

**Subzelluläre Lokalisation der Collapsin Response  
Mediator Proteine in Lipid Rafts und die Beziehung von  
CRMP-4 zum Actincytoskelett**

**Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von  
Volker Roßlenbroich  
aus Neuss

Bonn, 2006

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

Erstgutachter: **PD Dr. Joachim Kappler, Institut für Physiologische Chemie**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Michael Hoch, Institut für Molekulare Physiologie und Entwicklungsbiologie, Abteilung für Molekulare Entwicklungsbiologie**

Fachnaher Gutachter: **Prof. Dr. Wolfgang Alt, Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik, Abteilung für Theoretische Biologie**

Fachangrenzender Gutachter: **PD Dr. Stephan Baader, Anatomisches Institut, Abteilung Anatomie und Zellbiologie**

Tag der Promotion: 08.05.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis Dezember 2005 am Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn, Nussallee 11 unter Leitung von PD Dr. Joachim Kappler durchgeführt.

## Veröffentlichungen:

Volker Roßlenbroich, Lingsong Dai, Sebastian Franken, Marion Gehrke, Ulrich Junghans, Volkmar Gieselmann, and Joachim Kappler (2003). Subcellular localization of collapsin response mediator proteins to lipid rafts. *Biochemical Biophysical Research Communications* 305: 392-9.

Volker Roßlenbroich, Lingsong Dai, Stephan L. Baader, Angelika A. Noegel, Volkmar Gieselmann and Joachim Kappler (2005). Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling. *Experimental Cell Research* 310: 434-44

Sebastian Franken, Ulrich Junghans, Volker Roßlenbroich, Stephan L. Baader, Ralf Hoffmann, Volkmar Gieselmann, Christoph Viehbahn and Joachim Kappler (2003). Collapsin Response Mediator Proteins of neonatal rat brain interact with chondroitin sulfate. *Journal of Biological Chemistry* 278: 3241-50

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| 1. Einleitung.....  | 9  |
| 1.1. Neuronale Navigation während der Entwicklung des Nervensystems.....  | 9  |
| 1.2. Molekulare Mechanismen der neuronalen Navigation.....  | 10 |
| 1.2.1. Molekulare Basis der Zellmotilität.....  | 10 |
| 1.2.2. Kontaktleitung des axonalen Wachstums.....   | 12 |
| 1.2.3. Leitung des axonalen Wachstums durch diffusible Faktoren.....  | 15 |
| 1.3. Die Semaphorine.....   | 16 |
| 1.3.1. Semaphorin 3A/Collapsin-1.....   | 18 |
| 1.3.2. Der Rezeptorkomplex für Semaphorin 3A.....   | 19 |
| 1.4. Die Collapsin Response Mediator Proteine.....  | 20 |
| 2. Problemstellung der Arbeit.....  | 25 |
| 3. Material und Methoden.....   | 27 |
| 3.1. Verwendete Materialien, Medien, Organismen und Zellen.....   | 27 |
| 3.1.1. Geräte.....  | 27 |
| 3.1.1.1. Mikrojektion.....  | 27 |
| 3.1.1.2. Mikroskope.....  | 28 |
| 3.1.1.3. Inkubatoren.....   | 28 |
| 3.1.1.4. Geräte für Elektrophorese und Westernblot.....   | 28 |
| 3.1.1.5. Geräte für molekularbiologische Arbeiten.....  | 28 |
| 3.1.1.6. Zentrifugen.....   | 29 |
| 3.1.2. Verwendete Organismen und Zellen.....  | 29 |
| 3.1.2.1. Kaninchen.....   | 29 |
| 3.1.2.2. Ratten.....  | 29 |
| 3.1.2.3. Zelllinien.....  | 29 |
| 3.1.2.4. Bakterienstämme.....   | 29 |
| 3.1.3. Puffer, Medien und Lösungen.....   | 30 |
| 3.1.4. Verwendete Vektoren.....   | 34 |
| 3.1.5. Verwendete Software.....   | 35 |
| 3.2. Immuncytochemie.....   | 36 |
| 3.2.1. Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen Antiseren gegen CRMP-1, CRMP-2, CRMP-3 und CRMP-5/CRAM..... | 36 |
| 3.2.2. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....  | 37 |
| 3.2.3. Verwendete Antikörper und deren Arbeitsverdünnungen.....   | 38 |
| 3.3. Zellkultur.....  | 38 |
| 3.3.1. Reinigung von Deckgläsern mit HNO <sub>3</sub> .....   | 38 |
| 3.3.2. Zellzahlbestimmung.....  | 39 |
| 3.3.3. Transfektion von Zellen.....   | 39 |
| 3.3.4. Präparation von corticalen Neuronen.....   | 39 |
| 3.3.5. Cholesterol-Extraktion aus lebenden Zellen.....  | 40 |
| 3.3.6. Inkubation von Zellkulturen mit verschiedenen Pharmaka.....  | 41 |
| 3.3.7. Mikrojektion von rekombinantem Collapsin Response Mediator Protein-4 in Hela-Zellen.....                               | 42 |
| 3.3.7.1. Herstellung von Mikrojektionskapillaren.....   | 42 |
| 3.3.7.2. Der Mikromanipulator.....  | 42 |
| 3.3.7.3. Vorbereitung von Zellen für die Mikrojektion.....  | 43 |
| 3.3.7.4. Probenvorbereitung.....  | 43 |
| 3.3.7.5. Injektion.....   | 44 |
| 3.3.8. Zeitraffer-Video-Mikroskopie und Einzelzell-Migrationsassay.....   | 45 |
| 3.4. Molekularbiologische Arbeiten.....   | 46 |
| 3.4.1. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....   | 46 |
| 3.4.2. Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien.....   | 46 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4.3. Präparation von Plasmid-DNA.....  | 46  |
| 3.4.4. Konzentrationsbestimmungen von DNA.....   | 48  |
| 3.4.4.1. Photometrische Bestimmung.....  | 48  |
| 3.4.4.2. Ethidiumbromid-Färbung im Agarosegel.....   | 48  |
| 3.4.5. Modifikationen von DNA.....   | 48  |
| 3.4.5.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....   | 48  |
| 3.4.5.2. Ligation von DNA.....   | 49  |
| 3.5. Allgemeine Arbeiten.....  | 49  |
| 3.5.1. Präparation von Lipid Rafts aus dem Gehirn neugeborener Ratten.....   | 49  |
| 3.5.2. Differentielle Zentrifugation und Detergenzextraktion von Rattenhirn-Homogenaten.....   | 49  |
| 3.5.3. F-Actin-Kosedimentationsexperimente.....  | 51  |
| 3.5.4. Quantitative Ermittlung der Kolo-kalisation zweier Proteine und Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson.....  | 52  |
| 3.5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblots.....  | 54  |
| 3.5.5.1. SDS-PAGE.....   | 54  |
| 3.5.5.2. Westernblot nach dem Semi Dry Verfahren.....  | 54  |
| 3.5.6. Färbungen von Polyacrylamid-Gelen.....  | 55  |
| 3.5.6.1. Coomassie Färbung.....  | 55  |
| 3.5.6.2. Silberfärbung.....  | 55  |
| 3.5.7. Densitometrie von Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen.....   | 56  |
| 3.5.8. Proteinbestimmungen.....  | 56  |
| 4. Ergebnisse.....   | 57  |
| 4.1. Analyse der Expression und subzellulären Lokalisation der Collapsin Response Mediator Proteine im Gehirn neugeborener Ratten durch Westernblot-Analysen.....        | 57  |
| 4.2. Analyse der Assoziation von Collapsin Response Mediator Proteinen mit Lipid Rafts durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation.....                             | 60  |
| 4.3. Immunocytochemische Darstellung von Collapsin Response Mediator Protein-4 in corticalen Neuronen der Ratte.....   | 62  |
| 4.4. Wirkung einer Extraktion von Cholesterol mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf die Verteilung von Collapsin Response Mediator Protein-4 in corticalen Neuronen..... | 63  |
| 4.5. Analyse der Kolo-kalisation von Collapsin Response Mediator Protein-4 mit Cytoskelettproteinen in corticalen Neuronen.....  | 65  |
| 4.5.1. Kolo-kalisation von Collapsin Response Mediator Protein-4 mit F- Actin.....   | 65  |
| 4.5.2. Wirkung einer Behandlung mit Latrunculin A und Nocodazol auf die Verteilung von Collapsin Response Mediator Protein-4 in corticalen Neuronen.....                 | 66  |
| 4.6. Interaktion von rekombinantem Collapsin Response Mediator Protein-4 mit F-Actin.....  | 77  |
| 4.6.1. Mikroinjektion von rekombinantem Collapsin Response Mediator Protein-4 in Hela-Zellen.....  | 77  |
| 4.6.2. Kosedimentationsexperimente mit CRMP-4 und F-Actin.....   | 78  |
| 4.7. Verteilung von CRMP-4 und F-Actin nach der Behandlung von Zellen mit Pharmaka, welche die Proteinphosphorylierung beeinflussen.....                                 | 85  |
| 4.8. Dynamik der Lokalisation von GFP-CRMP-4 in lebenden Zellen.....   | 94  |
| 4.9. Die Modulation der Migration von B35-Neuroblastomzellen durch CRMPs.....  | 97  |
| 5. Diskussion.....   | 101 |
| 5.1. Collapsin Response Mediator Proteine und Lipid Rafts.....   | 101 |
| 5.2. Collapsin Response Mediator Protein-4 und F-Actin.....  | 105 |
| 5.3. Signaltransduktion und CRMP-4.....  | 112 |
| 5.4. Ausblick.....   | 116 |
| 6. Zusammenfassung.....  | 117 |
| 7. Literaturverzeichnis.....   | 119 |
| 8. Anhang.....   | 131 |
| 8.1. Abkürzungsverzeichnis.....  | 131 |

|  |     |
|--|-----|
| 8.2. Formeln verwendeter Substanzen.....           | 133 |
| 8.3. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen..... | 135 |
| 8.4. Lebenslauf.....                               | 139 |

# 1. Einleitung

## 1.1. *Neuronale Navigation während der Entwicklung des Nervensystems*

Die präzise Regulation einer Vielzahl von zellulären Motilitätsprozessen ist eine Voraussetzung dafür, dass sich während der frühen embryonalen Individualentwicklung eines Organismus eine hoch geordnete Organisation der einzelnen Zellen etabliert, die sich zum Beispiel in den Verbindungen zeigt, die Neurone untereinander mit Hilfe der Axone und Dendriten eingehen (*Kandel et al., 2000*). Um diese Ordnung herzustellen, müssen zum einen die Zellen ihren richtigen Platz im Gewebe finden und sie müssen bei der darauffolgenden Differenzierung ihre Fortsätze (Axone und Dendriten) entlang der richtigen Bahnen zu wiederum den richtigen Zielzellen aussenden. Es gibt folglich im sich entwickelnden Nervensystem zwei Strukturen, die ein räumliches Orientierungsproblem lösen müssen, nämlich einmal die migrierende Zelle und des weiteren die Fortsätze, die von ihr während der Differenzierung ausgesandt werden. Man spricht nach einem Vorschlag von Song und Poo deshalb zusammenfassend von neuronaler Navigation (*Song und Poo, 2001*). Bei den Wirbeltieren stammen alle Zellen des Zentralnervensystems aus der Neuralplatte oder aus sensorischen Plakoden der Kopfregion, die zu den Hirnnerven beitragen. Die Neuralplatte beginnt sich gegen Ende der Gastrulation einwärts zu falten und bildet so das Neuralrohr. Beim sich entwickelnden Gehirn bildet sich aus dem entstandenen Neuralrohr zunächst ein sogenanntes dreiblasiges Stadium. In diesem bildet sich das Prosencephalon (Vorderhirn), weiter kaudal davon gelegen das Mesencephalon (Mittelhirn) und dahinter das Rhombencephalon (Rautenhirn) aus. Durch eine weitere Unterteilung geht aus dem dreiblasigen Stadium ein fünfblasiges hervor. Bei diesem entsteht aus dem Prosencephalon das Telencephalon (Endhirn) und das Diencephalon (Zwischenhirn), das Mesencephalon bleibt unverändert und aus dem Rhombencephalon gehen das Metencephalon (Hinterhirn) und das Myelencephalon (Nachhirn) hervor.

