikörper wurde phosphoryliertes Threonin im Western blot detektiert (Kap. 2.6.7.). Hinsichtlich der Bandenstärke konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.5. Untersuchung der Endozytose von NCAM140 in B35 Neuroblastomzellen

Die Endozytose von NCAM140-WT bzw. NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A in B35 Neuroblastomzellen wurde nach einer von Long et al. modifizierten Methode (2001) durchgeführt (Kap. 2.4.6.). Die stabil transfizierten Zellen wurden zwei Tage vor Beginn des Experiments in einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen/ml Zellkulturmedium auf mit PLL beschichteten, runden Deckgläschen ausgesät. Nach 20 bis 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen mit 1 mM dbcAMP in OptiMEM Plus (Kap. 2.4.4.1.) behandelt. Zur Induktion der Endozytose wurden die Zellen nach weiteren 20 bis 24 h für 30 min mit dem in vorgewärmtem Medium verdünnten anti NCAM Antikörper 123C3 (25 μ g/ml OptiMEM Plus) inkubiert und die Endozytose anschließend gestoppt, indem sie auf Eis dreimal mit 4°C kaltem DMEM gewaschen wurden. Die behandelten Zellen wurden dann für 30 min mit einer 8%igen (w/v) Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS wurden die Zellen für 30 min mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert, um zelloberflächenassoziiertes NCAM zu detektieren. Um alle Bindungsstellen des NCAM-Antikörpers auf der Zelloberfläche abzusättigen, wurden die Zellen für 30 min mit einem ungekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Ließ man diesen Schritt aus, so hatte dies keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Daher wurde bei weiteren Experimenten auf den Einsatz des ungekoppelten Zweitantikörpers verzichtet. Die Zellen wurden nachfixiert und permeabilisiert. Zur Detektion endozytierter NCAM-Antikörperkomplexe erfolgte eine Inkubation mit DTAF-gekoppeltem Sekundärantikörper. Nach der Einbettung in Glyzeringelatine wurden die Präparate mit dem Laser Scanning Spectral Confocal Microscop der Fa. Leica analysiert (Abb. 16).

Abb. 16 A: NCAM140-WT

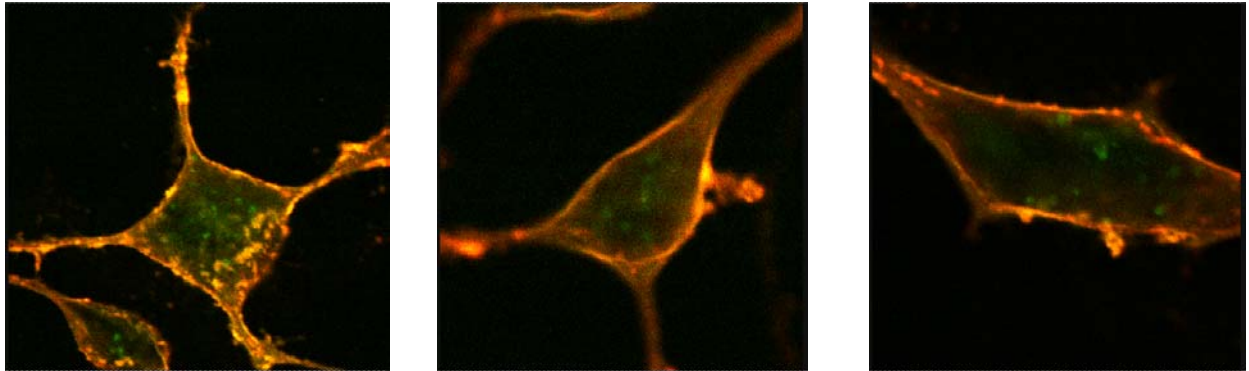


Abb. 16 B: NCAM140- δ PEST

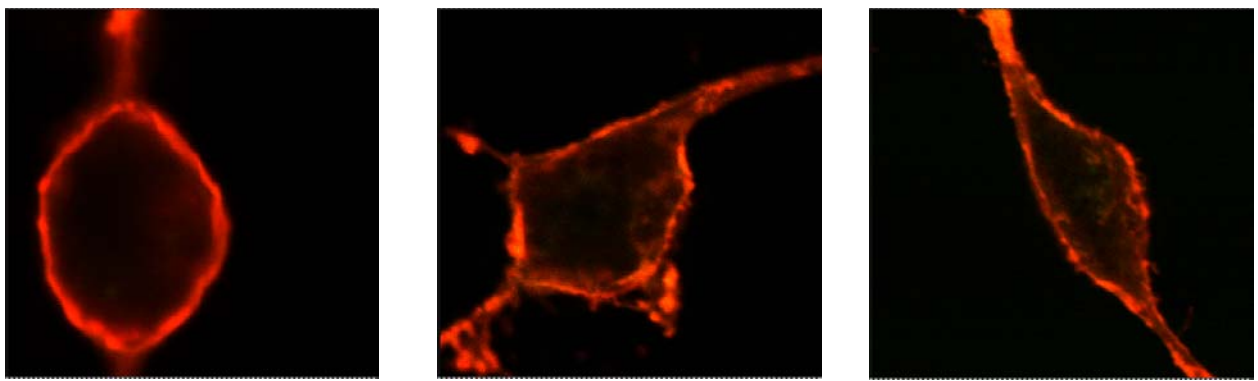


Abb. 16 C: NCAM140-T781A

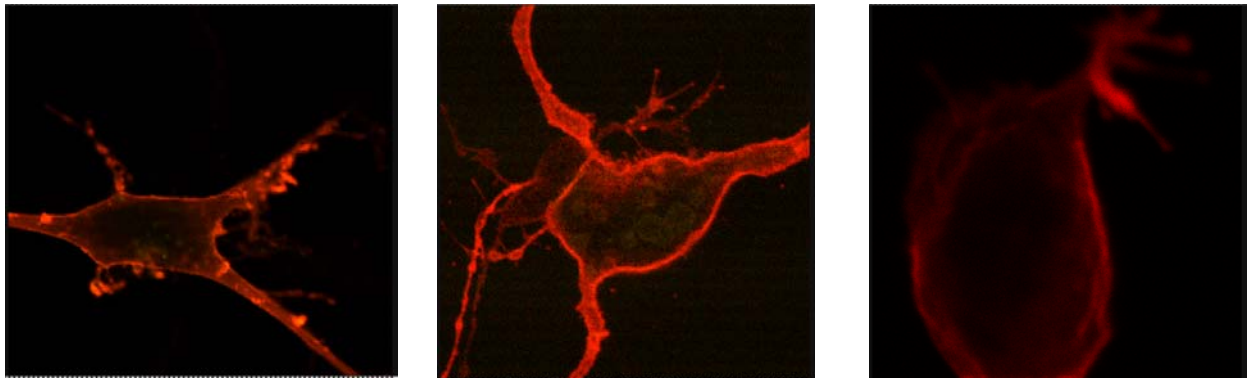


Abb. 16: Endozytose von NCAM140-WT (A), NCAM140- δ PEST (B) und NCAM140-T781A (C) in B35 Neuroblastomzellen. Die Zellen mit 1 mM dbcAMP in OptiMEM Plus inkubiert. Zur Induktion der Endozytose wurden sie für 30 min mit dem anti-NCAM Antikörper 123C3 inkubiert. Die behandelten Zellen wurden nach Fixierung mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert, um zelloberflächenassoziiertes NCAM zu detektieren. Dann wurden sie nachfixiert und permeabilisiert. Zur Detektion endozytierter NCAM-Antikörperkomplexe erfolgte eine Inkubation mit DTAF-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Analyse erfolgte mittels Konfokalmikroskopie.

Es sind deutlich mehr Endozytosevesikel in NCAM140-WT Zellen zu beobachten als in den NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen. Außerdem fällt auf, dass nur im Falle von NCAM140-WT im Bereich der Zellmembranen eine Co-Lokalisation von extrazellulärer (rot) und intrazellulärer (grün) Fluoreszenz besteht, was daraufhin deutet, dass membranassoziierte Bereiche zum Teil ohne und zum Teil nach Permeabilisierung für die Fluorophor-markierten Antikörper zugänglich waren.

Um beurteilen zu können, ob die Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Endozytosevesikel zwischen NCAM140-WT bzw. NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A signifikant sind, wurden die Vesikel innerhalb der Zellen ausgezählt. Für die statistische Auswertung wurde der U-Test für unabhängige Stichproben nach Wilcoxon, Mann und Whitney durchgeführt. Die Anzahl der Endozytosevesikel in den transfizierten Zellen wird in Form eines Boxblots graphisch dargestellt (siehe Anhang). Insgesamt wurden die Vesikel von 59 NCAM140-WT, 46 NCAM140- δ PEST und 48 NCAM140-T781A Transfektanten ausgezählt. Aus der Abbildung wird deutlich, dass die Anzahl der Vesikel in den NCAM140-WT transfizierten Zellen signifikant ($p < 0,001$) höher ist als in den NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen. Das bedeutet, dass die in die cDNA von NCAM140 eingefügten Mutationen, ähnlich wie für apCAM gezeigt (Bailey et al., 1997), einen Einfluss auf die Endozytose von NCAM haben. In Abb. 17 wird das oben beschriebene Ergebnis in Form eines Balkendiagramms vereinfacht dargestellt.

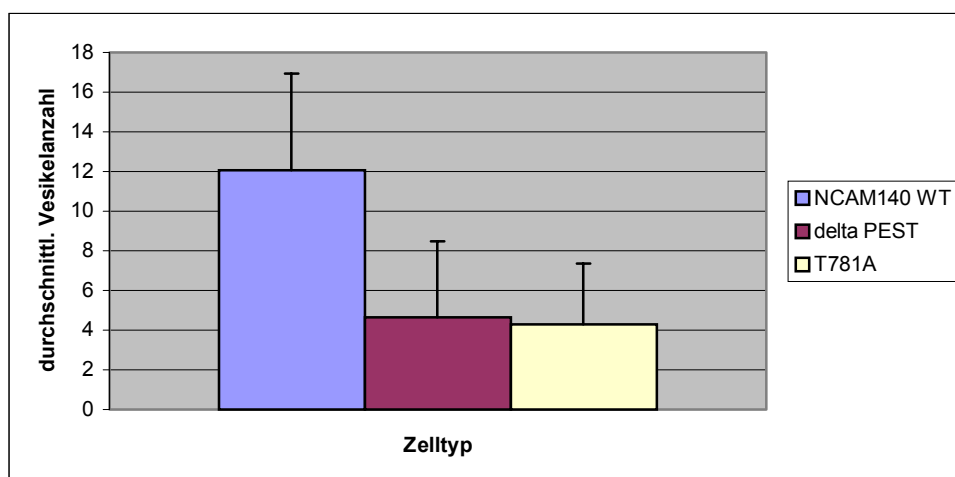


Abb. 17: Darstellung der Anzahl der Endozytosevesikel in den transfizierten Zellen NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A.

Bailey et al. (1997) hatten gezeigt, dass ein Threonin der PEST Sequenz zuerst durch ERK1 phosphoryliert wird, bevor die Endozytose von apCAM140 stattfindet und dass die Inhibierung von ERK1 durch den Inhibitor PD098059 apCAM140 vor der anschließenden Internalisierung schützt. Es sollte daher untersucht werden, ob dies auch auf die Internalisierung von NCAM140 zutrifft. Das Experiment wurde mit NCAM140-WT transfizierten Zellen durchgeführt. Als Inhibitor wurde U0126 eingesetzt, der sowohl die inaktive als auch die aktive Form von MEK blockiert und damit eine vollständigere Hemmung von ERK1 und ERK2 bewirkt. Die Endozytose von NCAM140-WT wurde wie in Kap 2.4.6. beschrieben durchgeführt. Die stabil transfizierten Zellen wurden zur Induktion der Endozytose für 30 min mit dem in vorgewärmtem Medium verdünnten anti NCAM Antikörper 123C3 in An- oder Abwesenheit von U0126 inkubiert und anschließend wie unter 3.2.5. weiterbehandelt. In Abb. 18 wird das oben beschriebene Ergebnis in Form eines Balkendiagramms dargestellt.

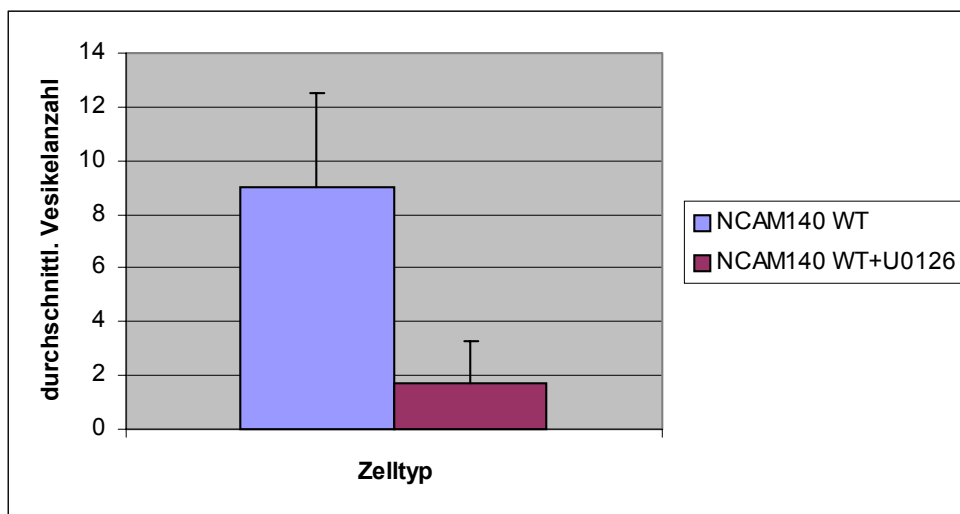


Abb. 18: Darstellung der Anzahl der Endozytosevesikel in den transfizierten Zellen NCAM140-WT und NCAM140-WT, behandelt mit U0126.

Die Anzahl der Endozytosevesikel in den NCAM140-WT Kontrollzellen war im Vergleich zu den mit dem Inhibitor U0126 behandelten NCAM140-WT Zellen deutlich höher, was einen Hinweis darauf gibt, dass auch für die Endozytose von NCAM140 eine vorausgehende Phosphorylierung des in der PEST Sequenz befindlichen Threonins781 durch ERK1 oder ERK2 von Bedeutung ist.

In Abb. 19 A sind exemplarisch drei NCAM140-WT Kontrollzellen dargestellt, in Abb. 19 B drei mit U0126 behandelte NCAM140-WT Zellen.

Abb. 19 A:

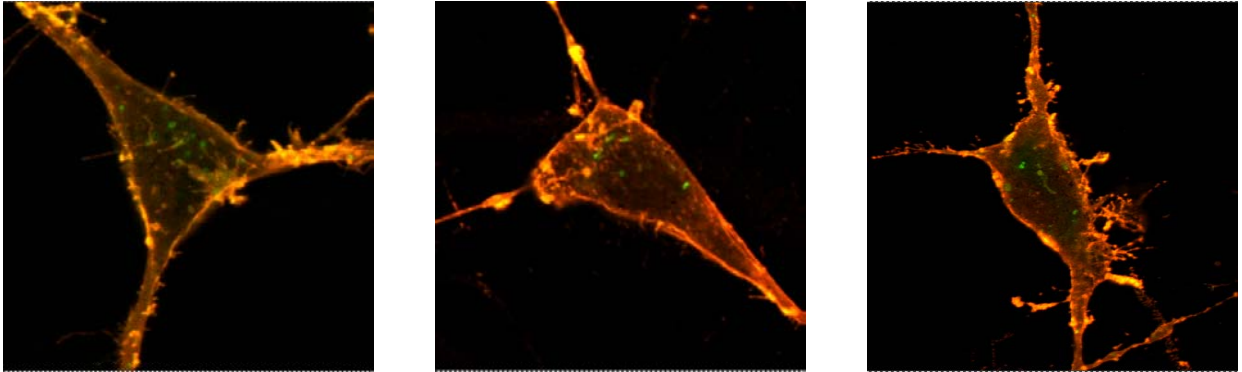


Abb. 19 B:

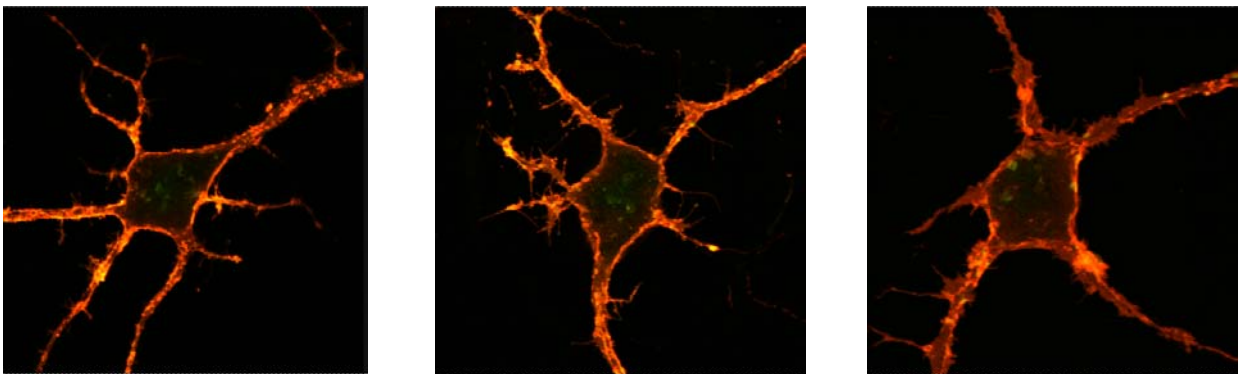


Abb. 19: NCAM140-WT Kontrollzellen (A), NCAM140-WT mit U0126. Die Endozytose von NCAM140-WT wurde wie in Kap 2.4.6. beschrieben durchgeführt. Die stabil transfizierten Zellen wurden zur Induktion der Endozytose für 30 min mit dem in vorgewärmtem Medium verdünnten anti NCAM Antikörper 123C3 in An- oder Abwesenheit von U0126 inkubiert und anschließend wie unter 3.2.5. weiterbehandelt. In den Kontrollzellen befanden sich deutlich mehr Endozytosevesikel als in den mit U0126 behandelten Zellen. Im Gegensatz zu den ebenfalls eine reduzierte Endozytose aufweisenden NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A exprimierenden Zellen ist auch hier bei gehemmter Endozytose in Gegenwart des Inhibitors eine membranassoziierte Co-lokalisierung des extrazellulärer und intrazellulärer Fluoreszenz zu beobachten.

3.2.6. Untersuchung des Einflusses der Deletion der PEST Sequenz und der Mutation T781A von NCAM140 auf das Neuritenwachstum

Bei der Kultivierung der mit 1 mM dbcAMP in OptiMEM Plus (Kap. 2.4.4.1.) behandelten Zellen fiel auf, dass NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierte Zellen längere Neuriten ausbildeten als die NCAM140-WT transfizierten Zellen. Um zu untersuchen, ob die Unterschiede der Neuritenlängen signifikant sind, wurden die Zellen in mit PLL beschichteten 30 mm Schalen in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Schale ausgesät und mit dbcAMP (Kap.2.4.4.1.) ausdifferenziert. Nach 24 h Kultivierung wurde die Länge der Neuriten der mit NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen mit Hilfe des Programms KS100 quantitativ ausgewertet.

Abb. 20 a: NCAM140-WT

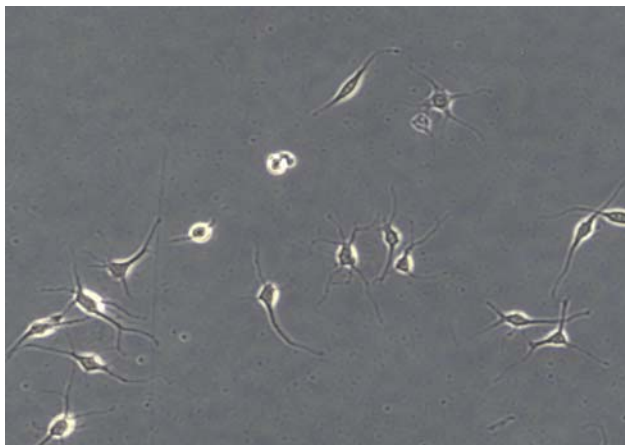


Abb. 20 b: NCAM140- δ PEST

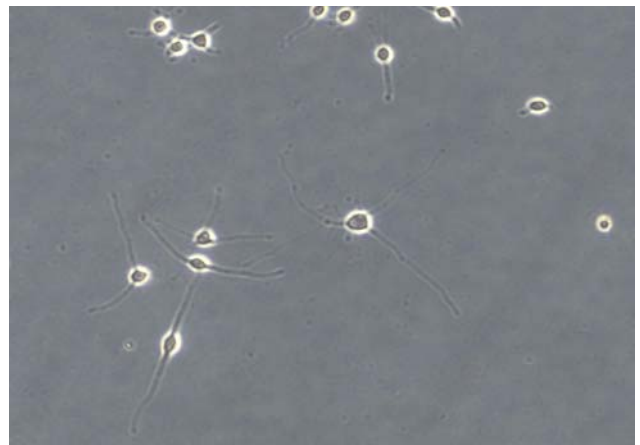


Abb. 20 c: NCAM140-T781A

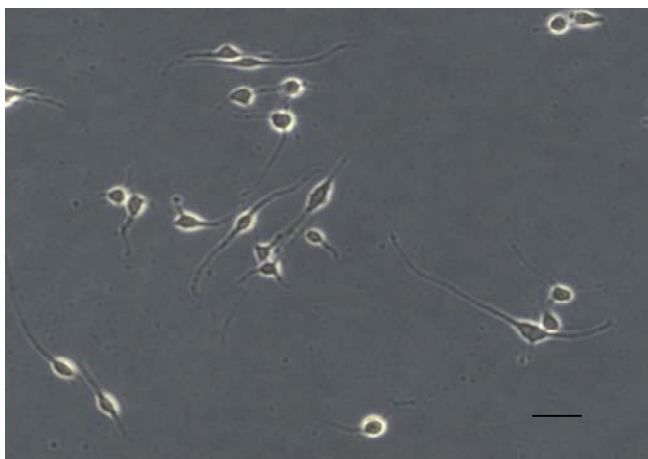


Abb. 20: NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierte Zellen im ausdifferenzierten Zustand (Balken: 20 μ m).

Für die statistische Auswertung wurde der U-Test für unabhängige Stichproben nach Wilcoxon, Mann und Whitney durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, dass die NCAM140- δ PEST und NCAM140-T803A transfizierten Zellen signifikant ($p < 0,001$) längere Neuriten bildeten als die NCAM140-WT transfizierten Zellen. Auffällig war, dass die Unterschiede hinsichtlich der Neuritenlänge nur im ausdifferenzierten Zustand festzustellen war (siehe Anhang). Die Abbildungen 21 A und 21 B machen diesen Sachverhalt deutlich.

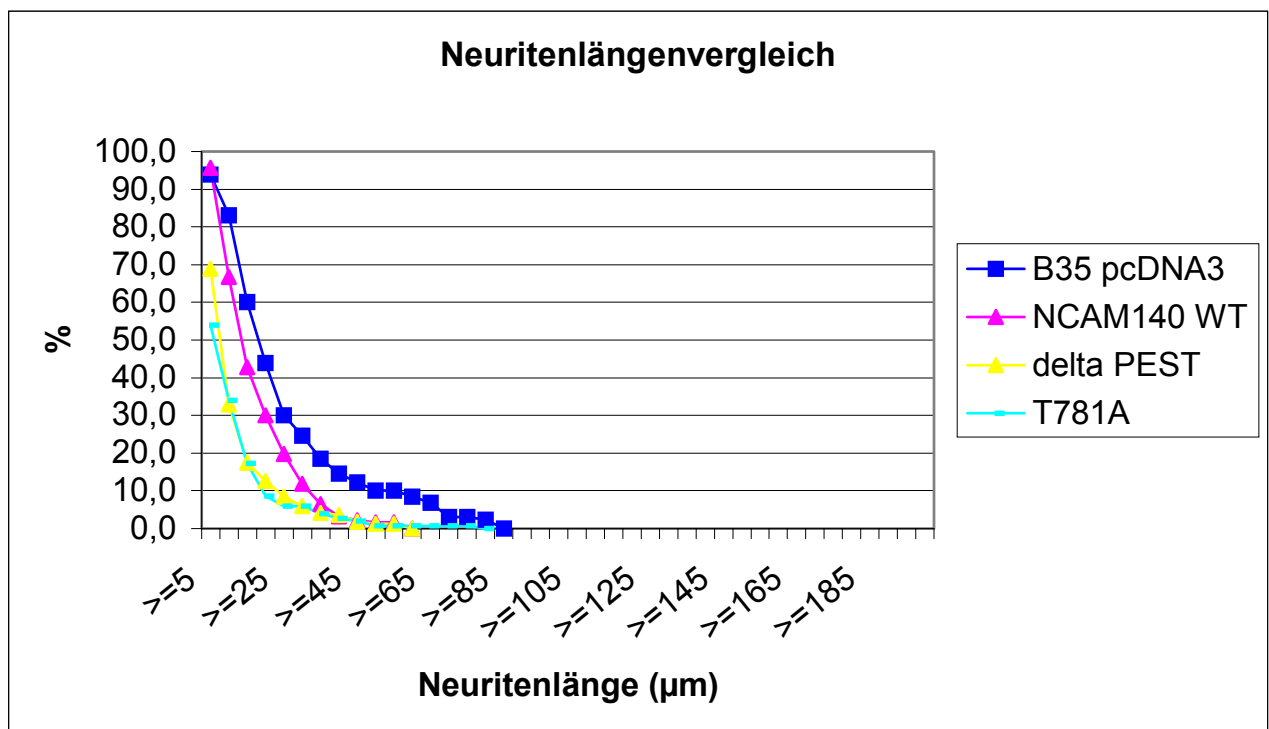


Abb. 21 A: Neuritenlängenvergleich nicht ausdifferenzierter Zellen. Die Zellen wurden in mit PLL beschichteten 30 mm Schalen in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Schale ausgesät. Nach 24 h Kultivierung wurden die Neuriten der mit pcDNA3, NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen mit Hilfe des Programms KS100 zur Quantifizierung von Zeiss gemessen. Hinsichtlich der Neuritenlänge waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

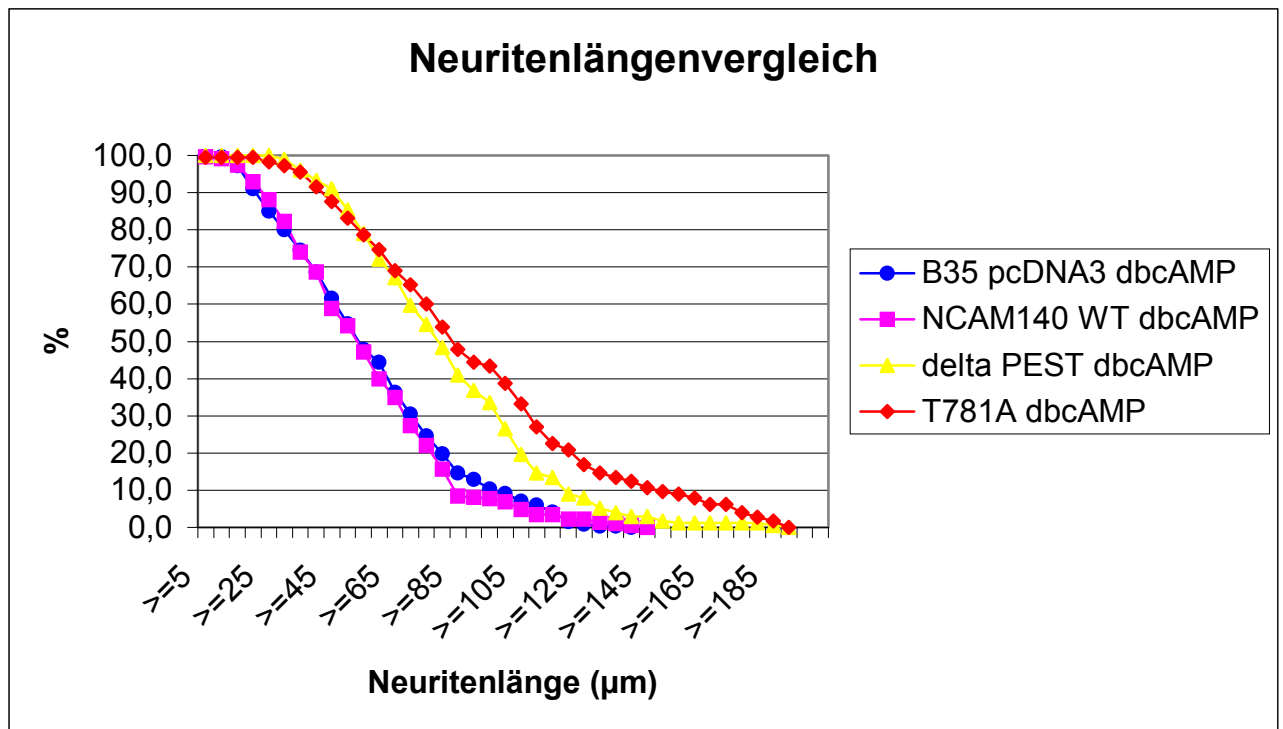


Abb. 21 B: Neuritenlängenvergleich ausdifferenzierter Zellen. Die Zellen wurden in mit PLL beschichteten 30 mm Schalen in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Schale ausgesät und mit dbcAMP ausdifferenziert. Nach 24 h Kultivierung wurden die Neuriten der mit pcDNA3, NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen mit Hilfe des Programms KS100 zur Quantifizierung von Zeiss gemessen. Es bestanden signifikante Unterschiede bezüglich der Neuritenlänge zwischen mit pcDNA3, NCAM140-WT transfizierten Zellen auf der einen Seite und NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen auf der anderen Seite.

Zur Kontrolle wurden die Neuriten transfizierter B35 Neuroblastomzellen gemessen, die zwar noch die G418 Resistenz hatten, NCAM140 aber nicht mehr exprimierten (nachgewiesen mittels Immunfluoreszenz (ohne Abb.) und Western Blot (ohne Abb.)). Es lagen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Neuritenlängen zwischen den Mutanten und den NCAM140-WT transfizierten Zellen vor. Zur Veranschaulichung soll der Wert von 60% gewählt werden: Aus der Graphik A ist ersichtlich, dass 60% aller nicht ausdifferenzierten Zellen Neuriten haben, die länger als 10 bis 25 μm sind.

Aus Graphik B ist ersichtlich, dass bei den ausdifferenzierten Zellen 60% der B35 pcDNA3 und der NCAM140 WT transfizierten Zellen Neuriten ausbilden, die länger als 25 bis 30 μm sind und dass 60% der NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen Neuriten ausbilden, die länger als 85 μm sind.