Bei den Säugetieren sind die Ursprungszellen des zentralen Nervensystems pluripotente Stammzellen. Diese entstehen aus den neuroektodermalen Zellen des Neuralrohres. Die Zellen schlagen in Abhängigkeit von Einflussfaktoren, die in der Umgebung der Zellen vorhanden sind, und auch von zellinternen Faktoren unterschiedliche Differenzierungswege ein und werden entweder zu Neuronen oder Gliazellen. Ein entscheidender Faktor, der bei diesen Differenzierungen eine Rolle spielt, ist die Zeit. Zuerst werden die corticalen Neurone unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren angelegt. Zur gleichen Zeit entwickelt sich die Radialglia, aus der

später die Astrocyten hervorgehen (*Huber, Dissertation 2005*). Die Radialglia bilden eine Art Gerüst, das die gesamte Neuralrohrwand des zukünftigen Großhirns durchzieht (*Rackic et al., 1998; Hatten et al., 1999*). Entlang von diesem Gerüst bewegen sich wandernde Neurone und gelangen so in die für sie bestimmte Cortexschicht.

Nachdem die wandernden Neuronen ihre speziellen Zielgebiete erreicht haben, beginnen diese Fortsätze auszubilden, die zu ihren ganz bestimmten Zielgebieten und Zielzellen finden. Auch das Wachstum des Axons und der Dendriten vom Neuron zu ihren Zielen hin, wobei es sich ebenfalls um Neurone oder aber auch andere Effektorzellen handeln kann, ist ein gerichteter und gelenkter Prozess. Die diesen Prozess steuernden Moleküle des extrazellulären Raums nennt man Leitfaktoren oder auch Leitmoleküle (engl. „guidance cues“) (*Goodman und Tessier-Lavigne, 1996*)

## 1.2. Molekulare Mechanismen der neuronalen Navigation

### 1.2.1. Molekulare Basis der Zellmotilität

Die Migration von Zellen, wie zum Beispiel von Neuroblasten, und das Wachstum von Fortsätzen von Zellen, wie zum Beispiel die auswachsenden Axone bei der neuronalen Navigation, beruhen auf dem Umbau des Cytoskeletts. Hierbei führt die Umorganisation von Elementen des Cytoskeletts, die ihrerseits durch Adhäsionskontakte mit der Umgebung der Zellen in Verbindung stehen, zu Bewegungen von Zellen oder deren Ausläufern.

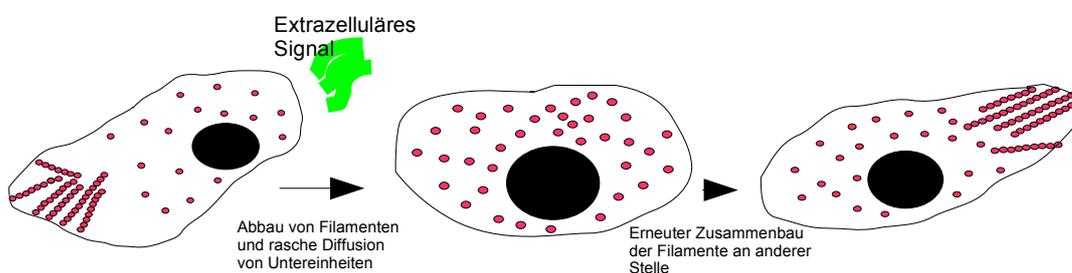


Abbildung 1: Umorganisation des Cytoskeletts als Antwort auf ein zellexternes Signal.

Nach Alberts et al., 2004

Dem Actin fällt innerhalb der Zelle eine Hauptaufgabe bei der Generierung von Motilität zu (*Pantaloni et al., 2001; Pollard und Borisy, 2003*). Es ist der Hauptbestandteil von zellulären Protrusionen, wie zum Beispiel Lamellipodien und Filopodien. Lamellipodien sind dünne, flächige

Strukturen, die durch ein Maschenwerk von Actinfilamenten aufgebaut sind und sich an der Frontseite einer bewegenden Zelle ausbilden. Filopodien sind dünne, lange und spitze Strukturen, die sich ebenfalls an der Front einer sich bewegenden Zelle ausbilden und aus dichtgepackten Bündeln paralleler Actinfilamente bestehen. Bei Mikrospikes handelt es sich um kürzere Bündel von Actin, die in Lamellipodien lokalisiert sind. In Stressfasern bilden antiparallele Actinfilamente zusammen mit Myosin-II-Proteinen kontraktile Strukturen. An der Frontseite, dem sogenannten „Leitsaum“ (engl. „leading edge“) einer sich bewegenden Zelle, findet man breitflächig angelegte Lamellipodien. Der Leitsaum wird durch fortgeführte, ständige Polymerisation von Actinmonomeren vorangeschoben. Gleichzeitig erfolgt eine Depolymerisation der schon länger bestehenden Abschnitte an den Minus-Enden der Actinfilamente, welche in Richtung des Zellzentrums liegen. Dieser Mechanismus, der dem Auf- und Umbau des Actincytoskeletts zugrunde liegt, bezeichnet man auch als „Tretmühlenmechanismus“. Mit Hilfe dieses Mechanismus werden die einzelnen langen Actinfilamente aufgebaut.

Diese Actinfilamente werden zu höher strukturierten, funktionellen Einheiten innerhalb von Lamellipodien oder Filopodien organisiert und aufgebaut. Das geschieht mit Hilfe von actinbindenden Proteinen. Actinbindende Proteine, welche die langen Filamente miteinander quervernetzen, teilt man in bündelnde Proteine und in gelbildende Proteine ein. Bündelnde Proteine vernetzen die Actinfilamente in paralleler Anordnung, während die gelbildenden Proteine zwei Actinfilamente in einem großen Winkel zueinander halten und so ein Netzwerk bilden. Ein Proteinkomplex, der an der Ausbildung von diesen Netzwerken beteiligt ist, ist der Arp2/3 Komplex. Dieser Komplex setzt sich aus sieben, evolutionär konservierten Proteinen zusammen (*Machesky et al., 1997*). Für den Arp2/3 Komplex wurde gezeigt, dass er ein sogenannter Nucleationskomplex ist, der an bestehende Actinfilamente bindet, dort die Initiation eines neuen verzweigten Filaments initiiert und so zur Ausbildung einer gelartigen Struktur des Actins beiträgt, wie man sie in Lamellipodien findet (*Amann und Pollard, 2001*). Ein weiteres Protein, das die Gelstruktur von Actinfilamenten unterstützt, ist das Filamin. Bei den Filopodien, die durch ihre lange und schmale Architektur charakterisiert sind, kommt diese Struktur ebenfalls durch Actinbindende Proteine zustande. Im Gegensatz zu den Lamellipodien sind die Actinfilamente in den Filopodien viel strenger geordnet und ausgerichtet. Sie liegen in dieser Struktur eng und parallel nebeneinander. Diese Actinbündel sind aber nicht nur für Filopodien verantwortlich, sondern sie übernehmen auch noch andere Aufgaben in einer Zelle, beispielsweise in Wachstumskegeln. Auswachsene Axone besitzen an ihrem vorderen Ende eine Struktur, die man Wachstumskegel nennt. Wachstumskegel sind hoch spezialisierte, motile Strukturen, die ebenfalls Lamellipodien und Filopodien besitzen. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Führung des wachsenden Axons, und das Actin der Zelle spielt eine zentrale Rolle bei der Bewegung von Wachstumskegeln (*Smith et al.,*

1988). Actinbündeln wird eine wichtige Funktion bei der Erhaltung der Struktur von Wachstumskegeln zugeschrieben (*Zhou und Cohan, 2001*). Sie werden hier als ein Angriffspunkt von repulsiven Leitfaktoren beschrieben, mit deren Auflösung ein partieller oder totaler Kollaps des Wachstumskegels korreliert. Actinbündel werden von Proteinen, wie zum Beispiel  $\alpha$ -Actinin, Fimbrin, Fascin oder Spectrin, gebildet. Die Actindynamik, mit dem permanenten Auf- und Abbau von Filamenten und die Kontrolle des Status der Ordnung der Filamente steht unter dem Einfluß der Rho-GTPasen. Zu dieser Familie gehören die Mitglieder Rho, Rac und Cdc42. Diese G-Proteine wirken bei der Umordnung des Actincytoskeletts als Schlüsselmoleküle (*Ridley und Hall, 1992*).

### **1.2.2. Kontaktleitung des axonalen Wachstums**

Zellmotilität ist ein durch äußere Signale fein regulierter Prozeß. Eine in eine Richtung starre Bewegung würde keinen Sinn ergeben, genau wie eine in alle Richtungen statistisch verteilte. Der eigentliche Effekt, der der Motilität gerade in der Entwicklung des Nervensystems eine so bedeutende Rolle verleiht, ist der, dass diese Bewegung der Zellen und ihrer Ausläufer beeinflusst werden kann. Die gesteuerte Bewegung ist wichtig bei der Etablierung einer geordneten Verschaltung neuronaler Netzwerke, die der Organismus für sein Funktionieren braucht. Eine wichtige Frage in der Entwicklung des Nervensystems ist also die, wie die Motilität von Zellen oder Wachstumskegeln konkret beeinflusst werden kann.

Die ersten Ansätze zu einer Lösung des Problems, welche Umgebungsfaktoren die Migration von Zellen steuern, wurden von Harrison (1914) gemacht. Er beobachtete Neuroblasten von Amphibien in Zellkultur und stellte fest, dass die Zellen eine Tendenz besaßen, am Schalenboden zu adhären und sich über diese Oberfläche zu bewegen (*Harrison et al., 1914*). Weiss zeigte später, dass embryonale Zellen und auch auswachsende Neuriten dazu neigten, sich in den Kulturgefäßen an Kratzern im Glas oder an Fasern von plasmatischen Gerinnseln, in denen die Explantate kultiviert wurden, zu orientieren und an diesen entlang zu wandern. Von diesen Beobachtungen ausgehend formulierte man erstmals Gedanken einer mechanischen Kontaktleitung von Zellen, die ein Signal durch das Substrat erhalten, auf dem sie wachsen (*Weiss et al., 1934*).