Die eingefügten Mutationen in die cDNA von NCAM140 scheinen damit einen Einfluss auf die Neuritenlänge der Zellen im ausdifferenzierten, aber nicht im nicht ausdifferenzierten Zustand zu haben.

3.2.7. Zelloberflächenbiotinylierung von NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A

Um auszuschließen, dass die Unterschiede bezüglich der Endozytose und des Neuritenwachstums lediglich auf unterschiedlichen Mengen an zelloberflächenassoziiertem NCAM140 beruhen, wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung der NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen durchgeführt. Die Membranproteine auf der Zelloberfläche wurden mit Sulfo-NHS-LC Biotin biotinyliert (Kap. 2.4.5.1.). Durch einmaliges Waschen mit TBS wurde die Biotinylierung gestoppt, die Zellen anschließend lysiert (Kap. 2.4.7.) und NCAM140 mit jeweils 5 μ g 123C3 Antikörper immunpräzipitiert (Kap. 2.6.2.). Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 2.6.4.). Dafür wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Das zelloberflächenassoziierte NCAM140 wurde im Western blot (Abb. 22) mit Streptavidin konjugierter Peroxidase detektiert (Kap. 2.6.7.). Lane 1 (NCAM140-WT), Lane 2 (NCAM140- δ PEST), und Lane 3 (NCAM140-T781A) zeigen hinsichtlich der Bandenstärke keine signifikanten Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass die Menge an zelloberflächenassoziiertem NCAM140 bei NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen ähnlich ist. Die Lanes 4 (NCAM140-WT), 5 (NCAM140- δ PEST) und 6 (NCAM140-T781A) stellen die Kontrollimmunpräzipitationen dar, in denen die gesamte Menge an NCAM140 mit dem 123C3 Antikörper gegen humanes NCAM140 detektiert wurde. Auch hier sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Die Unterschiede bezüglich der Endozytose und des Neuritenwachstums beruhen demnach weder auf unterschiedlichen Mengen an zelloberflächenassoziiertem NCAM noch auf unterschiedlichen Mengen an gesamtem NCAM.

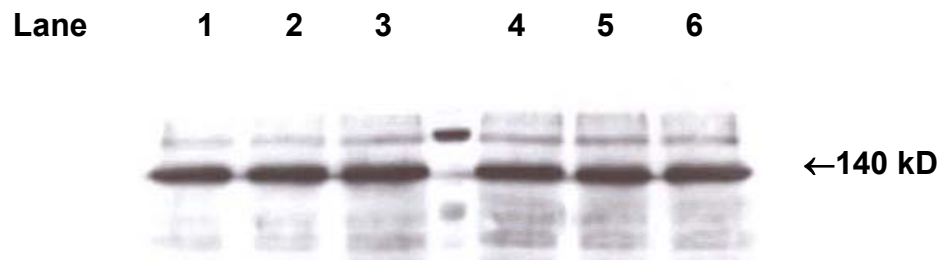


Abb. 22: Zelloberflächenbiotinylierung der NCAM140-WT (Lane 1), NCAM140- δ PEST (Lane 2) und NCAM140-T781A (Lane 3) transfizierten Zellen. Die Membranproteine auf der Zelloberfläche wurden mit Sulfo-NHS-LC Biotin biotinyliert. Durch einmaliges Waschen mit TBS wurde die Biotinylierung gestoppt, die Zellen anschließend lysiert und NCAM140 mit jeweils 5 μ g 123C3 Antikörper immunpräzipitiert. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das zelloberflächenassoziierte NCAM140 im Western blot mit Sreptavidin konjugierter Peroxidase detektiert. Es sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Menge an oberflächenassoziiertem NCAM140 nachweisbar. Lane 4 (NCAM140-WT), 5 (NCAM140- δ PEST) und 6 (NCAM140-T781A) stellen die Kontroll-IPs dar. NCAM140 wurde mit dem 123C3 Antikörper detektiert. Es sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamtgehalts an NCAM140 feststellbar.

3.2.8. Untersuchung des Einflusses der Endozytose auf die Aktivierung von CREB

Schmid et al. (1999) konnten zeigen, dass Clustering von NCAM140 auf der Oberfläche neuronaler Zellen die Phosphorylierung von sowohl ERK1 als auch ERK2 induziert, was im weiteren zur Phosphorylierung von CREB an Serin 133 führt.

Hier sollte untersucht werden, ob die Endozytose von NCAM140 bzw. die Inhibierung der Endozytose von NCAM140 durch Deletion der PEST Sequenz oder Mutation des phosphorylierbaren Threonin-Rests innerhalb der PEST Sequenz Einfluss auf die CREB-Aktivierung hat.

Die Zellen NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A wurden in einer Dichte von $2,5 \times 10^5$ Zellen/Schale für 24 h in mit PLL beschichteten 60 mm Schalen kultiviert (Kap. 2.4.1.). Anschließend wurden sie für weitere 24 h mit 1 mM dbcAMP in OptiMEM Plus inkubiert (Kap. 2.4.4.1.). Zur Induktion der Endozytose wurden die Zellen für 10 min und für 30 min mit dem in vorgewärmtem Medium verdünnten anti NCAM Antikörper 123C3 (25 μ g/ml OptiMEM Plus) inkubiert.

Um die Endozytose zu stoppen, wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit 4°C kaltem DMEM H gewaschen (Kap. 2.4.6.) und unter Verwendung von Lysispuffer zur Aufbereitung von Zellkernproteinen lysiert (Kap. 2.4.7). Bei den Kontrollzellen wurde keine Endozytose induziert. Nach einer Proteinbestimmung wurden gleiche Proteinmengen auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion von CREB bzw. P-CREB wurde ein Western blot mit anti CREB Antikörper (1:1000), der andere mit anti P-CREB Antikörper (1:1000) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde anti Kaninchen-POD in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Abb. 24 zeigt die CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 1), NCAM140- δ PEST (Lane 2) und NCAM140-T781A (Lane 3) transfizierten Zellen ohne 10 minütige Induktion der Endozytose sowie die CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 4), NCAM140- δ PEST (Lane 5) und NCAM140-T781A (Lane 6) transfizierten Zellen bei 10minütiger Induktion der Endozytose. Abb. 23 zeigt die P-CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 1), NCAM140- δ PEST (Lane 2) und NCAM140-T781A (Lane 3) transfizierten Zellen ohne 10 minütige Induktion der Endozytose sowie die P-CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 4), NCAM140- δ PEST (Lane 5) und NCAM140-T781A (Lane 6) transfizierten Zellen bei 10minütiger Induktion der Endozytose. Aus Abb. A und B ist ersichtlich, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CREB-Level und der P-CREB-Level nach einer 10minütigen Induktion der Endozytose bestehen. Gleiche Ergebnisse waren auch nach 30minütiger Induktion der Endozytose festzustellen (Abbildungen nicht gezeigt). Es konnte damit kein Einfluss der Änderung der Endozytose von humanem NCAM140 auf die CREB-Aktivierung in B35 Neuroblastenzellen festgestellt werden.

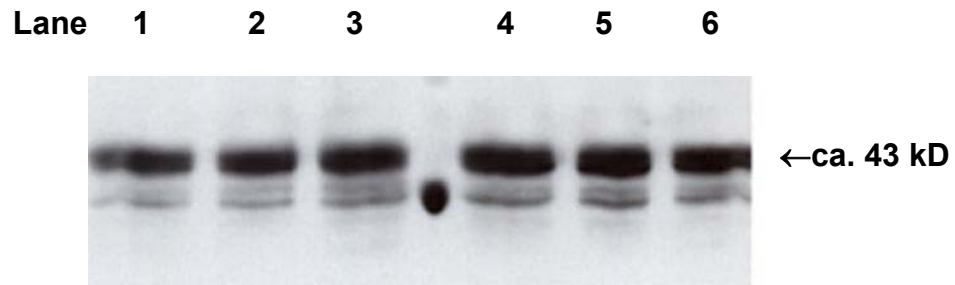


Abb. 23: CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 1), NCAM140- δ PEST (Lane 2) und NCAM140-T781A (Lane 3) transfizierten Zellen ohne 10 minütige Induktion der Endozytose, CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 4), NCAM140- δ PEST (Lane 5) und NCAM140-T781A (Lane 6) transfizierten Zellen bei 10minütiger Induktion der Endozytose. Es sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CREB-Level feststellbar.

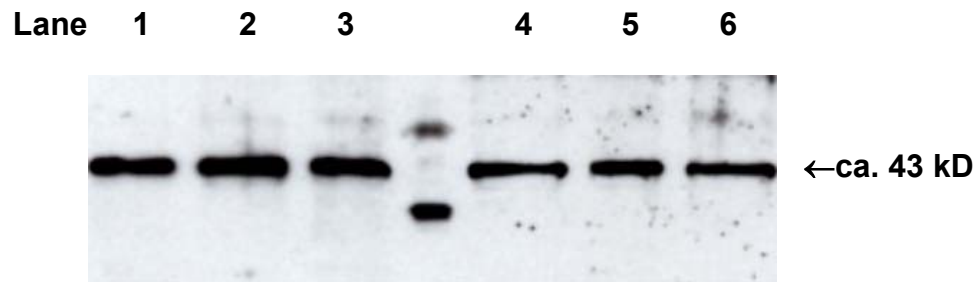


Abb 24: P-CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 1), NCAM140- δ PEST (Lane 2) und NCAM140-T781A (Lane 3) transfizierten Zellen ohne 10 minütige Induktion der Endozytose, P-CREB-Level der NCAM140-WT (Lane 4), NCAM140- δ PEST (Lane 5) und NCAM140-T781A (Lane 6) transfizierten Zellen bei 10minütiger Induktion der Endozytose. Es sind keine signifikanten Unterschiede bezüglich der P-CREB-Level feststellbar.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen untersucht werden, ob die PEST Sequenz im zytoplasmatischen Bereich von NCAM140, ähnlich wie es für apCAM gezeigt wurde, für die Endozytose von NCAM verantwortlich ist. Dafür war zunächst das Untersuchungssystem Oozyten aus *Xenopus laevis* vorgesehen. Aus bestimmten Gründen (s.u.) wurden im Laufe der Arbeit diese Untersuchungen sowie die Untersuchung des Neuritenwachstums und die daran beteiligten Signaltransduktionsprozesse an B35 Neuroblastomzellen untersucht.

³⁵S-Methionin-Markierung von humanen L1- und NCAM140-Proteinen und Untersuchung ihrer Glykosylierung in *Xenopus* Oozyten

Die beiden neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM kommen innerhalb der Zellmembran co-lokalisiert vor, und zwar primär an Kontaktstellen zwischen Neuronen (Pollerberg et al., 1987; 1990). Kadmon et al. (1990a) konnten zeigen, dass L1 und NCAM auf der Zelloberfläche eine cis-Interaktion eingehen. Diese hat verstärkte trans-Interaktionen zur Folge im Vergleich zur L1-L1-Interaktion. Diesen Bindungsmechanismus bezeichnet man auch als „assisted homophilic binding“.

Die L1/NCAM cis-Interaktion wird durch Kohlenhydrate vermittelt (Kadmon et al., 1990b). Des Weiteren konnten Horstkorte et al. (1993) zeigen, dass die von L1 exprimierten oligomannosidischen Kohlenhydrate für eine Lektin-ähnliche Bindung an NCAM verantwortlich sind. Vermutlich ist die oligomannosidische Kohlenhydrate bindende Region von NCAM in der 4. Ig-ähnlichen Domäne lokalisiert. So konnten beispielsweise Horstkorte et al. (1993) zeigen, dass ein synthetisch hergestelltes Peptid, welches in seiner Sequenz einen spezifischen Ausschnitt der 4. Ig-ähnlichen Domäne von NCAM darstellt, die L1/NCAM cis-Interaktion inhibieren kann.

Die L1/NCAM cis-Interaktion ist für das basale Neuritenwachstum von Bedeutung. Unter dem basalen Neuritenwachstum versteht man die Ausbildung und Elongation von Neuriten auf einem inerten Substrat wie PLL in Abwesenheit stimulierender

Agentien. Stimuliertes Neuritenwachstum findet hingegen in Gegenwart von z.B. Extrazellulärmatrixproteinen wie Laminin statt oder wird durch homo- oder heterophile trans-Interaktionen bestimmter Zelloberflächenproteine vermittelt. Horstkorte et al. (1993) konnten zeigen, dass in Gegenwart von oligomannosidischen Kohlenhydraten oder des o.g. synthetischen Peptids aus der 4. Ig-ähnlichen Domäne von NCAM das Neuritenwachstum von auf Poly-L-Lysin kultivierten Kleinhirnneuronen drastisch reduziert ist. Kontroll-Glykokonjugate sowie Kontroll-Peptide inhibieren das Neuritenwachstum dagegen nicht.

Die bereits in den Vektor pNKS2 klonierte cDNA von L1 (Thelen, 1999) konnte sofort für weitere Experimente eingesetzt werden.

Die Integration der für die Experimente benötigten cDNAs von L1 und NCAM140 in den Transkriptionsvektor pNKS2 ermöglichte eine SP6-RNA-Polymerase katalysierte cRNA-Synthese. Die entstandenen Transkripte waren bei der Verwendung des SP6-RNA-Synthese-Kits zu mehr als 80% mit einem 5'-m⁷G(5')ppp(5')-Cap modifiziert, welches die vorzeitige Degradation der cRNA in den Oozyten verhindert (Übersichtsartikel siehe Jacobson und Peltz, 1996).

Zunächst musste sichergestellt werden, dass die *in vitro* synthetisierten cRNAs in den Oozyten auch zu Proteinen translatiert werden. Dazu wurden die entsprechenden Transkripte injiziert. Zum Nachweis der neu entstandenen Polypeptidketten wurde eine metabolische Markierung der Oozyten mit ³⁵S-Methionin durchgeführt. Um die Oozyten möglichst schonend zu behandeln, wurden sie in ³⁵S-Methionin-haltigem Medium kultiviert und somit von einer direkten ³⁵S-Methionin-Injektion abgesehen. Nach Homogenisierung der Zellen erfolgte eine Immunpräzipitation. Die so isolierten Proteine wurden mit Hilfe eines SDS-Gels aufgetrennt und mittels Fluorographie nachgewiesen (Abb. 11).

Die postulierte Interaktion zwischen L1 und NCAM setzt voraus, dass L1 oligomannosidische Kohlenhydrate besitzt. Das Glykosylierungsmuster eines Proteins kann von Zelltyp zu Zelltyp variieren, da es von der jeweiligen Ausstattung einer Zelle mit Glycosyltransferasen abhängig ist. Es sollte daher überprüft werden, welche Kohlenhydratstrukturen auf den in den Oozyten exprimierten Proteinen L1 und NCAM140 vorhanden waren. Dazu wurde nach Injektion der cRNAs von L1 und NCAM eine metabolische Markierung der Oozyten mit ³⁵S-Methionin durchgeführt und beide Proteine immunpräzipitiert. Ein Teil der Präzipitate wurde dann mit Endoglykosidase H behandelt. Dieses Enzym spaltet Kohlenhydrate vom „High

Mannose- und Hybrid-Typ“, aber keine komplexen Kohlenhydrate von Proteinen ab. Ein weiterer Teil der Präzipitate wurde mit PNGase F behandelt. Dieses Enzym spaltet neben oligomannosidischen und hybriden Kohlenhydraten auch die komplexen Kohlenhydrate von Proteinen ab. Die Reaktionsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie sichtbar gemacht (Abb. 11).

Das immunpräzipitierte L1 hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 200 kD (Abb. 11), das immunpräzipitierte NCAM140 eines von ca. 140 kD. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die L1 cRNA als auch die NCAM140 cRNA zu immunpräzipitierbaren Translationsprodukten führen. Wie in Abb. erkennbar ist, führte die Behandlung mit Endoglykosidase H bei L1 zur Entstehung einer zweiten Bande, die unter dem apparenten Molekulargewicht von 200 kDa lag. Es scheinen auch in Oozyten Endoglykosidase H-sensitive N-Glycane auf L1 zu existieren, wenn auch nur auf einer Subpopulation aller L1-Moleküle, da die 200 kD Bande auch nach der Behandlung mit Endoglykosidase H noch sichtbar ist. Durch eine Behandlung mit PNGase F entstand eine weitere Bande von noch niedrigerem Molekulargewicht. L1 trägt daher in Oozyten wie auch in der Maus (Fahrig et al., 1990) noch komplexe Kohlenhydrate. Von NCAM ist bekannt, dass es Kohlenhydrate vom komplexen Typ trägt. Es wäre also zu erwarten, dass nach Behandlung mit PNGase F eine zweite Bande mit niedrigerem Molekulargewicht sichtbar wird, die das Vorhandensein von PNGase F-sensitiven komplexen Kohlenhydraten bei NCAM140 in Oozyten beweist. Dies konnte hier aber nicht bestätigt werden (Abb. 11). Um die Ursache klären zu können, hätten die Versuche wiederholt und die Versuchsbedingungen gegebenenfalls modifiziert werden müssen, jedoch traten erhebliche Probleme bei der Verwendung des Untersuchungssystems der Oozyten auf.

Da sich die Haltung der Frösche als schwierig erwies und die Qualität der Oozyten starken saisonalen Schwankungen unterlag, konnte einer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nur unzureichend Folge geleistet werden. Daher wurden die weiteren Experimente an B35 Neuroblastomzellen, die nativ kein bzw. nur wenig NCAM auf der Zelloberfläche exprimieren, durchgeführt.

Dies setzte allerdings ein Umklonieren der NCAM140 cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor voraus.

Für die Experimente in dieser Arbeit wurde der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3 (Abb. 12) gewählt, da dieser laut Herstellerangaben besonders für die stabile und transiente Transfektion von eukaryotischen Wirtszellen mit cDNA geeignet ist. Der Vektor enthält einen Replikationsursprung sowie ein Ampicillinresistenz-Gen zur Propagierung in *E. coli*. T7 und SP6 Promotor dienen der Sense und Antisense *in vitro* Transkription.

Weiterhin besitzt der Vektor einen CMV (humanes Cytomegaliovirus) Promotor/Enhancer, der die Expression des inserierten Gens kontrolliert. Die Translation beginnt mit dem ersten codierenden ATG des in die MCS inserierten Gens. Das BGH (bovines Wachstumshormon) Polyadenylierungssignal bewirkt die Polyadenylierung der transkribierten mRNA. Des weiteren enthält der Vektor einen Neomycin Resistenzmarker, der durch einen SV 40 Promotor kontrolliert wird und die stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen gewährleistet.

Einbau von Schnittstellen in das NCAM140 Insert

Die cDNA für humanes NCAM140 in dem pGEM3 Vektor wurde uns von Dr. Rita Gerady-Schahn (MH Hannover) zur Verfügung gestellt. Um die NCAM140 cDNA in den Vektor pNKS2 für die Versuche an Oozyten und den Vektor pcDNA3 für die Versuche an B35 Neuroblastomzellen überführen zu können, mussten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BAMHI* und *XHOI* in die cDNA eingebaut werden. Dies geschah mittels PCR, wobei die Primer die Schnittstellen für die oben genannten Restriktionsenzyme enthielten. Das entstandene PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die spezifische NCAM140 Bande aus dem Agarosegel extrahiert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *BAMHI* und *XHO* geschnitten und aufgereinigt. Die cDNA hatte die erwartete Größe von 2537 bp (Abb. 13) und konnte nach Sequenzierung mit Hilfe des pGEM[®]-T Vektor-Systems in die Vektoren pNKS2 und pcDNA3 überführt werden (siehe Kap. 3.1.1. – 3.1.3.).

Es stellte sich heraus, dass der für die PCR bei der Fa. MWG synthetisierte Primer 5'CCG CTC GAG TCA TGC TTT GCT CTC GTT CTC 3' zwei ungewollte Mutationen enthielt, die leider unbemerkt blieben: 5'CCG CTC TCA TGA TTT GCT CTC GTT CTA 3'

Die Mutation TGA ist eine stille Mutation, die bei der Proteinsynthese keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz gehabt hätte. Die Mutation CTA ist allerdings ein Stopp-Codon, sodass die hier verwendete NCAM140 cDNA eine im zytoplasmatischen Bereich um 6 Aminosäuren verkürzte Sequenz aufweist. Da dieser Primer für die PCR sowohl der NCAM140-WT cDNA als auch der beiden erzeugten Mutanten NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A verwendet wurde, wiesen alle drei NCAM-Formen die verkürzte Sequenz auf.

Kolkova et al. (2000) konnten an NCAM140 der Ratte zeigen, dass die Aminosäurereste Thr-Glu-Val-Lys-Thr (839 – 843) im C-terminalen Teil der zytoplasmatischen Region von NCAM140 essentiell für das Neuritenwachstum ist. Dies konnte für humanes NCAM140 bisher noch nicht gezeigt werden. Die cDNA Sequenzen von NCAM140 aus Ratte und humanem NCAM140 weisen zwar große Homologien auf, sind aber nicht vollkommen identisch. Des Weiteren ist die cDNA Sequenz von NCAM140 aus Ratte länger. Beim genauen Vergleich der cDNA Sequenzen zeigte sich, dass die in humanem NCAM140 vergleichbaren Sequenzen, die bei der NCAM140 cDNA der Ratte für das Neuritenwachstum essentiell sind, durch die unentdeckte Mutation der in der Arbeit verwendeten NCAM140 cDNA nicht betroffen war. Zur Sicherheit wurden NCAM negative B35 Zellen erneut mit der vollständigen cDNA von NCAM140 transfiziert. Anschließend wurden die mit der mutierten NCAM140 cDNA transfizierten Zellen mit den mit der vollständigen NCAM140 cDNA transfizierten Zellen sowohl hinsichtlich der Endozytose als auch bezüglich des Neuritenwachstums miteinander verglichen. Da die Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede zeigten, kann ein Einfluss der ungewollten Mutationen auf das Neuritenwachstum nahezu ausgeschlossen werden. Dennoch müssen die Experimente mit den vollständigen cDNA Konstrukten wiederholt werden¹. Dies bezieht sich sowohl auf die NCAM140-WT cDNA als auch auf die beiden erzeugten Mutanten NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A.

Um die Integration des NCAM140 Inserts in den Transkriptionsvektor pNKS2 und den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 zu vereinfachen, wurde es zuerst in den pGEM[®]-T Vektor eingebaut.

¹Ein Einfluss der Mutationen zumindest auf das Neuritenwachstum konnte durch das Wiederholen der Experimente mit den vollständigen cDNA Konstrukten inzwischen ausgeschlossen werden.

Das pGEM[®]-T Vektor-System (Abb. 7) ist besonders für das Klonieren von PCR-Produkten geeignet. Der Vektor ist so präpariert, dass er, geschnitten mit *EcoR* V, an beiden Enden ein 3' terminales T aufweist. Diese einzelnen 3'-T Überhänge in der Insertionsseite steigern die Ligationseffizienz eines PCR-Produkts in das Plasmid, da dieses nicht rezirkularisieren kann. Nötig für diese Art der Klonierung ist die Verwendung einer thermostabilen Polymerase, die kompatible Überhänge in dem zu klonierenden PCR-Produkt schafft. Der Vektor enthält einen Replikationsursprung sowie ein Ampicillinresistenz-Gen zur Propagierung in *E. coli*. Die kodierende Sequenz des zu transkribierenden Gens wird in die multiple Klonierungsstelle (MCS) eingebaut.

Nach Insertion der NCAM140 cDNA mittels Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *BAMH*1 und *XHO*1 wurden Vektor und NCAM140 cDNA Insert ligiert. Anschließend wurden kompetente *DH5* α -Bakterien mit einem Teil des Ligationsansatzes transformiert und auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte kultiviert. Ampicillinresistente Klone wurden in einer Flüssigkultur amplifiziert und ihre Plasmid-DNA mittels Minipräparation isoliert. Durch Doppelrestriktion mit den beiden Enzymen *BAMH*1 und *XHO*1 und anschließende Auftrennung im Agarosegel konnte die erfolgreiche Integrierung des NCAM140 cDNA Inserts in den Vektor überprüft werden (Abb. 8).

Erzeugung von NCAM140 Mutanten

Um zu untersuchen, ob NCAM140 ähnlich wie apCAM140 durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden kann und ob die der PEST Sequenz von apCAM in *Aplysia* stark ähnelnde, im cytoplasmatischen Teil gelegene Sequenz von NCAM140 für die Endozytose von Bedeutung ist, wurden zwei verschiedene NCAM140 Mutanten erzeugt und bezüglich der Endozytose mit dem NCAM140 Wildtyp verglichen.

Erzeugung der NCAM140 Mutante NCAM- δ PEST

Die PEST Sequenz HTEPNETTPLTEPE (Aminosäuren 774-787) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion deletiert. Als PCR-Produkt entstand ein linearer, um 42 Basenpaare verkürzter Vektor, der anschließend religiert werden musste. In der Literatur (current protocols in molecular biology) wird diese Reaktion als nicht einfach beschrieben, da der Vektor in einer ersten Reaktion an seinen 5'-Enden phosphoryliert werden muss, um in einer zweiten Reaktion – einer „Blunt End“ Ligation mit glatten Enden - religiert zu werden. Um die Schwierigkeiten der Phosphorylierungsreaktion zu umgehen, wurden 5'-Phosphat modifizierte Primer verwendet. Der zum 5'-3'-DNA-Strang komplementäre, mit 5'-Phosphat modifizierte Primer wurde so gewählt, dass er der Basensequenz vor der zu deletierenden PEST-Sequenz entsprach. Der zum 3'-5'-Strang komplementäre Primer hingegen wurde so gewählt, dass die Amplifizierung vor der PEST-Sequenz endete. Das entstandene Reaktionsprodukt der PCR trug somit phosphorylierte Enden. Dadurch wurde die anschließende Religation des Vektors erheblich vereinfacht (Kap. 3.2.2.1.).

Erzeugung der NCAM140 Mutante NCAM140-T781A

Die PEST Sequenz von apCAM in *Aplysia* beinhaltet eine Konsensussequenz für MAP-Kinasen. Innerhalb dieser Sequenz bewirkt die durch ERK phosphorylierbare Aminosäure Threonin in ihrem phosphorylierten Zustand die Endozytose von apCAM140.

Die PEST Sequenz HTEPNETTPLTEPE (Aminosäuren 774-787) von NCAM140, die sogar einen höheren „Rest-Score“ als apCAM beinhaltet (Bailey et al., 1997) eine Sequenz, die der Konsensussequenz für MAP-Kinasen entspricht. Um der Frage nachgehen zu können, ob das Threonin781 dieser Sequenz (TPL) auch bei der Endozytose von NCAM140 eine Rolle spielt, wurde in einem weiteren Konstrukt das Basentriplett ACG, die für die Aminosäure Threonin codiert, durch eine für die Aminosäure Alanin codierende Basensequenz GCG substituiert. Nötig war für diese Mutation nur der Austausch einer Base: A \Rightarrow G. Die Mutation wurde mit Hilfe des

QuickChange™ site-directed Mutagenesis Kits der Fa. Quiagen durchgeführt (Kap. 3.2.2.2.).

Stabile Transfektion von NCAM negativen B35 Neuroblastomzellen

Die für die stabilen Transfektionen verwendeten NCAM negativen B35 Neuroblastomzellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Patricia Maness, Department of Biochemistry, School of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden durch Komplement-vermittelte Zellyse als NCAM-negative Zellen selektioniert. Allerdings exprimieren sie dennoch geringe Mengen NCAM auf ihrer Oberfläche (nicht gezeigt).

Die nach der Transfektion G-418 resistenten Zellklone mit ähnlichem Expressionsniveaus von NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A (Abb. 15) wurden für weitere Experimente kultiviert.

Untersuchung der Endozytose von NCAM140 in B35 Neuroblastomzellen

Um die NCAM-vermittelte Signaltransduktion untersuchen zu können, ist eine Vielzahl von Methoden entwickelt worden.

Eine weit verbreitete Methode ist ein Co-Kultur-System, in dem primäre Neuronen oder Zellen der Ratten-Pheochromocytoma Zelllinie in einer niedrigen Zelldichte auf der Oberfläche von Monolayern von NCAM-exprimierenden Fibroblasten ausgesät werden. Dieses System erlaubt homophile trans-Interaktionen zwischen NCAM der Neuronen und NCAM der Fibroblasten (Williams et al., 1994, Kolkova et al., 2000, Jessen et al., 2001). Es birgt allerdings das Problem, dass Faktoren, die in das Kulturmedium gegeben werden, ihren Effekt nicht über die Neuronen oder PC12 Zellen, sondern über die Fibroblasten ausüben können.

Eine weitere Möglichkeit zur NCAM-Stimulierung ist der Einsatz löslicher rekombinanter Proteine, welche die gesamte extrazelluläre Domäne von NCAM oder verschiedene Teile aus dieser Domäne umfassen. Diese Moleküle binden an NCAM

und imitieren so eine homophile Interaktion. Auch Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von NCAM, deren Einsatz auch in Experimenten dieser Arbeit zum Tragen kam, sind für seine Stimulation (Beggs et al., 1997, Krushel et al., 1998) geeignet, wobei der Mechanismus anders ist: in diesem Fall erfolgt die Stimulierung durch cis-Vernetzung von NCAM-Molekülen auf der Zelloberfläche. Allerdings scheinen beide - cis- und trans-Interaktionen - zumindest ähnliche Signalwege auszulösen.

Für die Untersuchung der Endozytose von NCAM140-WT bzw. NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A in B35 Neuroblastomzellen wurden die stabil transfizierten Zellen in einer Dichte von $0,8 \times 10^5$ Zellen/ml Zellkulturmedium auf mit PLL beschichteten, runden Deckgläschen ausgesät. Nach 20 bis 24 Stunden Kultivierung wurden die Zellen mit 1 mM dbcAMP in OptiMEM Plus behandelt. Zur Induktion der Endozytose wurden die Zellen nach weiteren 20 bis 24 h für 30 min mit dem in vorgewärmtem Medium verdünnten anti NCAM-Antikörper 123C3 inkubiert und die Endozytose anschließend gestoppt. Die behandelten Zellen wurden fixiert und mit Cy3-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert, um zelloberflächenassoziiertes NCAM zu detektieren. Um alle Bindungsstellen des NCAM-Antikörpers auf der Zelloberfläche abzusättigen, wurden die Zellen für 30 min mit einem ungekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Abweichend von der nach Long et al. (2001) beschriebenen Methode wurde auf die Inkubation mit dem ungekoppelten Zweitantikörper in weiteren Experimenten verzichtet, da das Auslassen dieses Schrittes keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Offensichtlich reichte die Konzentration des Cy3-gekoppelten Zweitantikörpers aus, um alle Bindungsstellen des NCAM-Antikörpers abzusättigen. Die Zellen wurden nachfixiert und permeabilisiert. Zur Detektion endozytierter NCAM-Antikörperkomplexe erfolgte eine Inkubation mit DTAF-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels Konfokal-Laser-Mikroskopie (Abb. 16)

Es konnte festgestellt werden, dass deutlich mehr Endozytosevesikel in NCAM140-WT Zellen zu beobachten waren als in den NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen. Das Auszählen der Endozytosevesikel sowie die anschließende statistische Analyse zeigten, dass die Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Endozytosevesikel zwischen NCAM140-WT bzw. NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A signifikant waren (Abb. 17). Die Beobachtungen entsprechen den von Bailey et al. (1997) erzielten Ergebnissen bei der Untersuchung der Endozytose von

apCAM. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die 5-Hydroxytryptamin-induzierte (Serotonin-induzierte) Internalisierung von apCAM140 durch entweder die Deletion der innerhalb der zytoplasmatischen Domäne befindlichen PEST Sequenz oder der Austausch von Threonin889 und Threonin923, den möglichen Phosphorylierungszielen durch die MAPK, in Alanin inhibiert wurde. Im Gegensatz zu den von Bailey et al. (1997) gezeigten Ergebnissen reichte bei NCAM140 allein der Austausch des Threonin781 durch Alanin aus, um die Endozytose von NCAM140 deutlich zu reduzieren.