Diese Idee wurde weiter verfeinert, indem man postulierte, dass unterschiedliche Adhäsionsfähigkeiten von Zellen auf verschiedenen Substraten diese bei ihrer Wanderung auf bestimmten Wegen halten (*Holtfreter et al., 1944*). Man übertrug diese Überlegungen auch auf die Motilität von auswachsenden Axonen, die ihre Zielzellen finden müssen, um korrekte synaptische Verknüpfungen herstellen zu können. Roger Sperry postulierte als erster eine spezifische,

chemische Affinität zwischen einem wachsenden Axon und seiner Zielzelle (*Sperry et al., 1963*). Die unterschiedliche Adhäsion von Zellen auf einem bestimmten Substrat beruht auf dem Vorhandensein von unterschiedlichen Adhäsionsmolekülen, welche von den Zellen exprimiert werden (siehe Tabelle 1). Dabei können diese Moleküle auf die Oberflächen von anderen Zellen treffen oder sie stoßen auf Moleküle der extrazellulären Matrix. Ein großer Teil des Volumens eines Gewebes nimmt der extrazelluläre Raum mit der extrazellulären Matrix ein. Dies ist ein Gemisch aus verschiedenen Proteinen und Polysacchariden, die von Zellen sezerniert werden und mit deren Oberflächen in enger Verbindung stehen. Es gibt in der extrazellulären Matrix drei Hauptklassen von Makromolekülen. Erstens, Polysaccharide vom Glykosaminoglykan-Typ, die gewöhnlich kovalent an Proteine zu einem Proteoglykan gebunden sind. Zweitens, faserförmige Proteine, wie zum Beispiel Kollagene oder Elastin und drittens, Anker-moleküle wie Laminin, die sowohl Bindungs- als auch Struktur-funktionen besitzen. Die Proteoglykan-moleküle bilden eine stark hydratisierte, gelähnliche Grundsubstanz, in der die faserförmigen Matrixproteine eingebettet sind. Die sehr komplex strukturierte extrazelluläre Matrix reguliert Überleben, Entwicklung, Wachstum, Form und Funktion von Zellen (*Alberts et al., 2004*).

Verschiedene Familien von Zelladhäsionsmolekülen sind für die neuronale Navigation wichtig (*Walsh et al., 1997*). Zu diesen Molekülen zählen die Calcium-unabhängigen Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), die Cadherine, die transmembranen Semaphorine, die Ephrine und Substrat-Adhäsionsmoleküle wie die Integrine (*Drescher et al., 1996; Anton et al., 1999; Lallier et al., 1994, 2000*). Es wurde experimentell gezeigt, dass das Wachstum von Axonen entlang sogenannter Pionier-Axone und die Orientierung an Wegweiserzellen (engl.: „Guide Post Cells“) von bestimmten CAMs abhängig ist, die diese Zellen exprimieren (*Walsh et al., 1997*). Die Umgebung von Neuronen in Form benachbarter Zellen oder der umgebenden extrazellulären Matrix kann Navigationsinformationen an wandernde Zellen oder motile Zellstrukturen über direkte Zell-Zell-Kontakte oder Zell-Matrix-Kontakte vermitteln. Derartige Moleküle kann man als sogenannte stationäre oder auch als Leitfaktoren mit einem geringen Aktionsradius bezeichnen (engl. short range cues) (*Goodman und Tessier-Lavigne, 1996*). Man findet sie fixiert auf der Oberfläche von Zellen oder im Netzwerk der extrazellulären Matrix, wo sie das Substrat bilden, auf dem Zellen wachsen und auch migrieren. So werden während der Ontogenese Wege für in der Entwicklung später folgende Zellen angelegt, die in ihrer Substanz integrierte Wegweiser schon enthalten, ähnlich wie ein Autofahrer während der Fahrt durch die Fahrbahnmarkierung Richtungsinformationen erhält.

**Tabelle 1: Familien der Zelladhäsionsmoleküle.**

Zusammengestellt nach Alberts et al., 2004 und (a) Büttner et al., 2003.

|  | <i>Auswahl an Familienmitgliedern</i> | <i>Ca<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup> Abhängigkeit</i> | <i>homophil oder heterophil</i> | <i>Verbindungen mit dem Cytoskelett</i>                      |
|--|---------------------------------------|--|---------------------------------|--|
| <u><i>Zell/Zell-Adhäsion vermittelnde Moleküle</i></u>               |                                       |  |                                 |  |
| <i>Klassische Cadherine</i>  | E,N,P,VE                              | ja   | homophil                        | Actinfilamente über Catenine                                 |
| <i>Desmosomale Cadherine</i>   | Desmoglein                            | ja   | homophil                        | Intermediärfilamente (über Desmoplakin und andere Proteine)  |
| <i>Ig-Familienmitglieder</i>   | N-CAM 180                             | nein   | beides                          | α + β-Tubulin(a)<br>β-Actin(a)                               |
| <i>Selectine (ausschließlich in Blut- und anderen Epithelzellen)</i> | L-, E- und P-Selectine                | ja   | heterophil                      | Actinfilamente   |
| <i>Integrine auf Blutzellen</i>                                      | α <sub>1</sub> β <sub>2</sub> (LFA-1) | ja   | heterophil                      | Actinfilamente   |
| <u><i>Zell/Matrix-Adhäsion vermittelnde Moleküle</i></u>             |                                       |  |                                 |  |
| <i>Integrine</i>   | zahlreiche Formen                     | ja   | heterophil                      | Actinfilamente (über Talin, Filamin, α-Actinin und Vinculin) |
|  | α <sub>6</sub> β <sub>4</sub>         | ja   | heterophil                      | Intermediärfilamente (über Plectin)                          |
| <i>Transmembrane Proteoglykane</i>                                   | Syndecan                              | nein   | heterophil                      | Actinfilamente   |

### **1.2.3. Leitung des axonalen Wachstums durch diffusible Faktoren**

Inspiziert von der amöboiden Morphologie von Wachstumskegeln und der damals schon bekannten Tatsache, dass Leukocyten Chemotaxis zeigten, schlug der spanische Neuroanatom Ramon y Cajal vor, dass die Wanderung von Neuroblasten und Wachstumskegeln durch chemische Gradienten diffusibler Moleküle geleitet werden könnte (*Cajal, 1995*). Von bestimmten Zellen sezernierte diffusible Leitfaktoren könnten wandernden Zellen oder Wachstumskegeln Richtungshinweise geben. Diese bezeichnet man als Faktoren mit einem weiten Aktionsradius (engl.: „long range cues“). Solche Moleküle können in räumlicher Entfernung Einfluß auf migrierende Zellen oder Zellfortsätze haben. Die Zellen, an die sich diese Signale richten, erfahren also schon in weitem Abstand eine Navigationsinformation über das Gebiet in dem sie sich befinden. Durch diffusible Faktoren können ganze Areale für Zellen reserviert oder auch gesperrt werden.

Die Wirkung von Leitfaktoren kann attraktiv (anziehend) oder repulsiv (abstoßend) sein. Diese Einteilung stützte sich auf Beobachtungen, die bei Experimenten mit Zellen in Kultur gemacht wurden. Für viele neuronale Leitmoleküle ist mittlerweile bekannt, dass sie einen attraktiven und einen repulsiven Effekt besitzen können (*Mueller et al., 1999; Bagnard et al., 1998; Song und Poo, 1999*). Diese Bifunktionalität kann durch unterschiedliche Rezeptoraktivierung (*Hong et al., 1999*) oder durch unterschiedliche Konzentrationen von sekundären Botenstoffen im neuronalen Cytoplasma bewirkt werden (*Song und Poo, 1999*). Es besteht auch die Möglichkeit, dass ein Leitfaktor attraktiv auf einen Bereich in einem Neuron wirkt und repulsiv auf einen anderen (zum Beispiel auf dendritische und axonale Bereiche) (*Polleux et al., 2000*). Welche Wirkung Leitfaktoren in ihren Zielzellen entfalten, ist abhängig von der Rezeptorausstattung und von den intrazellulären Signalkaskaden, die in den Zellen aktiviert werden (*Fiore et al., 2003*). Bisher sind mehrere Proteinfamilien von Leitmolekülen bekannt. Zu den gebundenen Leitmolekülen mit einem kurzen Aktionsradius gehören die Ephrine und Transmembranformen der Semaphorine. Zu den diffusiblen Molekülen mit einem weiten Aktionsradius gehören die Netrine, die Proteine der Slit-Familie und die sezernierten Semaphorine (*Fiore et al., 2003*). Auch Wachstumsfaktoren und Neurotrophine wie NGF, BDNF oder NT-3 können chemoattraktive oder repulsive Wirkungen auf die Wachstumskegel von auswachsenden Neuriten zeigen (*Ming et al., 1997; Song et al., 1997*).

Die Rezeptoren für diese Leitfaktoren sind in der Plasmamembran lokalisiert. Sie spielt bei der Signaltransduktion der Leitsignale eine wichtige Rolle. Eine für die Zellmotilität sehr wichtige Komponente der Membran sind dabei die „Lipid Rafts“. Lipid Rafts sind distinkte Domänen der Plasmamembran, die einen hohen Anteil an Sphingolipiden und Cholesterol enthalten und eine geringere Fluidität besitzen als aus Phospholipiden bestehende Areale (*Simons et al., 1997*). Lipid Rafts nehmen bei der Zellmigration eine wichtige Rolle als signalverstärkende Module ein (*Gomez-Mouton et al., 2004*). Sie werden als Plattformen angesehen, welche die Effizienz der

Interaktion zwischen Rezeptoren und deren Signaltransduktionspartnern verstärkt (*Gomez-Mouton et al., 2004*). Man vermutet, dass durch diesen Mechanismus innerhalb einer Zelle nur ein ganz bestimmter Bereich von einem äußeren Signal aktiviert wird (*Gomez-Mouton et al., 2004*). Dadurch könnten innerhalb der Zelle Gradienten von second messenger Molekülen entstehen und sich eine Polarität ausbilden.