Nur im Falle von NCAM140-WT bestand im Bereich der Zellmembranen eine Co-Lokalisation von extrazellulärer (rot) und intrazellulärer (grün) Fluoreszenz, was zu gelb fluoreszierenden Membranen führt und daraufhin deutet, dass membranassoziierte Bereiche zum Teil ohne und zum Teil nach Permeabilisierung für die Fluorophor-markierten Antikörper zugänglich waren. In der einschlägigen Literatur bezüglich der Endozytose von L1, apCAM und NCAM wurde auf eventuelle Co-Lokalisationen nicht weiter eingegangen, sodass über deren Entstehung nur gemutmaßt werden kann. Es kann sich dabei um Vesikel, evtl. coated vesicles, handeln, die sich bei der Unterbindung der 30 minütigen Endozytose gerade erst formiert, aber noch nicht vollständig von der Plasmamembran abgeschnürt haben. Daher waren sie teilweise für den Cy3-gekoppelten Zweitantikörper zugänglich. Nach Permeabilisierung konnte der DTAF-gekoppelte Zweitantikörper durch die Membranen dringen. Die anschließende konfokalmikroskopische Betrachtung der Präparate zeigte durch gelblich dargestellte Membran- oder Vesikelstrukturen die Co-Lokalisation von extrazellulärer (rot) und intrazellulärer (grün) Fluoreszenz.

Bailey et al. (1997) hatten gezeigt, dass T889 und T923 der PEST Sequenz zuerst durch ERK1 phosphoryliert werden, bevor nach Ubiquitin-abhängiger Proteolyse in der cytoplasmatischen Domäne die Endozytose von apCAM140 stattfindet und dass die Inhibierung von ERK1 durch den Inhibitor PD098059 apCAM140 vor der anschließenden Internalisierung schützt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob dies auch auf die Internalisierung von NCAM140 zutrifft (Kap. 3.2.5.). Das Experiment wurde mit NCAM140-WT transfizierten Zellen durchgeführt. Als Inhibitor wurde U0126 eingesetzt, der sowohl die inaktive als auch die aktive Form von MEK blockiert und damit eine vollständigere Hemmung von Erk1 und ERK2 bewirkt. Die NCAM140-WT Zellen wurden zur Induktion der Endozytose für 30 min mit anti NCAM Antikörper 123C3 in An- oder Abwesenheit von U0126 inkubiert

und anschließend wie in Kap. 3.2.5. weiterbehandelt. Die Anzahl der Endozytosevesikel in den NCAM140-WT Kontrollzellen war im Vergleich zu den mit dem Inhibitor U0126 behandelten NCAM140-WT Zellen deutlich höher (Abb. 18), was einen Hinweis darauf gibt, dass auch für die Endozytose von NCAM140 eine vorausgehende Phosphorylierung des in der PEST Sequenz befindlichen T781 durch ERK1 oder ERK2 von Bedeutung ist. Die Rolle der MAPK und die eventuelle Phosphorylierung der Threonine 775, 780, 784 innerhalb der PEST Sequenz müssen zukünftig durch weitere Experimente, z.B. durch den Nachweis der NCAM-Phosphorylierung durch einen in vitro Assay mit MAPK, gesichert werden. Bailey et al. (1997) untersuchten die Veränderung der Internalisierung von apCAM140 durch Inhibierung der MAPK mittels gold-markierter Antikörper und anschließender elektronenmikroskopischer Auszählung der internalisierten Goldpartikel. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von anti Phospho-Threonin-Antikörpern. Bei der Auftrennung gleicher Proteinmengen von NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST, NCAM140-T781A und NCAM140-WT nach Behandlung mit U0126 auf der einen Seite und ohne Behandlung auf der anderen Seite im SDS-Gel und anschließender Inkubation der aufgetrennten Proteine mit einem anti Phospho-Threonin-Antikörper im Western blot, müsste eine Detektion schwächerer Banden bei den Mutanten und bei den mit U0126 behandelten NCAM140-WT Zellen einen geringeren Anteil an phosphorylierten Threoninen widerspiegeln. Allerdings erwies sich der Einsatz von anti Phospho-Threonin-Antikörpern als wenig effektiv. Anscheinend ist die Sensitivität dieser Methode nicht ausreichend, um geringe Unterschiede in der Phosphorylierung von Threoninen darstellen können. Die NCAM140 Proteinsequenz weist zahlreiche Threonine als potentielle Phosphorylierungsziele auf, sodass der Wegfall eines einzigen Threonins als potentielles Phosphorylierungsziel nur mit sehr sensitiven Methoden nachzuweisen ist. Diese Möglichkeit bietet die Methode der ³²Phosphat-Markierung (siehe Dissertationsschrift Petra Heiland, 1998), die wesentlich sensitiver ist.

Eine weitere Möglichkeit ist die Herstellung eines weiteren NCAM140 cDNA Konstrukts, bei dem das T781 nicht durch ein Alanin, sondern ein Aspartat ersetzt wird. Dies ist eine gängige Methode (Thelen et al., 2002), mit der eine dauerhafte Phosphorylierung imitiert wird. Bei Richtigkeit der Theorie müsste gezeigt werden können, dass trotz Inhibierung der MAPK die Endozytose im Vergleich zum NCAM140-WT nicht verringert ist.

Untersuchung des Einflusses der Deletion der PEST Sequenz und der Mutation T781A von NCAM140 auf die Aktivierung von CREB und auf das Neuritenwachstum

Es sollte untersucht werden, ob die Endozytose von NCAM140 bzw. die Inhibierung der Endozytose von NCAM140 durch Deletion der PEST Sequenz oder Mutation des phosphorylierbaren Threonins innerhalb der PEST Sequenz Einfluss auf die CREB-Aktivierung hat.

Die NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A exprimierenden Zellen wurden wie für die Untersuchung der Endozytose behandelt. Nach 10 min und nach 30 min Endozytosezeit wurden sie mit dem anti NCAM Antikörper 123C3 (25 μ g/ml OptiMEM Plus) inkubiert. Anschließend wurden sie nach Abnahme des Mediums dreimal mit 4°C kaltem DMEM H gewaschen und unter Verwendung von Lysispuffer zur Aufbereitung von Zellkernproteinen lysiert. Bei den Kontrollzellen wurde keine Endozytose induziert. Gleiche Proteinmengen wurden auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferriert. Zur Detektion von CREB bzw. P-CREB wurde ein Western blot mit anti CREB Antikörper, der andere mit anti P-CREB-Antikörper inkubiert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Schmid et al. (1999), der eine Aktivierung von CREB 10 min nach Stimulierung durch das Clustering von NCAM140 auf der Oberfläche neuronaler Zellen sowohl durch anti NCAM-Antikörper (FAB-Fragmente) als auch durch Behandlung mit NCAM-FC Fusionsproteine feststellen konnte, konnten bei dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CREB-Level und der P-CREB-Level nach einer 10minütigen Induktion der Endozytose gezeigt werden. Gleiche Ergebnisse waren auch nach 30minütiger Induktion der Endozytose festzustellen (Kap. 3.2.8.). Im Gegensatz zu den Versuchen von Schmid et al. (1990) wurde der in dieser Arbeit verwendete anti NCAM-Antikörper 123C3 in den jeweiligen Experimenten als kompletter Antikörper eingesetzt, nicht im Form von FAB-Fragmenten. Um die Ergebnisse beider Arbeiten besser vergleichen zu können, müssen zukünftige Versuche bezüglich der CREB-Aktivierung mit FAB-Fragmenten des Antikörpers 123C3 wiederholt werden.

Die NCAM-vermittelten Signaltransduktionswege sind vielfältig und noch nicht vollständig geklärt (siehe Abb. 12). Zudem können einige Wege konvergieren und

durch die gemeinsame Aktivierung von Kinasen oder Transkriptionsfaktoren ihre Wirkung damit verstärken.

Bis jetzt weiß man, dass im wesentlichen drei verschiedene Transkriptionsfaktoren im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum von Bedeutung sind: CREB, c-Fos and NF κ B.

Die Phosphorylierung von CREB an Serin 133 durch das Clustering von NCAM140 auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen aktiviert CREB in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor für die Synthese von cAMP response element (CRE) enthaltenden Genen (Schmid et al., 1999). Obwohl CREB keine Konsensus-Sequenz für MAP-Kinasen besitzt, konnten zahlreiche Studien seine Aktivierung durch MAPKs belegen (Roberson et al., 1999; Xhing et al., 1996).

Schmid et al. (1999) konnten weiterhin zeigen, dass Clustering von NCAM140 auf der Oberfläche neuronaler Zellen die Phosphorylierung von sowohl ERK1 als auch ERK2 induziert, was im weiteren zur Phosphorylierung von CREB an Serin 133 führt. Eine Gruppe von Proteinen, die an aktivierte MAPKs binden können, ist die ribosomale Protein S6 Kinase Familie (RSK). Wenn diese Proteine durch MAPKs phosphoryliert werden, wandern sie in den Kern, wo sie zahlreiche Transkriptionsfaktoren, inklusive CREB, aktivieren können (Dalby et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit für MAPKs, CREB zu aktivieren, ist die mitogen- und stress-aktivierte Proteinkinase-1 (MSK-1), die – wird sie durch entweder ERK oder den stress-aktivierten Protein Kinase/p38 Pathway aktiviert – CREB phosphorylieren kann (Deak et al., 1998). Zusammen genommen belegen diese Studien, dass MAPK durch homophile NCAM-NCAM-Interaktionen aktiviert werden und als potentieller Mediator bei der Aktivierung von CREB in Frage kommt.

Ein weiterer Aktivator von CREB ist die PKA. Die Aktivierung der PKA durch einen Anstieg von intrazellulärem cAMP bewirkt die Translokation ihrer katalytischen Untereinheiten in den Zellkern, wo sie CREB am Serin133 phosphorylieren (Mayr et al., 2001). Jessen et al. (2001) konnten zeigen, dass die Behandlung von auf NCAM-exprimierenden Fibroblasten wachsenden PC12 Zellen mit einem spezifischen PKA-Inhibitor das NCAM-induzierte Neuritenwachstum inhibiert, was auf eine mögliche Beteiligung der PKA hinweist.

Auch Ca²⁺-abhängige Signaltransduktionswege können eine Phosphorylierung von CREB induzieren, da CREB eine Konsensussequenz für Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMKs) besitzt und bereits gezeigt wurde, dass die CaMKII und CaMKIV in

der Lage sind, CREB zu phosphorylieren (Zanassi et al., 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Ca^{2+} -Influx durch spannungsabhängige Kanäle und eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern eine Aktivierung des MAPK Signaltransduktionsweges und eine CREB-Phosphorylierung durch RSK Proteine zur Folge hat. Dieser Weg der Ca^{2+} -induzierten CREB-Aktivierung ist abhängig von der Aktivität der PKA (Zanassi et al., 2001). Die dargestellten NCAM-induzierten Signaltransduktionswege und die Beteiligung von CREB lassen daher den Schluss zu, dass CREB einen bedeutenden Punkt darstellt, in dem diese Wege zusammenlaufen.

Eine gleichzeitige Aktivierung der beiden Transkriptionsfaktoren CREB und c-Fos scheint für das NCAM-induzierte Neuritenwachstum notwendig zu sein.

So konnten Jessen et al. (2001) zeigen, dass sowohl CREB als auch der Transkriptionsfaktor c-FOS notwendig für das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum in PC12 Zellen sind und dass weder CREB noch c-FOS die Inaktivierung des jeweils anderen Transkriptionsfaktors kompensieren kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sowohl in den NCAM140-WT transfizierten Zellen als auch in den NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen – ohne Antikörper-Zugabe, also *ohne* Stimulation durch cis- oder trans- Interaktion von zelloberflächenassoziiertem NCAM - CREB in seiner aktivierten oder phosphorylierten Form vorliegt und dass die Expressionslevel an aktiviertem CREB bei allen Transfektanten vergleichbar sind. Eine Aussage darüber, dass die Expression von phosphoryliertem CREB aufgrund eines NCAM-stimulierten Signaltransduktionsweges besteht, kann hier nicht getroffen werden, da NCAM140-transfizierte B35 Zellen und nicht transfizierte, also NCAM-negative B35 Zellen hinsichtlich der Expression an phosphoryliertem CREB nicht miteinander verglichen wurden.

Auch der Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ ist an der NCAM-stimulierten Signaltransduktion und dem daraus resultierenden Neuritenwachstum beteiligt. Krushel et al. (1999) konnten zeigen, dass die Gabe von anti NCAM-Antikörpern oder aufgereinigtem NCAM-Protein zu Astrozyten und zerebralen Neuronen das Binden von $\text{NF}\kappa\text{B}$ an ein Oligonukleotid mit der Konsensus Sequenz für die spezifische $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Bindung induziert und die Transkription von $\text{NF}\kappa\text{B}$ -gesteuerten Reportergenen aktiviert. Der FGFR war in diese NACM-vermittelte Zellantwort nicht involviert. Ergebnisse einer

Studie von Choi et al. (2001) belegen eine Involvierung von Fyn, Src und anderen Nichtrezeptor-Proteinkinasen in die NCAM-vermittelte Aktivierung von NF κ B. Des weiteren zeigten Choi et al. (2001), dass Inhibitoren der PLC γ , der PKC und der CaMKII und die Entleerung intrazellulärerer Ca²⁺-Speicher die NCAM-induzierte NF κ B-Aktivierung inhibieren konnten.

Little et al (2001) konnten für NCAM aus der Ratte zum einen zeigen, dass die Behandlung von Astrozyten mit NCAM zur Degradation von I κ B und nachfolgend gesteigerter NF- κ B gesteuerter Transkription führte. Zum anderen identifizierten sie eine kurze Region in der zytoplasmatischen Domäne von NCAM, die notwendig für die NCAM-induzierte NF κ B Aktivierung zu sein scheint. Diese Domäne umfasst die drei Aminosäuren T794 P795 L796. Für humanes NCAM wurde dies bisher noch nicht gezeigt. Sollte die in dieser Arbeit deletierte Sequenz, welche dieselbe Aminosäuresequenz beinhaltet, davon betroffen sein, könnte ein Unterschied bei NCAM140-WT transfizierten Zellen auf der einen Seite und NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen auf der anderen Seite hinsichtlich der Aktivierung von NF κ B bestehen, die in Zukunft dringend untersucht werden müsste. Es wäre daher bei Bestätigung dieser Theorie nicht verwunderlich, dass keine Unterschiede bezüglich der Expression von phosphoryliertem CREB festzustellen war, denn Änderungen in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion würden hauptsächlich die Aktivierung von NF κ B und nicht die von CREB betreffen.

Bei der Kultivierung der mit 1 mM dbcAMP behandelten Zellen war zu beobachten, dass NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierte Zellen längere Neuriten ausbildeten als die NCAM140-WT transfizierten Zellen. Um zu untersuchen, ob die Unterschiede der Neuritenlängen signifikant sind, wurden die Zellen in mit PLL beschichteten 30 mm Schalen ausgesät und mit dbcAMP ausdifferenziert. Nach 24 h Kultivierung wurde die Länge der Neuriten der mit NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen mit Hilfe des Programms KS100 quantitativ ausgewertet. Die anschließende statistische Analyse zeigte, dass die NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen signifikant ($p < 0,001$) längere Neuriten bildeten als die NCAM140-WT transfizierten Zellen (Kap. 3.2.6.).

Auffällig war, dass die Unterschiede hinsichtlich der Neuritenlänge nur im ausdifferenzierten Zustand festzustellen war. Zur Kontrolle wurden die Neuriten

transfizierter B35 Neuroblastomzellen gemessen, die zwar noch die G418 Resistenz hatten, NCAM140 aber nicht mehr exprimierten. Es lagen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Neuritenlängen zwischen den Mutanten und den NCAM140-WT transfizierten Zellen vor. Die eingefügten Mutationen in die cDNA von NCAM140 scheinen damit einen Einfluss auf die Neuritenlänge der Zellen nur im ausdifferenzierten Zustand zu haben. Obwohl das hier untersuchte Neuritenwachstum unabhängig von der Stimulation von zelloberflächenassoziiertem NCAM durch anti NCAM-Antikörper ist, ist auch hier die Aktivierung von NF κ B mit in weitere Überlegungen einzubeziehen.

Sollte die in dieser Arbeit deletierte Sequenz, welche die Aminosäuren T781, P782 und L783 beinhaltet, davon betroffen sein, könnte ein Unterschied bei NCAM140-WT transfizierten Zellen auf der einen Seite und NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen auf der anderen Seite hinsichtlich der Aktivierung von NF κ B bestehen. Bei den NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen, fehlt - bei Bestätigung der Theorie – die für die NF κ B-Aktivierung kritische Sequenz, sodass dieser Signaltransduktionsweg nicht eingeschlagen werden kann.

Die NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen bilden im Vergleich zu den NCAM140-WT transfizierten Zellen längere Neuriten auf. Ob die eingefügten Mutationen Einfluss auf die Ausdifferenzierung der Zellen mit dbcAMP haben, die in einem gesteigerten Neuritenwachstum resultieren, muss noch durch den Vergleich der Expressionsstärke neuronaler Marker, z.B. von Neurofilamenten, geklärt werden.

Um auszuschließen, dass die Unterschiede bezüglich der Endozytose und des Neuritenwachstums lediglich auf unterschiedlichen Mengen an zelloberflächenassoziiertem NCAM140 beruhen, wurde eine Zelloberflächenbiotinylierung der NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen durchgeführt. Die Membranproteine auf der Zelloberfläche wurden mit Sulfo-NHS-LC Biotin biotinyliert. Anschließend wurde die Biotinylierung gestoppt, die Zellen lysiert und NCAM140 mit jeweils 5 μ g 123C3 Antikörper immunpräzipitiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde das zelloberflächenassoziierte NCAM140 im Western blot mit Streptavidin konjugierter Peroxidase detektiert. Hinsichtlich der Bandenstärke ergaben sich keine

signifikanten Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass die Menge an zelloberflächenassoziiertem NCAM140 bei NCAM140-WT, NCAM140- δ PEST und NCAM140-T781A transfizierten Zellen ähnlich ist (Kap. 3.2.7.). Die Unterschiede bezüglich der Endozytose und des Neuritenwachstums beruhen demnach weder auf unterschiedlichen Mengen an zelloberflächenassoziiertem NCAM noch auf unterschiedlichen Mengen an gesamtem NCAM. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass mit dieser Methode geringe Mengenunterschiede, die nach Bailey et al. (1997) starke Effekte auf die Endozytose ausüben können, nicht nachzuweisen sind.

5. Zusammenfassung

Untersuchungen am neuronalen Zelladhäsionsmolekül apCAM in der Meeresschnecke *Aplysia* hatten gezeigt, dass innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von apCAM eine sogenannte PEST Sequenz existiert. PEST Sequenzen sind Serin-, Prolin-, Threonin- und Glutaminsäure-reiche Bereiche, die häufig in Proteinen mit kurzen Halbwertszeiten vorkommen und Signale zu ihrer Internalisierung und Degradation sind.

Die Deletion der gesamten PEST Sequenz von apCAM als auch die Mutation eines der beiden in der PEST Sequenz befindlichen Threonine, welche Phosphorylierungsziele der MAPK darstellen, führt zur Inhibierung der Serotonin-stimulierten Endozytose von apCAM.

ApCAM ist das zu NCAM homologe neurale Zelladhäsionsmolekül der Meeresschnecke *Aplysia*. Da auch NCAM eine PEST Sequenz besitzt, war es naheliegend, die Funktion der PEST Sequenz von NCAM genauer zu untersuchen. Dafür wurden zunächst - ausgehend von der NCAM140-WT cDNA - die beiden Konstrukte NCAM140-T781A und NCAM140- δ PEST hergestellt und NCAM negative B35 Neuroblastomzellen mit den drei cDNA Konstrukten stabil transfiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Deletion der gesamten PEST Sequenz als auch die Mutation T781A die durch Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von NCAM stimulierte Endozytose von NCAM inhibiert.

Des Weiteren konnte an den NCAM140-WT transfizierten Zellen gezeigt werden, dass die Inhibierung von ERK1 und ERK2 durch den Inhibitor U0126 die Antikörper-stimulierte Endozytose von NCAM deutlich reduziert.

Daher konnte die These, dass die Rolle der PEST Sequenz von NCAM ähnlich der von apCAM ist, bestätigt werden.

Es zeigte sich, dass weder die eingefügten Mutationen noch die Stimulierung der Endozytose durch anti-NCAM-Antikörper einen Einfluss auf die Höhe der Expression von aktiviertem CREB hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Frage offen, welcher Signaltransduktionsweg durch NCAM stimuliert wird, ob unterschiedliche Signaltransduktionswege in NCAM140-WT transfizierten Zellen auf der einen Seite und NCAM140-T781A und

NCAM140- δ PEST auf der anderen Seite aktiv sind und ob die Endozytose bzw. eine Inhibition der Endozytose Einfluss auf diese Signaltransduktionswege nimmt.

Die Mutationen in den NCAM140-T781A und NCAM140- δ PEST transfizierten Zellen bewirken im Vergleich zu den NCAM140-WT transfizierten Zellen nach Stimulierung mit dbcAMP die Ausbildung signifikant längerer Neuriten. Die Frage, welche Mechanismen der Signaltransduktion durch diese Mutationen verändert oder ausgelöst werden und zu einem veränderten Neuritenwachstum führen, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. and Juliano, R. L. 1998. Signal transduction and signal modulation by adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules and selectins. *Pharmacol Rev.* 50(2):197-263.

Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 87:13-20.

Bailey, C. H., Bartsch, E. R., Kandel, E. R. Toward a molecular definition of long-term memory storage. 1996. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:13445-13552.

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 MAPK blocks learning-related internalization of apCAM in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron.* 18:913-924.

Balak, K., Jacobson, M., Sunshine, J. and Rutishauser, U. 1987. Neural adhesion molecule expression in xenopus embryos. *Dev. Biol.* 119:540-550.

Barbas, J. A., Chaix, J. C., Steinmetz, M., Goridis, C. 1988. Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins of the mouse. *EMBO J.* 7(3):625-632.

Beggs, H. E., Baragona, S. C., Hemperly, J. J., Maness, P. F. 1997. NCAM-140 interacts with the focal adhesion kinase p125fak and the src-related tyrosine kinase p59fyn. *J Biol Chem.* 272:8310-8319.

Berezin, V., Bock, E. and Poulsen, F. M. 2000. The neural cell adhesion molecule. *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.* 3:605-609.

Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleid Acids Res.* 24:1513-1523.

Brackenbury, R., Thiery, J.P., Rutishauser, U. and Edelman, G. M. 1977. Adhesion among neural cells of chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J. Biol. Chem.* 252:6835-6840.

Brümmendorf, T. and Rathjen, F. G. 1995. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile.* 2:963-1108.

Chang, M. P., Mallet, W. G., Mostov, K. E. and Brodsky, F. M. 1993. Adaptor self-aggregation, adaptor-receptor recognition and binding of α -adaptin subunits to the plasma membrane contribute to recruitment of adaptor (AP-2) components of clathrin-coated pits. *EMBO J.* 12:2169-2180.

Choi, J., Krushel, L. A. and Crossin, K. L. 2001. NF- κ B activation by N-CAM and cytokines in astrocytes is regulated by multiple protein kinases and redox modulation. *Glia.* 33:45-56.

Chotia, Cc and Jones, E. Y. 1997. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem.* 66:823-862.

Cremer, H., Lange, R., Chritoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., Barthels, D., Rajewski, K. and Wille, W. 1994. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature.* 367:455-459.

Crossin, K. L. and Krushel, L. A. 2000. Cellular signalling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev. Dyn.* 218:260-279.

Cunningham, B. A., Hemperly, J. J., Murray, B. A., Prediger, E. A., Brackenbury, R. and Edelman, G. M. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing. *Science.* 236:799-806.

D'Eustachio, P., Owens, G. C., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. 1985. Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(22):7631-7635.

Dalby, K. N., Morrice, N., Caudwell, F. B., Avruch, J. and Cohen, P. 1998. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90^{rsk} that are inducible by MAPK. *J. Biol. Chem.* 273:1496-1505.

Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, J. M. and Alessi, D. R. 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK-1) is directly activated by MAPK and SAPK/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J.* 17:4426-4441.

Doherty, P., Williams, E. A. and Walsh, F. S. 1995. A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron*. 14:1-20.

Doherty, P. and Walsh, F. S. 1996. CAM-FGF receptor interactions: A model for axonal growth. *Mol. Cell. Neurosci.* 8:99-111.

Edelman, G. M. 1988. Morphoregulatory molecules. *Biochem.* 27:3533-3543.

Fahrig, T., Schmitz, B., Weber, D., Kücherer-Ehret, A., Faissner, A. and Schachner, M. 1990. Two monoclonal antibodies recognizing carbohydrate epitopes on neural adhesion molecules interfere with cell interactions. *Eur. J. Neurosci.* 2:153-161.

Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G. W., Russell, D. W. and Schneider, W. J. 1985. Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:1-39.

Grenningloh, G., Rehm, E. J. and Goodman, C. S. 1991. Genetic analysis of growth cone guidance in drosophila: fascilin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell*. 67:45-57.

Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84(39):345-357.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Plainview, New York.

He, Q., and Meiri, K. F. 2001. Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signalling from growth cones. *Mol. Cell. Neurosci.* 19:18-31.

Heiland, P. 1998. *Dissertationsschrift*

Hemperly, J. J., Murray, B. A., Edelman, G. M. and Cunningham, B. A. 1986. Sequence of a cDNA clone encoding a polysialic acid-rich and cytoplasmic domains of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:3037-3041.

Hirn, M., Pierres, M., Deagostini-Bazin, H., Hirsch, M. R., Goridis, C., Gandhour, S., Langley, K. and Gombos, G. 1982. A new brain surface glycoprotein identified by monoclonal antibody. *Neuroscience*. 7:239-250.

Hoffman, S. and Edelman, G. M. 1983. Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5762-5766.

Horstkorte, R., Schachner, M., Magyar, J. P., Vorherr, T. and Schmitz, B. 1993. The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 121:1409-1421.

Hu, H., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., Rutishauser, U. 1996. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron*. 16:735-743.

Huang, Y, Jellis, j., Johansen, K. M. and Johansen, J. 1997. Differential glycosylation of tractin and LeechCAM, two novel Ig superfamily members, regulates neurite extension and fascicle formation. *J. Cell Biol.* 138(1):143-157.

Jacobson, A. and Peltz, S. W., 1996. Interrelationship of th pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 65:693-739.

Jensen, P. H., Soroka, V., Thomsen, N. K., Ralets, I., Berezin, V., Bock, E. and Poulsen, F. M. 1999. Structure and interactions of NCAM modules 1 and 2, basic elements in neural cell adhesion. *Nat. Struct. Biol.* 6:486-493.

Jessen, U., Novitskaya, V., Pedersen, N., Serup, P., Berezin, V. and Bock, E. 2001. The transkription factors CREB and c-Fos play key roels in NCAM-mediated neuritogenesis in PC12-E2 cells. *J. Neurochem.* 79:1149-1160.

Jorgensen, O. S., Delouvee, A., Thiery, J. P. and Edelman, G. M. 1980. The nervous system specific protein D2 is involved in adhesion among neurites from cultured rat ganglia. *FEBS Lett.* 111:39-42.

Jorgensen, O. S., 1995. Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem Res.* 20(5): 533-547.

Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P. and Schachner, M. 1990a. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Biol. Chem.* 110:193-208.

Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P. and Schachner, M. 1990b. Functional cooperation between neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J. Biol. Chem.* 110:209-218.

Kimizuka, F., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Taguchi, Y., Hashino, K., Goto, S., Hashi, H., Kato, I. and Sekiguchi, K. 1991. Role of type III homology repeats in cell adhesional function within the cell-binding domain of fibronectin. *J. Biol Chem.* 266(5):3045-3051.

Kiselyov, V. V., Berezin, V., Maar, T. E., Soroka, V., Edvardsen, K., Schousboe, A. and Bock, E. 1997. The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *J. Biol. Chem.* 272:10125-10134.

Kolkova, K., Pedersen, N., Berezin, V. and 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.* 75:1274-1282.

Kolkova, K., Novitskaya, V., Pedersen, N., Berezin, V. and Bock, E. 2000. Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Neurosci.* 20:2238-2246.

Krushel, L. A., Cunningham, B. A., Edelman, G. M. and Crossin, K. L. 1999. NF- κ B activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* 274:2432-2439.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

Lasky, L. A., Singer, M. S., Yednock, T. A., Dowbenko, D., Fennie, C., Rodriguez, T., Nguyen, T., Stachel, S. D. and Rosen, S. D. 1989. Cloning of a lymphocyte homing receptor reveals a lectin domain. *Cell.* 56:1045-1055.

Liedtke, S., Geyer, H., Wuhrer, M., Geyer, R., Gerady-Schahn, R., Zahringer, U., Schachner, M. 2001. Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology.* 11(5):373-384.

Little, E. B., Crossin, K. L., Krushel, L.A., Edelman, G. M. and Cunningham, B. A. 2001. A short segment within the cytoplasmic domain of N-CAM is essential for N-CAM-induced NF- κ B activity in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:2238-2243.

Long, K. E., Asou, H., Snider, M. D. and Lemmon, V. 2001. The role of endocytosis in regulating L1-mediated adhesion. *J. Biol. Chem.* 276:1285-1290.

Mattson, M. P., Culmsee, C., Yu, U. and Camadola, S. 2000. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J. Neurochem.* 74:443-456.

May, M. J. and Gosh, S. 1999. IkappaB kinases: kinsmen with different crafts. *Science.* 284:271-273.

Mayford, M., Barzilai, A., Keller, F, Schacher, S. and Kandel, E. R. 1992. Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in aplysia. *Sciences.* 256:638-644.

Mayr, B. and Montminy, M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:599-609.