**Tabelle 2: Zusammenstellung von Leitfaktoren des Axonwachstums und der Zellmigration.**

Zusammengestellt nach Tessier-Lavigne und Goodman, 1996 und Song und Poo, 2001.

| <b>Leitfaktoren mit kurzer Reichweite<br/>(Kontaktleitung)</b>   | <b>Leitfaktoren mit großer Reichweite<br/>(sezernierte, lösliche Moleküle)</b>   |
|--|--|
| Ephrine<br>Semaphorine mit Transmembrandomänen<br>( Klassen 1, 4, 5, 6 und 7)<br>Laminine<br>Tenascine<br>Zelladhäsionsmoleküle<br>Cadherine | sezernierte Semaphorine<br>( Klassen 2 und 3)<br>Netrine<br>Proteine der Slit-Familie<br>Neurotrophine<br>(NGF, BDNF, NT-3 ) |

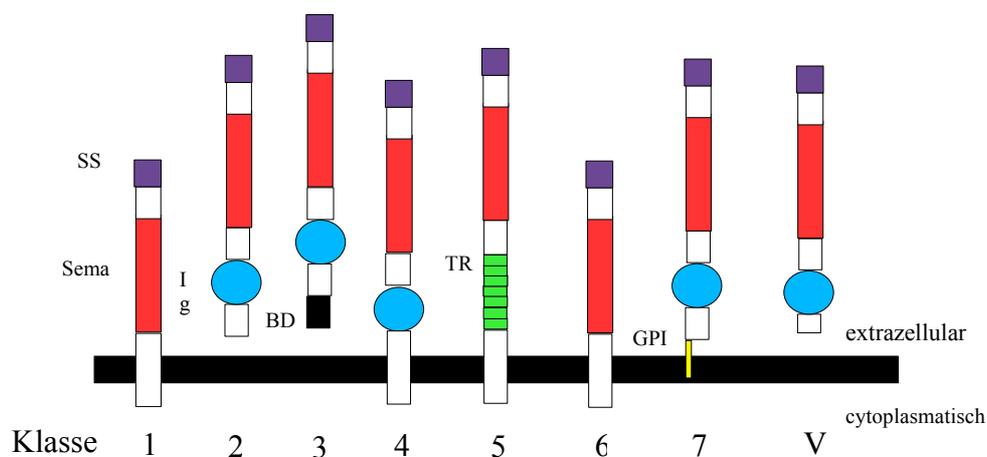
### 1.3. Die Semaphorine

Bei den Semaphorinen handelt es sich um die bis heute größte bekannte Proteinfamilie von Leitmolekülen der axonalen Wegfindung. Mehr als dreißig Mitglieder dieser Familie sind identifiziert worden. Charakterisiert sind alle Mitglieder durch eine gemeinsame aus circa 500 Aminosäuren bestehende, konservierte N-terminal liegende sogenannte Sema-Domäne (*Kolodkin et al., 1993*). Diese dreißig Familienmitglieder wurden in acht Klassen unterteilt, wobei die Sequenzhomologie der Sema-Domänen und das Vorhandensein von sogenannten carboxyterminalen Domänen als Grundlagen für die Klassifizierung diente (*Semaphorin Nomenclature Committee, 1999*). Bei den carboxyterminalen Domänen handelt es sich beispielsweise um immunglobulinartige Domänen, gefolgt von einem nicht konservierten Abschnitt der Aminosäuresequenz (für die Klassen 2-4 und 7).

Semaphorine der Klassen 1 und 2 wurden nur in Invertebraten gefunden und Mitglieder der Klassen 3-4 und 6-7 kommen bei den Wirbeltieren vor. Die Klasse 5 nimmt eine Sonderstellung ein, da sie sowohl Invertebraten- als auch Vertebraten-Semaphorine enthält. Die Klasse V beinhaltet von viralen Genomen codierte Semaphorine. Entsprechend ihrer subzellulären

Lokalisation unterscheidet man Semaphorine, die durch Transmembrandomänen die Plasmamembran durchspannen (die Klassen 1, 4, 5 und 6) von solchen, die durch einen GPI-Anker an die Membran gebunden sind (Klasse 7). Semaphorine der Klassen 2 und 3 werden sezerniert und diffundieren durch das Gewebe. Allgemein werden Semaphorine der Klasse 3 als große, inaktive Pro-Proteine synthetisiert, die eine proteolytische Prozessierung durch das Enzym Furin erfahren und so in ihren aktiven Zustand überführt werden. Das Ergebnis dieser Prozessierung sind verschiedene Isoformen, die sich in ihrer repulsiven Aktivität unterscheiden. Diese unterschiedlich prozessierten Semaphorine der Klasse 3 könnten wichtig sein für die Modulation ihres chemorepulsiven Potentials während der Entwicklung eines Organismus (*Fiore et al., 2003*).

Die Semaphorine sind aber nicht nur an der Lenkung von Axonen beteiligt, sondern haben auch einen Einfluß auf die Zellmigration. So spielen sie zum Beispiel eine Rolle bei der Migration von Neuralleistenzellen während der Embryonalentwicklung (*Eickholt et al., 1999*). Dies zeigt, dass dieselben Moleküle sowohl bei der Zellmigration als auch bei der axonalen Wegfindung beteiligt sein können und sich möglicherweise auch der gleichen intrazellulären Signaltransduktionswege bedienen (*Song und Poo, 2001*).



**Abbildung 2: Die Klassen der Semaphorine.** Semaphorine kommen als sezernierte, Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte oder membrandurchspannende Proteine vor. Die Klassen 1 und 2 beinhalten die Semaphorine der Wirbellosen, die Klassen 3 bis 7 die der Wirbeltiere. Die Klasse V repräsentiert die viralen Semaphorine. Die Lage der Signalsequenz (SS) ist mit dargestellt. In vivo wird sie im ER abgespalten.

Abkürzungen: Sema, Semaphorin Domäne; Ig, immunglobulinartige Domäne; BD, basische Domäne; TR, Trombospondin Domäne; GPI, Glycosylphosphatidylinositol-Anker

### 1.3.1. Semaphorin 3A/Collapsin-1

Das bis heute am besten untersuchte Mitglied der Semaphorin-Familie ist das Semaphorin 3A, das auch unter dem Namen Collapsin-1 bekannt ist. Semaphorin 3A hat eine stark repulsive Wirkung auf auswachsende Axone. Dies wurde für viele verschiedene Arten von Neuronen *in vitro* gezeigt, wie zum Beispiel für embryonale, dorsale Wurzelganglionzellen (*Luo et al., 1993*), für sympathische Ganglionzellen (*Koppel et al., 1997*) und spinale Motoneurone (*Varela-Echavarría et al., 1997*). Ebenfalls zeigt sich eine abstoßende Wirkung auf cerebrale corticale Projektionsaxone (*Polleux et al., 1998*) und hippocampale Axone (*Chedotal et al., 1998*). Die Semaphorine der Klasse 3 besitzen zumindest *in vitro* die Möglichkeit, auch attraktiv zu wirken. Das Sema 3C wirkt attraktiv auf Wachstumskegel von corticalen Neuronen (*Bagnard et al., 1998*), und das Sema 3B zeigt einen attraktiven Effekt auf Axone, die aus dem Riechkolben auswachsen (*de Castro et al., 1999*). Für das Sema 3A ist sogar gezeigt worden, dass es einen unterschiedlichen Effekt auf das Axon und die Dendriten von ein und derselben Zelle haben kann. Im cerebralen Cortex hat das Sema 3A eine attraktive Wirkung auf die apikalen Dendriten von pyramidalen Neuronen, wohingegen es ihre Axone abstößt (*Polleux et al., 1998, 2000*). Die strukturellen Voraussetzungen, die das Semaphorin 3A erfüllen muß, um seine Wirkung zu entfalten, ist einmal der Besitz einer sogenannten Sema-Domäne innerhalb seines Moleküls und zum anderen die Bindung an ein zweites Sema 3A-Molekül zu einem Homodimer (*Klostermann et al., 1998; Koppel et al., 1998*).

Das Semaphorin 3A wurde zuerst beim Huhn entdeckt (*Luo et al., 1993*). Die Wirkung von Semaphorin 3A auf Hinterwurzelganglien äußert sich in einer schnellen Umorganisation des Cytoskeletts in betroffenen Wachstumskegeln, in denen das Actin in für aktive Wachstumskegel charakteristischen Filopodien seine filamentöse Struktur verliert (*Fan et al., 1993*). Als Reaktion auf diese Umorganisation zeigen die Wachstumskegel dieser Axone eine nadelartige, kollabierte Silhouette und wandern nicht mehr weiter vorwärts (*Nakamura et al., 2000*). Man spricht dann auch von einem Kollaps des Wachstumskegels. Die Bezeichnung „Wachstumskegelkollaps“ beschreibt somit den Verlust von Lamellipodien und Filopodien. Dies kann Zeichen einer Reaktion auf einen repulsiven, extrazellulären Leitfaktor sein, wie zum Beispiel das Semaphorin 3A (*Gallo und Letourneau, 2004*). Bei den ersten Betrachtungen dieses Phänomens ging man davon aus, dass der Verlust von protrusiven Strukturen alleine auf die Depolymerisierung dieser Strukturen darstellenden F-Actins zurückzuführen sei (*Fan et al., 1993*). Neuere Beobachtungen zeichnen aber ein differenzierteres Bild der Ursachen dieses Effekts. So wurde beobachtet, dass nur der Teil eines Wachstumskegels kollabiert, der lokal mit einer Semaphorin 3A Quelle in Kontakt gerät. Andere Bereiche desselben Wachstumskegels bleiben unbeeinflusst (*Fan und Raper, 1995*). Bei Untersuchungen zur Rolle von Eicosanoiden beim Wachstumskegelkollaps fiel auf, dass es in Wachstumskegeln zwar zu einer Depolymerisation von F-Actin kam, wenn ein Semaphorin 3A-

Signal präsent war, der Wachstumskegel in seiner Struktur aber erhalten blieb (*Mikule et al., 2002*). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Cytoskelett-Veränderungen bei einem Wachstumskegelkollaps über eine einfache Depolymerisation des F-Actins hinausgehen. Gallo und Letourneau (*2004*) schlugen vor, dass der Kollaps eines Wachstumskegels die Aktivierung von mehreren Signaltransduktionswegen voraussetzt, die wiederum verschiedene Komponenten des Wachstumskegels beeinflussen (*Gallo und Letourneau, 2004*). Bis heute weiß man, dass an der Übertragung des Semaphorin 3A Signals die Rho-GTPasen (*Liu und Strittmatter, 2001*), ADF und Cofilin (*Aizawa et al., 2001*) und verschiedene Proteinkinasen wie GSK-3 $\beta$  (*Eickholt et al., 2002*), Fyn (*Sasaki et al., 2002*), Cdk5 (*Brown et al., 2004*) und Fes (*Mitsui et al., 2002*) beteiligt sind. Gallo und Letourneau (*2004*) versuchten eine Liste der Ereignisse aufzustellen, die eintreten müssen, damit es zu einem Wachstumskegelkollaps kommt. Zu diesen Ereignissen zählt die Umorganisation des Actincytoskeletts. Dies beinhaltet zum Beispiel die Auflösung von Actinbündeln, die in einem intakten Wachstumskegel in Filopodien und Lamellipodien vorhanden sind. Während eines Kollaps eines Wachstumskegels werden diese Strukturen abgebaut (*Zhou und Cohan, 2001*). Zusammengefaßt zeigen diese Befunde, dass es sich bei einem Kollaps eines Wachstumskegels um einen sehr komplexen Vorgang handelt, der auf unterschiedlichen Ebenen reguliert wird. Ein Hauptziel der weitergehenden Forschungen ist die Auffindung der Elemente, die diese einzelnen Ebenen miteinander verbinden und so das Ereignis eines partiellen oder totalen Wachstumskegelkollaps steuern.