Meiri, K. F., Saffell, J. L., Walsh, F. S. and 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.* 18:10429-10437.

Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:575-625.

Middleton, G. Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E., Hay, R. T. and Davies, A. M. 2000. Roles of nuclear factor kappa B in neuronal survival and plasticity. *J. Cell Biol.* 148:325-332.

Minana, R., Duran, J. M., Tomas, M., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. 2001. Neural cell adhesion molecule is endocytosed via a clathrin-dependent pathway. *Europ. J. of neurosci.* 13:749-756.

Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G. and Kiss, J. Z. 1996. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron*. 17:413-422.

Pearse, B. M. and Robinson, M. S. 1990. Clathrin adaptors and sorting. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6:151-171.

Pollerberg, E. G., Burridge, K., Krebs, S., Goodman, S. and Schachner, M. 1987. The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tiss. Res.* 250:227-236.

Pollerberg, E. G., Sadoul, R., Goridis, C. and Schachner, M. 1985. Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development. *J. Cell Biol.* 101:1921-1929.

Povlsen, G. K., Ditlevsen, D. K., Berezin, V. and Bock, E. 2003. Intracellular Signaling by the Neural Cell Adhesion Molecule. *Neurochem. Res.* 28:127-141.

Premont, R. T. 1991. A bovine brain cDNA purported to encode calmodulin-insensitive adenylyl cyclase has extensive identity with neural cell adhesion molecules. *FEBS Lett.* 295:230-231.

Ranheim, T. S., Edelman, G. M. and Cunningham, B. A. 1996. Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:4071-4075.

Rao, Y., Wu, X., Yip, P., Gariepy, J. and Siu, C. 1993. Structural characterization of a homophilic binding site in the neural cell adhesion molecule. *J. Biol. Chem.* 268:20630-20638.

Rechsteiner, M. and Rogers, S. W. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochem. Sci.*

Reichardt, L. F. and Tomaselli, K. J. 1991. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Ann. Rev. Neurosci.* 14:531-570.

Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratieff, C. and Sweatt, J. D. 1999. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* 19:4337-4348.

Rønn, L. C., Berezin, V. and Bock, E. 2000. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18:193-199.

Rothbard, J. B., Brackenbury, R., Cunningham, B. A. and Edelman, G. M. 1982. Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion-molecules from adult and embryonic chicken brains. *J. Biol. Chem.* 257:11064-111069.

Saffell, J. L., Walsh, F. S. and Doherty, P. 1992. Direct activation of second messenger pathways mimics cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 118:663-670.

Saffell, J. L., Williams, E. J., Mason, I., Walsh, F. S. and Doherty, P. 1997. Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron.* 18:231-242.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

Schachner, M. and Martini, R. 1995. Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* 18(4):183-191.

Schaefer, A. W., Kamiguchi, H., Wong, E. V., Beach, C. M., Landreth, G. and Lemmon V. 1999. Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J. Biol. Chem.* 274:37965-37973.

Schmalzing, G., Kröner, S., Schachner, M. and Gloor, S. 1992. The adhesion molecule on glia (AMOG) and $\alpha 1$ subunits assemble to functional sodium pumps in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267:20212-20217.

Schmid, R.-S., Hemperly, J. J., Schaller, M. D. and Maness, P. F. 1997. NCAM and L1 cell adhesion molecules activate MAP kinase signaling pathways. *Society for Neuroscience Abstracts.* 23:767.766.

Schmid, R.-S., Graff, R. D., Schaller, M. D., Chen, S., Schachner, M., Hemperly, J. J. and Maness, P. F. 1999. NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J. Neurobiol.* 38:542-558.

Schnitzer, J. and Schachner, M. 1981. Characterization of isolated mouse cerebellar cell populations in vitro. *J. Neuroimmunol.* 1:457-470.

Sen, R. and Baltimore, D. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.

Small, S. J., Hines, S. L. and Akeson, R. A. 1988. Polypeptide variation in an N-CAM extracellular immunoglobulin-like fold is developmentally regulated through alternative splicing. *Neuron.* 1:1007-1017.

Takeichi, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann. Rev. Biochem.* 59:237-252.

Thelen, K. 1999. Dissertationsschrift.

Thelen, K., Kedar, V., Panicker, A. K., Schmid, R.-S., Midkiff, B. R. and Maness, P. F. 2002. The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J. Neurosci.* 22(12):4918-4931.

Thiery, J. P., Brackenbury, R., Rutishauser, U. and Edelman, G. M. 1977. Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J. Biol. Chem.* 252:6841-6845.

Thompson, J., Dickson, G., Moore, S. E., Gower, H. J., Putt, W., Kenimer, J. G., Barton, C. H. and Walsh, F. S. 1989. Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain. *Genes & Dev.* 3:348-357.

Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiol.* 3:97-130.

Vaughn, D. E. and Bjorkman, P. J. 1996. The (Greek) key to structures of neural cell adhesion molecules. *Neuron.* 16(2):261-273.

Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S. and Doherty, P. 1994. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, NCAM and N-cadherin. *Neuron.* 13:583-594.

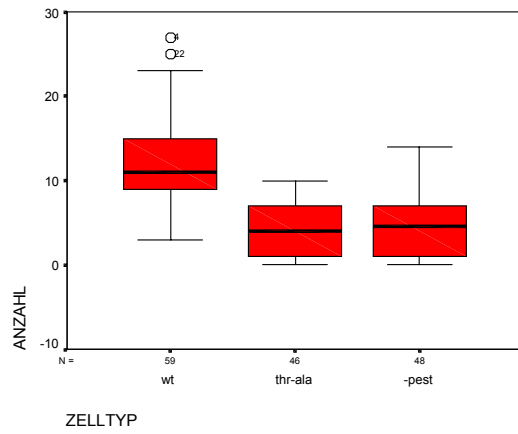
Williams, E. J., Furness, J., Walsh, F. S. and Doherty, P. 1994. Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF. *Development.* 120:1685-1693.

Xhing, J., Ginty, D. D. and Greenberg, M. E. 1996. Coupling of the Ras-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth-factor-regulated CREB kinase. *Science* 273:959-963.

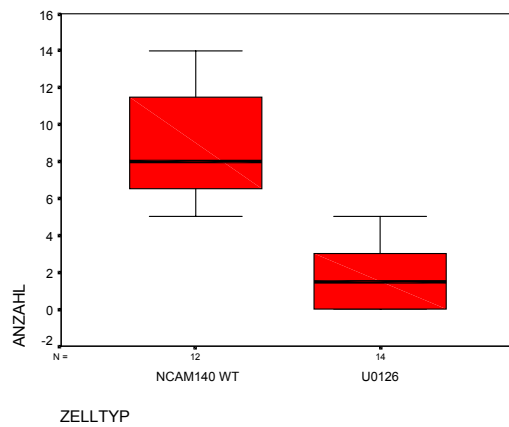
Zanassi, P., Paolillo, M., Feliciello, A., Avvedimento, E. V., Gallo, V. and Schinelli, S. 2001. cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an extracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J. Biol. Chem.* 276:11487-11495.

7. Anhang

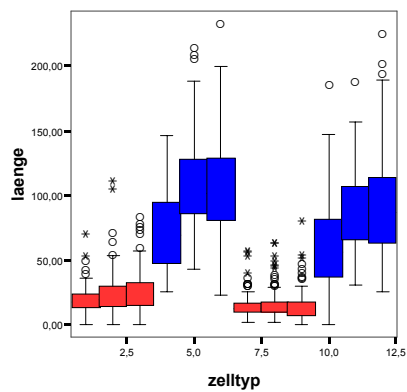
Endozytose von NCAM140-WT, δ PEST und T781A



Endozytose von NCAM140-WT und NCAM140-WT mit U0126



Neuritenlängenmessung von NCAM140-WT, δ PEST und T781A



Stengel-Blatt-Diagramme

ANZAHL Stem-and-Leaf Plot for
ZELLTYP= wt

Frequency	Stem &	Leaf
1,00	0 .	3
16,00	0 .	66666788888899999
26,00	1 .	00000000011111112222222344
11,00	1 .	55556667777
3,00	2 .	223
2,00	Extremes	(>=25)

Stem width: 10
Each leaf: 1 case(s)

ANZAHL Stem-and-Leaf Plot for
ZELLTYP= thr-ala

Frequency	Stem &	Leaf
9,00	0 .	000000000
3,00	1 .	000
2,00	2 .	00
2,00	3 .	00
8,00	4 .	00000000
7,00	5 .	0000000
3,00	6 .	000
4,00	7 .	0000
3,00	8 .	000
3,00	9 .	000
2,00	10 .	00

Stem width: 1
Each leaf: 1 case(s)

ANZAHL Stem-and-Leaf Plot for
ZELLTYP= -pest

Frequency	Stem &	Leaf
14,00	0 .	00000000001111
6,00	0 .	222333
9,00	0 .	444455555
8,00	0 .	66667777
6,00	0 .	888899
2,00	1 .	01
2,00	1 .	23
1,00	1 .	4

Stem width: 10
Each leaf: 1 case(s)

Statistische Auswertung zu Kapitel 3.2.5.:

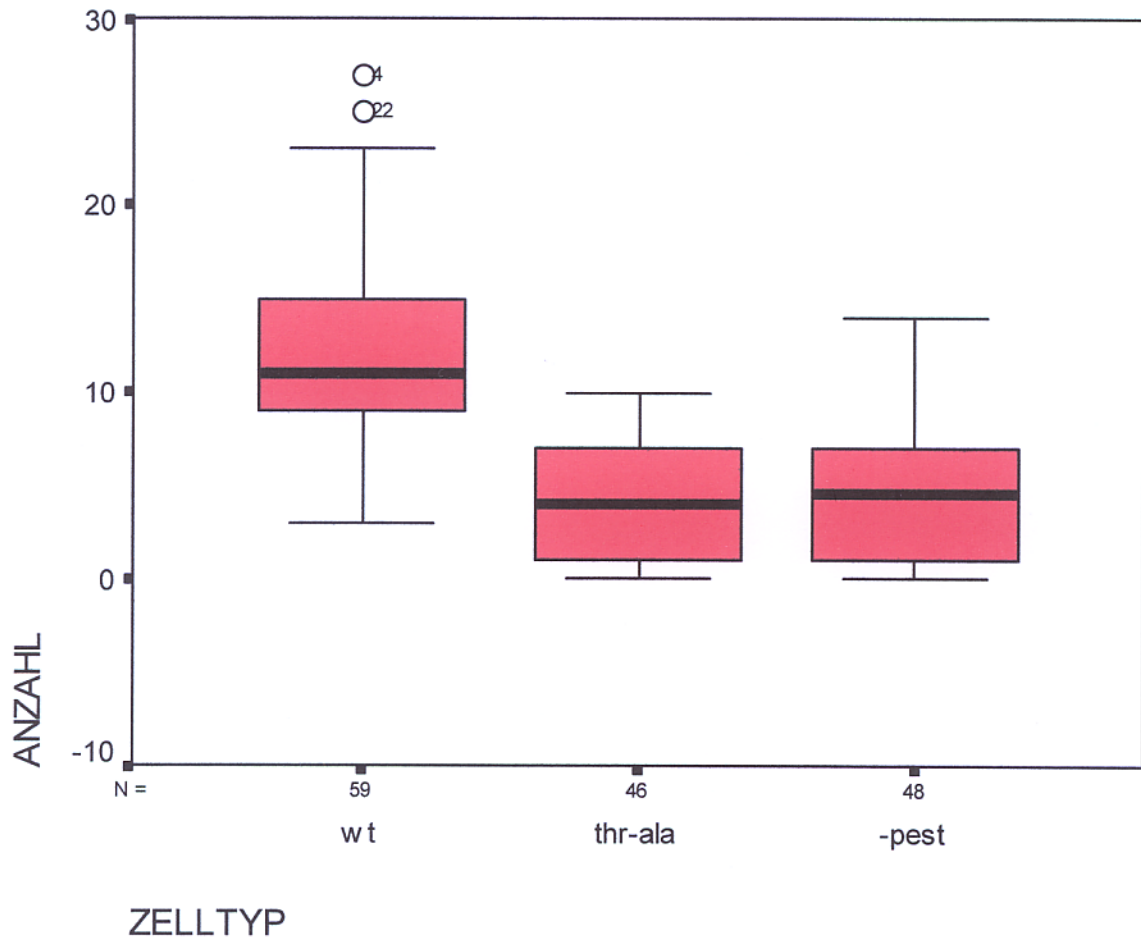


Abb.: Graphische Darstellung der statistischen Analyse der Anzahl der Endozytosevesikel in NCAM140-WT, -PEST (NCAM140- δ PEST) und Thr \rightarrow Ala (NCAM140-T781A) in Form eines Boxplots. Ausreißer sind die Werte, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegen. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder. Der Abstand extremer Werte von dem 25%- oder dem 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Boxhöhe. Die Definitionen gelten für Boxplots bei SPSS, stellen jedoch keine allgemeingültige Definition von Ausreißern und extremen Werten dar.

\bar{x} : Median

R: Spannweite $R = x_{\max} - x_{\min}$

25%-Perzentil und das 75%-Perzentil

der kleinste (\perp) und der größte (\top) Wert, der nicht als Extremwert oder als Ausreißer gewertet wird

Ausreißer (o)

Extremwert (x)

Wildtyp versus Thr-Ala

Mann-Whitney-Test

Ränge

ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ANZAHL wt	59	73,16	4316,50
thr-ala	46	27,14	1248,50
Gesamt	105		

Statistik für Test^a

	ANZAHL
Mann-Whitney-U	167,500
Wilcoxon-W	1248,500
Z	-7,700
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Wildtyp versus -Pest

Mann-Whitney-Test

Ränge

ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ANZAHL wt	59	73,13	4314,50
-pest	48	30,49	1463,50
Gesamt	107		

Statistik für Test^a

	ANZAHL
Mann-Whitney-U	287,500
Wilcoxon-W	1463,500
Z	-7,084
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Thr-Ala versus -Pest

Mann-Whitney-Test

Ränge

ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ANZAHL thr-ala	46	46,84	2154,50
-pest	48	48,14	2310,50
Gesamt	94		

Statistik für Test^a

	ANZAHL
Mann-Whitney-U	1073,500
Wilcoxon-W	2154,500
Z	-,232
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,816

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Explorative Datenanalyse

ZELLTYP

Verarbeitete Fälle

ZELLTYP	Fälle	
	Gültig	
	N	Prozent
ANZAHL wt	59	100,0%
thr-ala	48	100,0%
-pest	48	100,0%

Verarbeitete Fälle

ZELLTYP		Fälle			
		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent
ANZAHL	wt	0	,0%	59	100,0%
	thr-ala	0	,0%	46	100,0%
	-pest	0	,0%	48	100,0%

Univariate Statistiken

ZELLTYP				Statistik	Standardfehler
ANZAHL	wt	Mittelwert		12,07	,63
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	10,81	
			Obergrenze	13,33	
		5% getrimmtes Mittel		11,74	
		Median		11,00	
		Varianz		23,478	
		Standardabweichung		4,85	
		Minimum		3	
		Maximum		27	
		Spannweite		24	
		Interquartilbereich		6,00	
		Schiefe		1,094	,311
		Kurtosis		1,383	,613
			thr-ala	Mittelwert	
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze			3,37	
	Obergrenze			5,20	
5% getrimmtes Mittel				4,21	
Median				4,00	
Varianz				9,496	
Standardabweichung				3,08	
Minimum				0	
Maximum				10	
Spannweite				10	
Interquartilbereich				6,00	
Schiefe				,079	,350
Kurtosis				-,993	,688
	-pest			Mittelwert	
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	3,51	
			Obergrenze	5,74	
		5% getrimmtes Mittel		4,40	
		Median		4,50	
		Varianz		14,750	
		Standardabweichung		3,84	
		Minimum		0	
		Maximum		14	
		Spannweite		14	
		Interquartilbereich		6,00	
		Schiefe		,535	,343
		Kurtosis		-,433	,674

ANZAHL

NCAM140 WT vs NCAM140 WT + U0126

Deskriptive Statistiken

	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
ANZAHL	26	5,08	4,37	0	14
ZELLTYP	26	1,54	,51	1	2

Mann-Whitney-Test

Ränge

ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
ANZAHL NCAM140 WT	12	20,46	245,50
ANZAHL NCAM140 WT + U0126	14	7,54	105,50
Gesamt	26		

Statistik für Test^b

	ANZAHL
Mann-Whitney-U	,500
Wilcoxon-W	105,500
Z	-4,313
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,000 ^a

a. Nicht für Bindungen korrigiert.

b. Gruppenvariable: ZELLTYP

Statistische Auswertung zu Kapitel 3.2.6.:

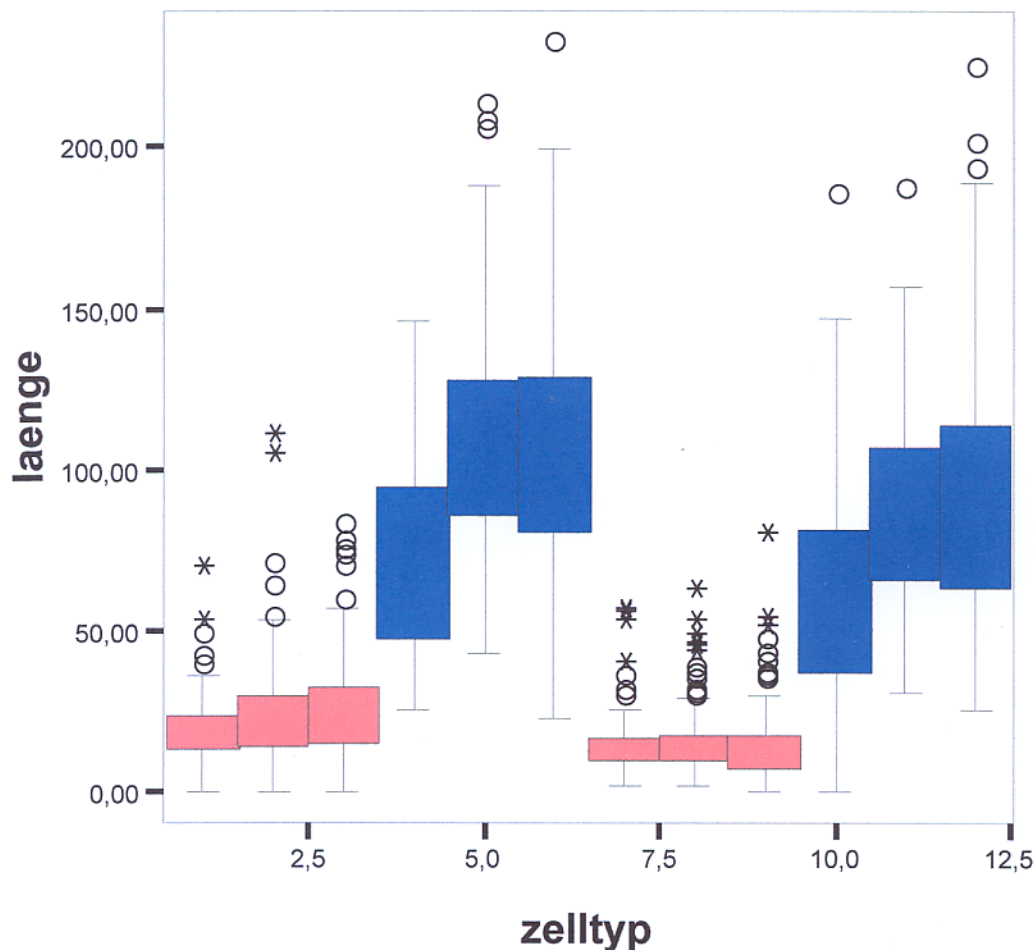


Abb.: Graphische Darstellung der statistischen Analyse des Neuritenlängenvergleichs von NCAM140 WT, δ PEST und Thr \rightarrow Ala in Form eines Boxplots. Ausreißer sind die Werte, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegen. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder. Der Abstand extremer Werte von dem 25%- oder dem 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Boxhöhe. Die Definitionen gelten für Boxplots bei SPSS, stellen jedoch keine allgemeingültige Definition von Ausreißern und extremen Werten dar.

\bar{x} : Median

R: Spannweite $R = x_{\max} - x_{\min}$

25%-Perzentil und das 75%-Perzentil

der kleinste (\perp) und der größte (\top) Wert, der nicht als Extremwert oder als Ausreißer gewertet wird

Ausreißer (o)

Extremwert (x)

Neuritenlängenvergleich

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	wtdmso1	71	81,58	5792,00
	pdms01	101	89,96	9086,00
	Gesamt	172		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	3236,000
Wilcoxon-W	5792,000
Z	-1,087
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,277

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	wtdmso1	71	78,97	5607,00
	mutdmso1	109	98,01	10683,00
	Gesamt	180		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	3051,000
Wilcoxon-W	5607,000
Z	-2,396
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,017

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	pdmso1	101	99,47	10046,00
	mutdmso1	109	111,09	12109,00
	Gesamt	210		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	4895,000
Wilcoxon-W	10046,000
Z	-1,385
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,166

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	wtdcamp1	181	112,91	20436,50
	pdccamp1	101	192,74	19466,50
	Gesamt	282		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	3965,500
Wilcoxon-W	20436,500
Z	-7,881
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	wtdcamp1	181	131,15	23737,50
	mutdcamp1	157	213,72	33553,50
	Gesamt	338		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	7266,500
Wilcoxon-W	23737,500
Z	-7,748
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	pdcamp1	101	134,50	13584,00
	mutdcamp1	157	126,29	19827,00
	Gesamt	258		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	7424,000
Wilcoxon-W	19827,000
Z	-,862
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,388

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	wtdmso2	128	144,66	18516,00
	pdmsso2	157	141,65	22239,00
	Gesamt	285		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	9836,000
Wilcoxon-W	22239,000
Z	-,306
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,759

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	wtdmso2	128	152,02	19458,00
	mutdmso2	148	126,81	18768,00
	Gesamt	276		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	7742,000
Wilcoxon-W	18768,000
Z	-2,616
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,009

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

	ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE	pdms02	157	165,76	26024,00
	mutdmso2	148	139,47	20641,00
	Gesamt	305		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	9615,000
Wilcoxon-W	20641,000
Z	-2,602
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,009

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE wtdcamp2	163	123,88	20193,00
pdcamp2	169	207,60	35085,00
Gesamt	332		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	6827,000
Wilcoxon-W	20193,000
Z	-7,945
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE wtdcamp2	163	126,55	20628,00
mutdcamp2	177	210,97	37342,00
Gesamt	340		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	7262,000
Wilcoxon-W	20628,000
Z	-7,911
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Nichtparametrische Tests

Mann-Whitney-Test

Ränge

ZELLTYP	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
LAENGE pdcamp2	169	169,65	28670,50
mutdcamp2	177	177,18	31360,50
Gesamt	346		

Statistik für Test^a

	LAENGE
Mann-Whitney-U	14305,500
Wilcoxon-W	28670,500
Z	-,700
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,484

a. Gruppenvariable: ZELLTYP

Explorative Datenanalyse

ZELLTYP

Verarbeitete Fälle

ZELLTYP		Fälle	
		Gültig	
		N	Prozent
LAENGE	wtdmso1	71	100,0%
	pdms01	101	100,0%
	mutdms01	109	100,0%
	wtdcamp1	181	100,0%
	pdcamp1	101	100,0%
	mutdcamp1	157	100,0%
	wtdmso2	128	100,0%
	pdms02	157	100,0%
	mutdms02	148	100,0%
	wtdcamp2	163	100,0%
	pdcamp2	169	100,0%
	mutdcamp2	177	100,0%

Verarbeitete Fälle

	ZELLTYP	Fälle			
		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent
LAENGE	wtdmso1	0	,0%	71	100,0%
	pdms01	0	,0%	101	100,0%
	mutdmso1	0	,0%	109	100,0%
	wtdcamp1	0	,0%	181	100,0%
	pdcamp1	0	,0%	101	100,0%
	mutdcamp1	0	,0%	157	100,0%
	wtdmso2	0	,0%	128	100,0%
	pdms02	0	,0%	157	100,0%
	mutdmso2	0	,0%	148	100,0%
	wtdcamp2	0	,0%	163	100,0%
	pdcamp2	0	,0%	169	100,0%
	mutdcamp2	0	,0%	177	100,0%

Univariate Statistiken

ZELLTYP			Statistik
LAENGE	wtdmso1	Mittelwert	20,4703
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze 17,7856 23,1550
		5% getrimmtes Mittel	19,4913
		Median	17,5000
		Varianz	128,649
		Standardabweichung	11,3424
		Minimum	,01
		Maximum	69,96
		Spannweite	69,95
		Interquartilbereich	9,8000
		Schiefe	1,827
		Kurtosis	5,161
			pdmso1
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze 20,6650 27,4584		
5% getrimmtes Mittel	21,9570		
Median	19,2000		
Varianz	296,049		
Standardabweichung	17,2061		
Minimum	,01		
Maximum	111,53		
Spannweite	111,52		
Interquartilbereich	16,1650		
Schiefe	2,780		
Kurtosis	10,583		
	mutdmso1		
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze 22,8724 28,9959
		5% getrimmtes Mittel	24,4868
		Median	22,0700
		Varianz	260,063
		Standardabweichung	16,1265
		Minimum	,01
		Maximum	83,54
		Spannweite	83,53
		Interquartilbereich	18,0900
		Schiefe	1,439
		Kurtosis	2,588
			wtdcamp1
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze 69,0533 77,6574		
5% getrimmtes Mittel	72,2910		
Median	69,3200		
Varianz	860,333		
Standardabweichung	29,3314		
Minimum	25,44		
Maximum	146,48		
Spannweite	121,04		
Interquartilbereich	47,8100		
Schiefe	,407		
Kurtosis	-,606		
	pdcamp1		

Univariate Statistiken

ZELLTYP				Statistik
LAENGE	pdcamp1	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	102,3620
			Obergrenze	116,1024
		5% getrimmtes Mittel		107,4198
		Median		102,1600
		Varianz		1211,124
		Standardabweichung		34,8012
		Minimum		43,16
		Maximum		213,71
		Spannweite		170,55
		Interquartilbereich		42,2200
		Schiefe		,841
		Kurtosis		,792
			mutdcamp1	Mittelwert
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze			99,0361
	Obergrenze			110,8889
5% getrimmtes Mittel				104,1514
Median				101,5000
Varianz				1413,238
Standardabweichung				37,5931
Minimum				22,63
Maximum				232,96
Spannweite				210,33
Interquartilbereich				48,0550
Schiefe				,408
Kurtosis				,202
	wtdms02	Mittelwert		15,1743
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	13,5758
			Obergrenze	16,7728
		5% getrimmtes Mittel		14,1295
		Median		12,5500
		Varianz		83,522
		Standardabweichung		9,1390
		Minimum		2,30
		Maximum		57,12
		Spannweite		54,82
		Interquartilbereich		6,9500
		Schiefe		2,432
		Kurtosis		7,919
	pdms02	Mittelwert		15,6927
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze	14,0253
			Obergrenze	17,3601
		5% getrimmtes Mittel		14,3902
		Median		12,7100
		Varianz		111,871
		Standardabweichung		10,5769
		Minimum		2,06
		Maximum		63,43
		Spannweite		61,37
		Interquartilbereich		7,9250
		Schiefe		2,239
		Kurtosis		6,012
	mutdms02	Mittelwert		13,5046

Univariate Statistiken

ZELLTYP				Standardfehler
LAENGE	wtdmso1	Mittelwert		1,3461
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
		5% getrimmtes Mittel		
		Median		
		Varianz		
		Standardabweichung		
		Minimum		
		Maximum		
		Spannweite		
		Interquartilbereich		
		Schiefe		,285
		Kurtosis		,563
			pdmso1	Mittelwert
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze			
5% getrimmtes Mittel				
Median				
Varianz				
Standardabweichung				
Minimum				
Maximum				
Spannweite				
Interquartilbereich				
Schiefe				,240
Kurtosis				,476
	mutdmso1			Mittelwert
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
		5% getrimmtes Mittel		
		Median		
		Varianz		
		Standardabweichung		
		Minimum		
		Maximum		
		Spannweite		
		Interquartilbereich		
		Schiefe		,231
		Kurtosis		,459
			wtdcamp1	Mittelwert
95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze			
5% getrimmtes Mittel				
Median				
Varianz				
Standardabweichung				
Minimum				
Maximum				
Spannweite				
Interquartilbereich				
Schiefe				,181
Kurtosis				,359
	pdcamp1			Mittelwert

Univariate Statistiken

ZELLTYP				Standardfehler		
LAENGE	wtdmso1	Mittelwert		1,3461		
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze			
		5% getrimmtes Mittel				
		Median				
		Varianz				
		Standardabweichung				
		Minimum				
		Maximum				
		Spannweite				
		Interquartilbereich				
		Schiefe		,285		
		Kurtosis		,563		
			pdmso1	Mittelwert		1,7121
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
5% getrimmtes Mittel						
Median						
Varianz						
Standardabweichung						
Minimum						
Maximum						
Spannweite						
Interquartilbereich						
Schiefe				,240		
Kurtosis				,476		
	mutdmso1			Mittelwert		1,5446
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
		5% getrimmtes Mittel				
		Median				
		Varianz				
		Standardabweichung				
		Minimum				
		Maximum				
		Spannweite				
		Interquartilbereich				
		Schiefe		,231		
		Kurtosis		,459		
			wtdcamp1	Mittelwert		2,1802
				95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
5% getrimmtes Mittel						
Median						
Varianz						
Standardabweichung						
Minimum						
Maximum						
Spannweite						
Interquartilbereich						
Schiefe				,181		
Kurtosis				,359		
	pdcamp1			Mittelwert		3,4628

Univariate Statistiken

ZELLTYP				Standardfehler
LAENGE	mutdmso2	95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
		5% getrimmtes Mittel		
		Median		
		Varianz		
		Standardabweichung		
		Minimum		
		Maximum		
		Spannweite		
		Interquartilbereich		
		Schiefe		,199
		Kurtosis		,396
	wtdcamp2	Mittelwert		2,4611
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
		5% getrimmtes Mittel		
		Median		
		Varianz		
		Standardabweichung		
		Minimum		
		Maximum		
		Spannweite		
		Interquartilbereich		
		Schiefe		,190
		Kurtosis		,378
	pdcamp2	Mittelwert		2,1857
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
		5% getrimmtes Mittel		
		Median		
		Varianz		
		Standardabweichung		
		Minimum		
		Maximum		
		Spannweite		
		Interquartilbereich		
		Schiefe		,187
		Kurtosis		,371
	mutdcamp2	Mittelwert		2,8769
		95% Konfidenzintervall des Mittelwerts	Untergrenze Obergrenze	
		5% getrimmtes Mittel		
		Median		
		Varianz		
		Standardabweichung		
		Minimum		
		Maximum		
		Spannweite		
		Interquartilbereich		
		Schiefe		,183
		Kurtosis		,363