### **1.3.2. Der Rezeptorkomplex für Semaphorin 3A**

Als einen möglichen Rezeptor für das Semaphorin 3A identifizierte man Neuropilin-1 durch eine Expressionsklonierung (*He et al., 1997*). Weitere Studien zeigten aber, dass das Neuropilin alleine nicht in der Lage ist, ein Semaphorin 3A-Signal in die Zelle weiterzuleiten (*Nakamura et al., 1998*). Die Identifikation von Plexin-C1 und Drosophila Plexin-A als Rezeptoren für das vom Vaccinia Virus codierten Semaphorin A39R und Drosophila Sema-1a, eröffnete die Möglichkeit, dass Plexine die fehlende, signalübertragende Komponente an der Membran sein könnten (*Comeau et al., 1998; Winberg et al., 1998*). Die Plexine bilden eine Familie von integralen Membranproteinen mit einer hoch konservierten cytoplasmatischen Domäne. Im Säugetiergenom sind neun Plexingene bekannt, die in vier Gruppen von A bis D eingeteilt werden (*Tamagnone et al., 1999; Cheng et al., 2001*). An ihrem Aminoende besitzen sie eine Sema-Domäne, die eine mittlere Sequenzhomologie zu der Sema-Domäne der Semaphorine aufweist. In Wirbeltieren werden die Plexine im sich

entwickelnden zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert, in hippokampalen, corticalen, sensorischen und sympathischen Neuronen (*Murakami et al., 2001; Cheng et al., 2001*). Aus diesen beiden Komponenten wurde ein Modell entwickelt, in dem das Neuropilin-1 den Sema 3A bindenden Teil übernahm und das Plexin-A1 den transduzierenden Teil für das Signal über die Membran hinweg (*Takahashi et al., 1999*). Der cytoplasmatische Teil des Plexins enthält allerdings keine offensichtliche katalytische Domäne, durch die direkt andere Proteine phosphoryliert werden könnten (*Tamagnone und Comoglio, 2000*). Ähnlich wie bei Cytokin-Rezeptoren (JAK/STAT-Weg) ist der Rezeptorkomplex mit cytoplasmatischen Tyrosinkinasen gekoppelt, die eine cytosolische Phosphorylierung von Zielproteinen vornehmen. Diesen Teil übernehmen beim Plexin cytosolische Tyrosinkinasen wie zum Beispiel die zur Src-Familie gehörende Kinase *Fyn* (*Mitsui et al., 2002*) oder die Kinase *Fes* (*Sasaki et al., 2002*). Diese beiden Kinasen werden durch die Bindung des Liganden Semaphorin 3A an den Neuropilin/Plexin-Rezeptorkomplex aktiviert und starten dann ihre Kinase-Aktivität, um das Signal intrazellulär weiterzuleiten. Eine zusätzliche Komponente dieses Rezeptorkomplexes in Säugetieren ist das Zelladhäsionsmolekül L1 (L1-CAM) (*Castellani et al., 2000*). Bisher ist aber noch nicht bekannt, ob L1-CAM direkt an der Signaltransduktion des Sema 3A Signals beteiligt ist.

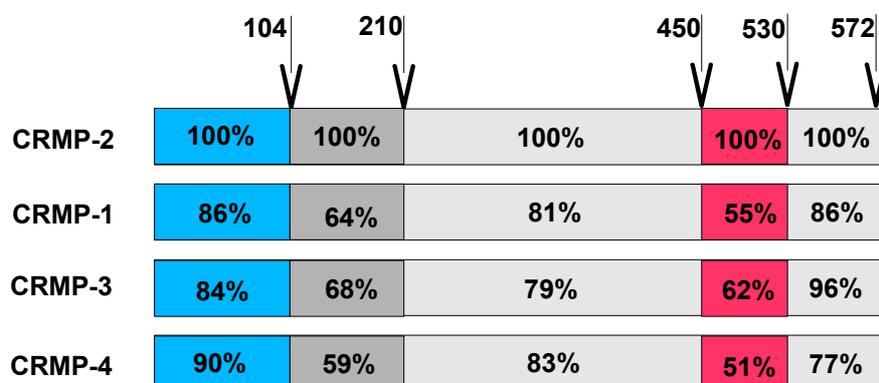
#### **1.4. Die Collapsin Response Mediator Proteine**

Um die Mechanismen zu verstehen, die dazu führen, dass ein bestimmter Leitfaktor die Motilität eines Wachstumskegels verändert, müssen die Moleküle, die an der Signaltransduktion vom Rezeptor zum Cytoskelett beteiligt sind, bekannt sein. Eine Familie von Proteinen, die an der Signalvermittlung des Semaphorin 3A beteiligt sind, sind die Collapsin Response Mediator Proteine (CRMPs). Diese Protein-Familie beinhaltet vier Mitglieder, die in der Literatur für verschiedene Spezies (Huhn, Ratte, Krallenfrosch, Rind und Mensch) unter den Bezeichnungen CRMP-1 bis CRMP-4 bekannt sind. Da die Mitglieder dieser Familie unabhängig voneinander in verschiedenen Labors entdeckt wurden, sind Homologe zu diesen Proteinen aus anderen Spezies auch unter anderen Namen in die Literatur eingegangen und es existieren sogar unterschiedliche Bezeichnungen innerhalb derselben Spezies (*Quinn et al., 1999*). Die geläufigste und am weitesten verbreitete Bezeichnung ist allerdings die als CRMPs.

Tabelle 3: Homologe und Bezeichnungen der CRMPs.

| <i>Bezeichnung des Homologs</i>  | <i>Spezies</i>   |
|--|--|
| <b>CRMP</b><br>C <u>ollapsin</u> R <u>esponse</u> M <u>ediator</u> P <u>rotein</u> | Ratte<br>( <i>Goshima et al., 1995</i> )   |
| <b>TOAD-64</b><br>T <u>urned</u> o <u>n</u> a <u>fter</u> d <u>ivision</u>         | Ratte<br>( <i>Minturn et al. 1995</i> )  |
| <b>Ulip</b><br>U <u>nc-33</u> l <u>ike</u> P <u>rotein</u>                         | Maus<br>( <i>Byk et al., 1998</i> )  |
| <b>DRP</b><br>D <u>ihydropyrimidinase</u> r <u>elated</u> P <u>rotein</u>          | Mensch<br>( <i>Hamajima et al., 1996</i> )   |
| <b>TUC</b><br>Akronym aus Toad, Ulip und CRMP                                      | Versuch eine allgemein gültige Bezeichnung<br>für die Homologen einzuführen<br>( <i>Quinn et al., 1999</i> ) |

Die Collapsin Response Mediator Proteine (CRMPs) sind cytosolische Phosphoproteine, die im Nervensystem exprimiert werden (*Minturn et al., 1995; Wang und Strittmatter, 1996; Byk et al., 1998*). Das erste Mitglied der Familie wurde von Minturn et al. (1995) unter dem Namen TOAD-64 (turned on after division) identifiziert als ein Protein, das neuronale Vorläuferzellen exprimieren, nachdem sie ihre letzte Zellteilung absolviert haben. Der Expressionslevel von TOAD-64 zeigte nach der charakteristischen letzten Zellteilung einen siebenfachen Anstieg (*Minturn et al., 1995*). Eine Sequenzanalyse des TOAD-64 zeigte eine Homologie zu einem Gen namens *unc-33* aus *C. elegans*. Ein Fehlen von *unc-33* in dem Nematoden zeigte sich in einer inkorrekten Verlängerung auswachsender Axone, weshalb bei dieser Wurmmutante unkoordinierte Bewegungen auftreten (*Hedgecock et al., 1985*). Die Homologie zwischen den beiden Proteinen führte zur Annahme, dass TOAD-64 eine Rolle bei der Leitung von auswachsenden Axonen spielen könnte. Unabhängig davon fiel das gleiche Protein einer zweiten Forschergruppe auf, die nach Kandidaten für Vermittler des extrazellulären Semaphorin 3A Signals suchten. Durch einen in sensorische Neurone eingebrachten Antikörper, der gegen einen konservierten Bereich der CRMPs gerichtet war, konnte der Wachstumskegelkollaps trotz der Einwirkung von Semaphorin 3A unterdrückt werden, woraus zu vermuten war, dass CRMPs für die Signaltransduktion von Semaphorin 3A essentiell sind. Dieser Befund führte auch zu dem Namen Collapsin Response Mediator Protein (CRMP) (*Goshima et al., 1995*). Nach dem CRMP-2 wurden noch drei weitere homologe Familienmitglieder identifiziert (*Wang und Strittmatter, 1996*), die einen Homologiegrad auf der Ebene der Aminosäuresequenz zwischen 70% bis 80% aufweisen.



**Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenz der CRMPs.** Die einzelnen Bereiche zeigen die prozentuale Übereinstimmung im Vergleich zu CRMP-2. Die Aminosäurenummern sind darüber an den Pfeilen markiert. Es zeigt sich, dass die Mitglieder eine große Übereinstimmung in ihren Sequenzen aufweisen. Es wurden die Sequenzen der Maus verwendet.

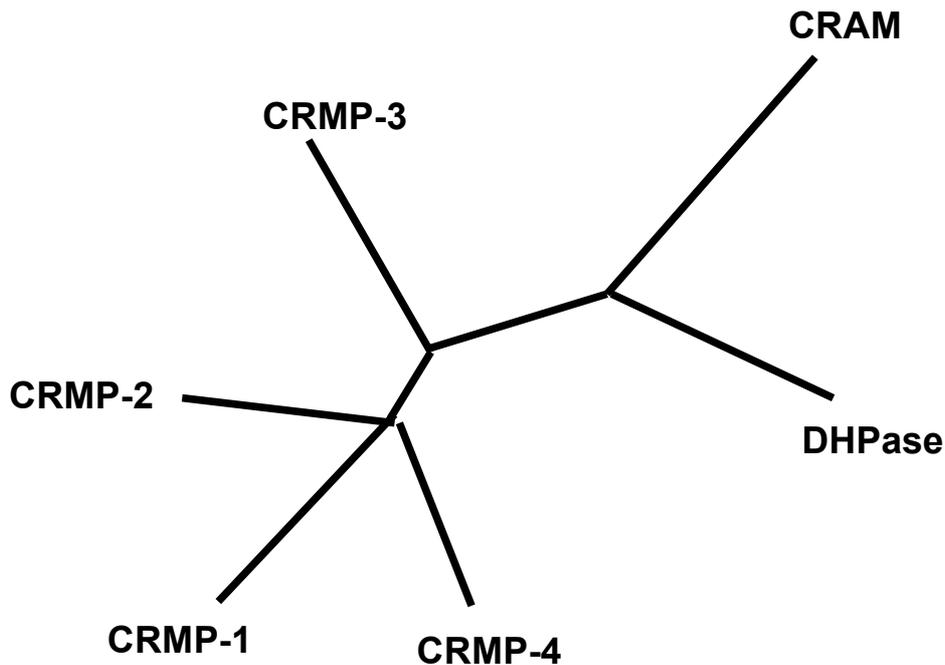
Nach Quinn et al., 1999

Als weiteres Molekül, das mit den CRMPs verwandt ist, wurde CRAM (CRMP-3 Associated Moleküle = CRMP-5) entdeckt (Inatome et al., 2000). Seine Sequenzhomologie beträgt gegenüber Dihydropyrimidinase (DHPase) 51% und gegenüber den CRMPs circa 50%. Da die anderen vier CRMPs sich im Mittel zu ca. 70% in ihren Sequenzen gleichen, scheint das CRAM einer Subfamilie unter den CRMPs anzugehören (Fukada et al., 2000; Byk et al., 1998).

**Tabelle 4: Identität zwischen den einzelnen CRMPs, CRAM und der DHPase.** Verglichen wurden die Aminosäuresequenzen und die angegebenen Werte sind Prozentzahlen. Die verglichenen Sequenzen stammen von der Maus.

|                 | CRAM/<br>CRMP-5 | CRMP-1 | CRMP-2 | CRMP-3 | CRMP-4 | DHPase |
|-----------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CRAM/<br>CRMP-5 | 100             | 49     | 50     | 50     | 49     | 51     |
| CRMP-1          |                 | 100    | 75     | 68     | 73     | 51     |
| CRMP-2          |                 |        | 100    | 75     | 75     | 52     |
| CRMP-3          |                 |        |        | 100    | 69     | 51     |
| CRMP-4          |                 |        |        |        | 100    | 52     |
| DHPase          |                 |        |        |        |        | 100    |

Nach Fukada et al., (2000).



**Abbildung 4: Phylogenetischer Baum der CRMPs, CRAM und DHPase.** Darstellung eines phylogenetischen Baums, der aufgrund der Sequenzähnlichkeit der eingezeichneten Proteine mit Hilfe eines Computerprogramms erstellt wurde.

Nach Fukada et al., (2000).

Bisher ist experimentell die Bildung von Homo- und Heterooligomeren von CRMPs nachgewiesen (Wang und Strittmatter, 1997). Eine Überexpression verschiedener CRMPs in primären Neuronen führte zu einer erhöhten Ausbildung von Neuriten (Fukata et al., 2002; Quinn et al., 2003), und der Verlust des CRMP-1 Gens in Zellen von Lungentumoren zeigte eine erhöhte Invasivität der Tumorzellen. Das noch verbliebene CRMP-1 in diesen Zellen kolokalisierte mit Actinfasern (Shih et al., 2001). Die Phosphorylierung von CRMPs durch die Fes-Kinase (Mitsui et al., 2002) und Rho-Kinase (ROCK) (Arimura et al., 2000) wurde beschrieben, genauso wie die Bindung an Phospholipase D2 (Lee et al., 2002), die Modulation von RhoA und Rac1 (Hall et al., 2001), die Bindung an Plexin A1 (Deo et al., 2004; Mitsui et al., 2002) und die Bindung an Intersectin (Quinn et al., 2003). Desweiteren wurde entdeckt, dass CRMP-1 bis -4 an Tubulin binden und dass CRMP-2 den Aufbau von Mikrotubuli fördert (Fukata et al., 2002). Diese letztgenannten Eigenschaften sind mechanistisch sehr interessant, denn sie zeigen, dass die CRMPs das Tubulincytoskelett regulieren können. Es erscheint klar, dass diese Funktion sehr wichtig ist für das Wachstum von Neuriten. Sie erklärt aber nicht, warum die CRMPs essentiell für einen Wachstumskegelkollaps sind. Dieser ist mit einer grundsätzlichen Umorganisation des Actincytoskeletts in der peripheren Domäne des Wachstumskegels, die keine Mikrotubuli enthält, verbunden. Bis jetzt sind die Mechanismen, die die CRMPs mit dem Actincytoskelett verbinden und den Einfluß, den sie auf dieses nehmen, noch nicht bekannt.

Tabelle 5: Bekannte Interaktionspartner der CRMPs.

| <b><i>Collapsin Response Mediator Protein</i></b> | <b><i>Interaktionspartner</i></b>  | <b><i>Literatur</i></b>   |
|---|--|---|
| CRMP-1  | Fes<br>Plexin A1<br>Tubulin  | <i>Mitsui et al., 2002</i><br><i>Deo et al., 2004</i><br><i>Fukata et al., 2002</i>   |
| CRMP-2  | Phospholipase D2<br>GSK-3 $\beta$<br>Fes<br>Rho-Kinase<br>Cdk5<br>Mikrotubuli<br>Tubulin<br>NCAM-180 | <i>Lee et al., 2002</i><br><i>Cole et al., 2004</i><br><i>Mitsui et al., 2002</i><br><i>Arimura et al.,</i><br><i>Brown et al., 2004</i><br><i>Fukata et al., 2002</i><br><i>Fukata et al., 2002</i><br><i>Büttner et al., 2005</i> |
| CRMP-3  | Fes<br>Tubulin   | <i>Mitsui et al., 2002</i><br><i>Fukata et al., 2002</i>  |
| CRMP-4  | Intersectin<br>Fes<br>GSK-3 $\beta$<br>Tubulin   | <i>Quinn et al., 2003</i><br><i>Mitsui et al., 2002</i><br><i>Cole et al., 2004</i><br><i>Fukata et al., 2002</i>   |
| CRAM  | Fes<br>mitochondriales Septin  | <i>Mitsui et al., 2002</i><br><i>Takahashi et al. 2003</i>  |

## 2. Problemstellung der Arbeit

Diese Arbeit untersucht die subzelluläre Lokalisation und Funktion der Collapsin Response Mediator Proteine, insbesondere die des CRMP-4. Dieses ist Mitglied einer Proteinfamilie von fünf bekannten Proteinen, die die Bezeichnungen CRMP-1 bis CRMP-5 (CRAM) tragen.

Zwei Fragen wurden im einzelnen untersucht:

- 1.) In welcher Beziehung stehen die CRMPs zur Plasmamembran und im Besonderen zu den für die Zellmotilität und Signaltransduktion wichtigen Lipid-Raft-Domänen?
- 2.) In welcher strukturellen und funktionellen Beziehung steht das CRMP-4 zum Actincytoskelett?



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. *Verwendete Materialien, Medien, Organismen und Zellen*

##### 3.1.1. *Geräte*

##### 3.1.1.1. *Mikroinjektion*

Kapillaren: Eppendorf Femtotips Art.-Nr. 5242 952.008 20 Stk.  
Diese werden auf den Kapillarenhalter direkt aufgeschraubt.

Selbstgezogene Kapillaren: Dazu werden Kapillaren der Firma Hilgenberg verwendet.  
Borosilikatgaskapillaren mit Filament 0,1 mm, Enden geschnitten.

|                    |        |                  |
|--------------------|--------|------------------|
| Länge :            | 50 mm  |                  |
| Außendurchmesser : | 1,0 mm | 500 Stk.         |
| Wanddicke :        | 0,1 mm | Art.-Nr. 1404503 |

Kapillaren Puller : Computer controlled electrode puller – Modell 773  
Campden Instruments.

Mikromanipulator : Eppendorf Mikromanipulator 5179  
Eppendorf Femto Jet 5247.

### **3.1.1.2. Mikroskope**

Fluoreszenz-Mikroskope: Zeiss Axiovert 100M Epifluoreszenz Mikroskop, ausgestattet mit einem Neofluar 40x1.3 Ölimmersions-Objektiv und einer digitalen Axiocam Kamera.

Die Aufnahmen wurden mit der Axiovision Software Version 3.1 von Zeiss bearbeitet, die auch eine 3D-Dekonvolutionssoftware beinhaltet.

Konfokales Mikroskop: Leica TCS SP2 konfokales Mikroskop mit einem HCX PL APO 40x/1.25-0.75 Ölimmersions-Objektiv.

Die Aufnahmen wurden mit dem Programm ADOBE PHOTOSHOP bearbeitet.

Lichtmikroskop invers: Zeiss Telaval 31  
Zeiss Axiovert 25

Stereolupe: Zeiss Stemi SV 6

### **3.1.1.3. Inkubatoren**

Forma Scientific: 3121 Wassermantel-Inkubator

Schüttelinkubator: Controlled Environment Incubator Shaker  
New Brunswick Scientific, New Jersey, USA

### **3.1.1.4. Geräte für Elektrophorese und Westernblot**

Stromversorgung: Bio Rad Power Pac 200

Elektrophoresekammern: Bio Rad Mini Protean Cell

Semi Dry Westernblot: Bio Rad Transblot SD Cell

### **3.1.1.5. Geräte für molekularbiologische Arbeiten**

Spektrophotometer: DU 640 Beckman, Deutschland

Heizblock: Block Heater, Stuart Scientific, UK

### 3.1.1.6. Zentrifugen

|                 |                            |
|-----------------|----------------------------|
| Beckman Coulter | Optima TLX Ultrazentrifuge |
| Beckman Coulter | L7-65 Ultrazentrifuge      |
| Eppendorf       | Tischzentrifuge 5415 D     |
| Heraeus         | Labofuge 400 E             |

### 3.1.2. Verwendete Organismen und Zellen

#### 3.1.2.1. Kaninchen

Weißes Neuseeland Kaninchen (Lammers, Euskirchen)

#### 3.1.2.2. Ratten

Wistar Ratten

#### 3.1.2.3. Zelllinien

|         |                                  |
|---------|----------------------------------|
| HEK-293 | Humane, embryonale Nierenzellen  |
| Hela    | Humane Cervix-Carcinom-Zelllinie |
| B35     | Neuroblastom-Zelllinie der Ratte |
| NT2     | Humane Neuroteratom-Zelllinie    |

#### 3.1.2.4. Bakterienstämme

|              |   |
|--------------|---|
| E. coli BL21 | Genotyp: F <sup>-</sup> ompT, hsd SB (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )   |
| E. coli DH5α | Genotyp: F <sup>-</sup> /endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) supE44 thi 1recA1 gyrA (Nal <sup>r</sup> ) relA1Δ<br>(lacZYA-argF) <sub>U169</sub> (m80lacZΔ M15) |

### 3.1.3. Puffer, Medien und Lösungen

#### Luria-Bertani Medium zur Anzucht von Bakterien.

Zutaten für 1 Liter Medium:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g Natriumchlorid

Die Bestandteile gut mischen, den pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und dann steril autoklavieren.

#### Tris/Acetat-EDTA Puffer (TAE) 50x

2 M Tris-Base

100 mM EDTA

mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt

#### Tris gepufferte Salzlösung (TBS)

Zutaten für 1 Liter Puffer in 10-facher Konzentration (10x).

61 g Tris - Base

90 g Natriumchlorid

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

Den pH der Lösung mit konz. HCl auf 7,4 einstellen.

#### Tris gepufferte Salzlösung mit 0,05% Tween 20

Zutaten für 1 Liter Puffer in 10-facher Konzentration (10x), pH 7,4.

61 g Tris - Base

90 g Natriumchlorid

5 ml Tween 20

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

#### Basis Medium für die Zellkultur

|       |                         |           |           |              |
|-------|-------------------------|-----------|-----------|--------------|
| Gibco | DMEM – Nut Mix F12      | 500 ml    | Best.-Nr. | 21331-020    |
| PAN   | FCS                     | 50 ml     | Best.-Nr. | 3402-P991307 |
|       | Glutamin                | 1 Aliquot |           |              |
|       | Penicillin/Streptomycin | 1 Aliquot |           |              |

**N2-Medium für primäre, corticale Neurone** (modifiziert nach A. Püschel)

Ansatz für 100 ml Medium

| Komponente              | Menge | Konzentration Stammlösung | Endkonzentration |
|-------------------------|-------|---------------------------|------------------|
| DMEM – Nut Mix F12      | 81 ml |                           |                  |
| PAN FCS                 | 10 ml |                           | 10 %             |
| Glutamin                | 1 ml  |                           |                  |
| Penicillin/Streptomycin | 1 ml  |                           |                  |
| Glucose                 | 5 ml  | 120 mg/ml                 | 6 mg/ml          |
| Insulin                 | 1 ml  | 2,5 mg/ml                 | 25 µg/ml         |
| Transferrin             | 1 ml  | 10 mg/ml                  | 100 µg/ml        |
| Progesteron             | 10 µl | 0,57 mg/ml                | 57 µg/ml         |
| Selenit                 | 10 µl | 5,2 mg/ml                 | 520 µg/ml        |

**Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS).**

Zutaten für 1 Liter Puffer in 10-facher Konzentration (10x), pH 7,4.

80 g Natriumchlorid

2 g Kaliumchlorid

14,4 g Dinatriumhydrogenphosphat

2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat

**Polymerisationspuffer für Actin-Kosedimentationsassay (10x)**

100 mM Imidazol

20 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM EGTA

pH = 7,4

**Blocklösung für die Zellkultur**

1x PBS mit 3% BSA

**Permeabilisierungslösung für die Zellkultur**

1x PBS mit 0,2% Triton X-100

**Inkubationslösung für Antikörper in der Immuncytochemie**

1x PBS mit 3% BSA und 0,05% Tween

**10x Laufpuffer für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen**

|          |        |
|----------|--------|
| 250 mM   | Tris   |
| 1920 mM  | Glycin |
| 1% (w/v) | SDS    |

**2x Probenpuffer (reduzierend) für die SDS-PAGE**

|            |                   |
|------------|-------------------|
| 2% (w/v)   | SDS               |
| 20% (v/v)  | Glycerin          |
| 0,02%(w/v) | Bromphenolblau    |
| 250 mM     | Tris/HCl (pH 6,8) |
| (20 mM     | DTT)              |

**Polyacrylamid-Stammlösung**

|     |                               |
|-----|-------------------------------|
| 40% | Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) |
|-----|-------------------------------|

**Trenngelpuffer-Stammlösung**

|            |                   |
|------------|-------------------|
| 1,5 M      | Tris/HCl (pH 8,8) |
| 0,4% (w/v) | SDS               |

**Sammelgelpuffer-Stammlösung**

|            |                   |
|------------|-------------------|
| 0,5 M      | Tris/HCl (pH 6,8) |
| 0,4% (w/v) | SDS               |

**Ammoniumperoxodisulfat (APS)**

|           |   |
|-----------|---|
| 10% (w/v) | rekristallisiertes Ammoniumperoxodisulfat in H <sub>2</sub> O |
|-----------|---|

**Zusammensetzung eines 10%igen Polyacrylamid-Trenngels**

|                                       |          |
|---------------------------------------|----------|
| Acrylamid-Stammlösung (ml)            | 7,5      |
| Trenngelpuffer-Stammlösung (ml)       | 15,3     |
| APS (µl)                              | 100      |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) (µl) | 15       |
| H <sub>2</sub> O (ml)                 | ad 30 ml |

**Zusammensetzung eines Sammelgels (4% PAA)**

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| Acrylamid-Stammlösung (ml)       | 1    |
| Sammelgelpuffer-Stammlösung (ml) | 2,6  |
| APS ( $\mu$ l)                   | 100  |
| TEMED ( $\mu$ l)                 | 10   |
| H <sub>2</sub> O (ml)            | 6,29 |

**Puffer für Westernblot nach dem Semi-Dry Verfahren**

|              |          |
|--------------|----------|
| 48 mM        | Tris     |
| 39 mM        | Glycin   |
| 0,037% (w/v) | SDS      |
| 20% (v/v)    | Methanol |

**Blocklösung für Westernblot**

|          |  |
|----------|--|
| 4% (w/v) | Magermilchpulver in TBS/Tween (0,05%) (pH 7,0) |
|----------|--|

**Kolloidale Coomassie-Lösung zur Färbung von PAA Gelen**

|           |   |       |
|-----------|---|-------|
| 1% (w/v)  | Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 | SERVA |
| 40% (v/v) | Methanol                                |       |
| 10% (v/v) | Essigsäure                              |       |
| 50% (v/v) | H <sub>2</sub> O                        |       |

**Entfärbelösung für Coomassie**

|           |                  |
|-----------|------------------|
| 50% (v/v) | Methanol         |
| 10% (v/v) | Essigsäure       |
| 40% (v/v) | H <sub>2</sub> O |

**Fixierlösung für die Silberfärbung von PAA Gelen**

|           |                  |
|-----------|------------------|
| 10% (v/v) | Eisessig         |
| 30% (v/v) | Ethanol          |
| 70% (v/v) | H <sub>2</sub> O |

**Lösung A für die Silberfärbung**

0,5 M Natriumacetat \* 3 H<sub>2</sub>O  
 90 ml Ethanol  
 0,6 g Natriumthiosulfat  
 300 ml H<sub>2</sub>O

**Lösung B für die Silberfärbung**

0,3 g Silbernitrat  
 162 µl Formaldehyd (37%)  
 300 ml H<sub>2</sub>O

**Lösung C für Silberfärbung**

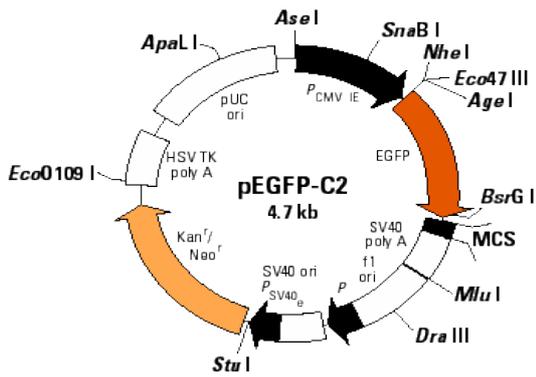
7,5 g Natriumcarbonat  
 90 µl Formaldehyd (37%)  
 300 ml H<sub>2</sub>O

**Lösung D für die Silberfärbung**

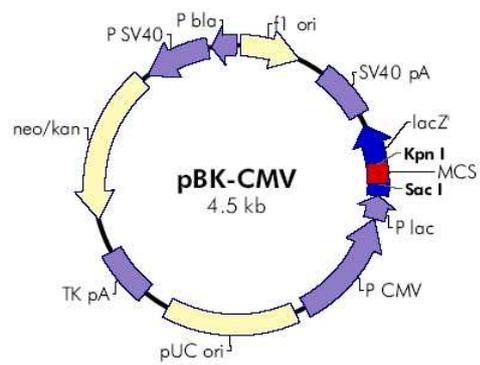
5 g Glycin  
 1,25 g Na<sub>2</sub>-EDTA  
 300 ml H<sub>2</sub>O

**3.1.4. Verwendete Vektoren***Tabelle 6: Verwendete Vektoren.*

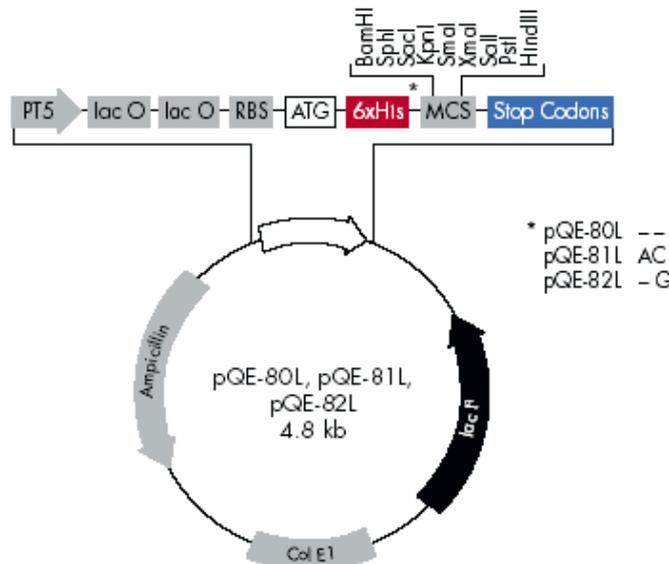
| <i>Vektorbezeichnung</i> | <i>Verwendung</i>  | <i>Hersteller</i> |
|--------------------------|--|-------------------|
| pQE80                    | bakterieller Expressionsvektor<br>mit N-terminalem His <sub>6</sub> -Tag | QIAGEN            |
| pBK-CMV                  | eukaryotischer<br>Expressionsvektor                                      | Stratagene        |
| pEGFP-C2                 | Reportervektor, mit dem<br>Fusionsproteine hergestellt<br>werden können  | Clontech          |



A: Reportervektor pEGFP-C2 für die Expression von GFP-Fusionsproteinen.



B: Eukaryotischer Expressionsvektor pBK-CMV.



C: Bakterieller Expressionsvektor pQE-80 mit N-terminalem His6-Tag.

Abbildung 5: Vektorkarten der verwendeten Vektoren.

### 3.1.5. Verwendete Software

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| Microsoft Excel  | MS Office Excel 97 SR-2                             | 1985-1997 |
| Zeiss Axiovision | Version 3.1 Carl Zeiss Vision GmbH                  | 1998-2002 |
| AIDA             | Advanced Image Data Analyser Version 2.11           | 1999      |
| Image J          | „Image J 1.33u“ (National Institute of Health, USA) |           |

## 3.2. Immuncytochemie

### 3.2.1. Immunisierung von Kaninchen zur Gewinnung von polyklonalen Antiseren gegen CRMP-1, CRMP-2, CRMP-3 und CRMP-5/CRAM

Die Peptidsynthese der Antigene erfolgte wie in Kappler et al. (2000) beschrieben und deren Kopplung mit Keyhole limpet Hämocyanin wurde nach Harlow und Lane (1988) durchgeführt.

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte wie beschrieben in Franken et al. (2003).

|                       |   |
|-----------------------|---|
| Die Antikörper CRMP-1 | (CRMP-1-Peptid, Aminosäuren 504-527 aus Ratten-CRMP-1<br>YEVPATPKHAAPAPSAKSSPSKHQ)  |
| CRMP-2a               | (CRMP-2a-Peptid, Aminosäuren 504-527 aus Ratten-CRMP-2<br>CEVSVTPKTVTPASSAKTSPAKQQ) |
| CRMP-2b               | (CRMP-2b-Peptid, Aminosäuren 147-161 aus Ratten-CRMP-2<br>GIQEEMEALVKDHGV)          |
| CRMP-3                | (CRMP-3-Peptid, Aminosäuren 496-519 aus Ratten-CRMP-3<br>HEVMLPAKPGSGTQARASCSGKIS)  |
| CRMP-5/CRAM           | (CRMP-5-Peptid, Aminosäuren 469-486 aus Ratten-CRMP-5<br>DIVYKCLVQREKTLKVRG)        |

wurden von Prof. Dr. Ralf Hoffmann (BMFZ, Düsseldorf) synthetisiert und an Keyhole limpet Hämocyanin gekoppelt. Die Peptid-Keyhole-limpet-Hämocyanin-Konjugate wurden zur Immunisierung von weißen Neuseeland-Kaninchen (Lammers, Euskirchen, Deutschland) benutzt. Für die erste Immunisierung wurden je 200 µg Peptid, jeweils gelöst in Freund's komplettem Adjuvanz (Sigma), subkutan injiziert. Jedes Tier wurde in jeweils einem Intervall von vier Wochen zweimal mit der gleichen Menge an Antigen, gelöst in Freund's unvollständigem Adjuvanz (Sigma) geboostet. Das gesamte Immunisierungsprotokoll wurde nach den Bestimmungen von § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes, nach Erteilung einer Genehmigung durch die Bezirksregierung Köln durchgeführt.

### **3.2.2. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen**

Nachdem die Zellen auf den Deckgläsern fixiert waren (Inkubation in MEM mit 4% PFA für 10 min. bei Raumtemperatur), wurde in PBS mit 3% BSA für 1 Stunde geblockt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min. in PBS mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Zellen wurden dann mit dem jeweiligen Erstantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit frischem PBS gewaschen und ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. Sowohl für den primären als auch sekundären Antikörper wurde als Inkubationsmedium 3% BSA und 0,05% Tween in PBS benutzt. Die Kerne der Zellen wurden mit DAPI gegengefärbt (Inkubation in DAPI-Lsg. mit  $c = 20$  mg/ml in einer Verdünnung von  $V = 1 : 1000$  für 5 min. bei Raumtemperatur), das Actincytoskelett mit TRITC markiertem Phalloidin (Sigma) ( $c = 100$   $\mu$ g/ml in einer Verdünnung von  $V = 1 : 10.000$  inkubiert für 10 min. bei Raumtemperatur). Die gefärbten Zellen wurden in PBS/Glycerin 50% (w/v) eingedeckelt, unter einem Axiovert 100M Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) betrachtet und fotografiert.

Im Fall der CRMP-4 Injektion in die Hela-Zellen wurden diese Zellen nach der Injektion für 20 Minuten im Brutschrank inkubiert und anschließend mit 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Fixieren wurde 3x mit PBS gewaschen und die Zellen wurden auf PBS gehalten. Die fixierten Zellen wurden für 5 Minuten mit einer 0,2 %-igen Triton X-100 Lösung bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend wieder 3x mit PBS gewaschen.

Dann erfolgte die Inkubation mit einem affinitätsgereinigten anti CRMP-4 Antikörper [ $V = 1 : 500$  in 3 % BSA in TBS-Tween (0,05 %)] für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen gewaschen (3 x PBS) und mit dem Sekundär-Antikörper (anti-rabbit Cy2  $V = 1 : 200$  in 3 % BSA in TBS-Tween (0,05 %)) für ebenfalls 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Actincytoskelett mit TRITC gelabeltem Phalloidin gegengefärbt ( $V = 1 : 1000$  in PBS) für 5 Minuten bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen eingedeckelt und fotografiert.

### 3.2.3. Verwendete Antikörper und deren Arbeitsverdünnungen

Tabelle 7: Verwendete Antikörper und deren Arbeitsverdünnungen.

| <b>Primäre Antikörper</b>   | <b>Verwendung</b> | <b>Verdünnung</b> |
|---|-------------------|-------------------|
| Peptidspezifische Antikörper  |                   |                   |
| CRMP-1, CRMP-2, CRMP-3,<br>CRMP-4, CRMP-5, CRMP-Fam.                  | Westernblot       | V = 1 : 10.000    |
| Affinitätsgereinigter $\alpha$ CRMP-4                                 | Immuncytochemie   | V = 1 : 500       |
| Monoklonaler Maus $\alpha$ NCAM 5B8<br>(Developmental Hybridoma Bank) | Westernblot       | V = 1 : 100       |
| Affinitätsgereinigter $\alpha$ Maus F3<br>(J. Trotter)                | Westernblot       | V = 1 : 2000      |
| $\alpha$ MAP-2<br>Monoklonaler Maus IgG1, Sigma                       | Immuncytochemie   | V = 1: 500        |
| <b>Sekundäre Antikörper</b>   |                   |                   |
| Ziege $\alpha$ Maus Ig Alexa 568<br>Molecular Probes                  | Immuncytochemie   | V = 1 : 500       |
| Ziege $\alpha$ Kaninchen Ig Cy 2<br>Jackson Laboratories              | Immuncytochemie   | V = 1 : 200       |
| Ziege $\alpha$ Kaninchen Ig Cy 3<br>Jackson Laboratories              | Immuncytochemie   | V = 1 : 200       |

## 3.3. Zellkultur

### 3.3.1. Reinigung von Deckgläsern mit $\text{HNO}_3$ .

Die Deckgläser (rund, 12 mm Durchmesser, Marienfeld GmbH, Deutschland) wurden in eine saubere Glasschale gegeben und 4x mit Millipore-Wasser gewaschen. Dann wurden die Gläschen für 36 Std. in eine Glasflasche mit konzentrierter  $\text{HNO}_3$  gegeben und inkubiert. Anschließend wurden die Gläschen 2x 1 Stunde und 2x eine halbe Stunde in Millipore-Wasser gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschschrinen wurde das Wasser immer wieder erneuert. Die Gläschen wurden in einem Trockenschrank getrocknet und dann über Nacht bei 180°C trocken sterilisiert.

### **3.3.2. Zellzahlbestimmung**

Um die Anzahl an suspensierten Zellen in einer Lösung zu bestimmen, wurden Zellzählungen mit Hilfe einer Thoma-Kammer durchgeführt. Dazu werden 100 µl einer Zellsuspension mit 100 µl Trypan-Blau gemischt und in die Thoma-Kammer gegeben. Dort werden dann 2x (4x4) Quadrate ausgezählt und dieses Ergebnis mal 5000 gerechnet. Dies ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

### **3.3.3. Transfektion von Zellen**

Dieser Ansatz gilt für 100µl Gesamtansatz und reicht für vier Kavitäten einer 24-Well-Platte. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 25.000 Zellen/cm<sup>2</sup> (= 50.000 Zellen/Well) ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37°C/5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Für jede Transfektion wurden 2µg an DNA eingesetzt. Das Volumen für diese 2µg an DNA wurde mit 150 mM steriler NaCl-Lösung auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und es wurde gut gemischt. Jeweils 6,6 µl EXGEN500 (Fermentas) wurden zu 43,4 µl 150 mM steriler NaCl-Lösung gegeben und es wurde gut gemischt. Die EXGEN-Lsg. wurde dann zur DNA-Lsg. pipettiert, es wurde gut gemischt und dann 10 min. bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die 24-Well-Platte für die Transfektion vorbereitet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen, um restliches FCS aus den Wells zu entfernen. Dann wurde in jedes Well 250µl serumfreies Medium gegeben. 25µl des Transfektionsansatzes wurden in jeweils ein Well pipettiert (1/10 des Gesamtvolumens) und es wurde kurz gemischt. Die Platte wurde dann für 3Std. im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Transfektion mit einem Milliliter Vollmedium (10% FCS) abgestoppt und die Platte kam wieder in den Brutschrank.

### **3.3.4. Präparation von corticalen Neuronen**

Eine schwangere Wistar-Ratte wurde am Schwangerschaftstag 17 mit Ether betäubt und durch Genickbruch getötet. Die Bauchregion der Ratte wurde mit 70%igem Ethanol übergossen, um das Fell in diesem Bereich zu desinfizieren. Das Fell und die Hautschichten wurden von der darunter liegenden Muskulatur gelöst und die geöffnete Ratte wurde nochmals mit Ethanol desinfiziert. Jetzt wurde der Bauchraum geöffnet und der Uterus freigelegt. Der Uterus wurde vom Körper getrennt und komplett in eine sterile Petrischale überführt. Einzelne Embryonen wurden aus dem Uterus herausgeschnitten und von der Placenta und der Nabelschnur getrennt. Der Kopf solcher Embryonen wurde von dorsal nach ventral abgeschnitten und in eine sterile Petrischale überführt. Der Kopf wurde mit einer Pinzette fixiert und mit einer zweiten Pinzette wird in der Mitte des

Schädels die Schädeldecke durchstoßen. Dann wurde die Schädeldecke komplett abgezogen und so das gesamte Gehirn freigelegt. Mit einem Spatel wurde nun das Gehirn von hinten nach vorne aus der Schädelbasis gehoben und in eine weitere sterile Petrischale überführt. Die beiden Gehirnhemisphären wurden mit einem Spatel vorsichtig nach außen geklappt. Von den nach außen geklappten Hemisphären werden die oberen Drittel mit einem Skalpell abgetrennt und vom Rest des Hirns weggenommen. Von diesen abgetrennten Dritteln werden die Meningen entfernt. Diese können mit Hilfe von Pinzetten vom Hirn getrennt werden. Diese Reinigung ist wichtig, um die entstehende Kultur nicht mit meningealen Fibroblasten zu verunreinigen. Die gesäuberten Teile des Hirns wurden mit einem Skalpell zerkleinert und dann in ein Falcon-Röhrchen mit 50 ml Basis-Medium überführt und 1 min. bei 2000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 10 ml Trypsin/EDTA aufgenommen und bei 37°C für exakt 8 min. im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinlösung wurde abgesaugt, das Gewebe in 10 ml Basis-Medium aufgenommen und 1 min. bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder komplett abgesaugt und das Pellet in 1 ml Basis-Medium aufgenommen. Die Zellvereinzellung erfolgte durch Trituieren mit Pasteurpipetten. Die Pasteurpipetten wurden dazu abgeflammt, damit der Rand nicht scharfkantig war. Die Zellsuspension wurde mehrmals vorsichtig aufgezogen und wieder ablaufen gelassen. Schaumbildung ist zu vermeiden. Eine neue Pasteurpipette wurde abgeflammt um dem Öffnungsradius zu verringern. Zellsuspension mehrmals aufziehen und wieder ablaufen lassen. Zu dieser trituierten Zellsuspension wurde 9 ml Basis-Medium gegeben, die Suspension durch eine Nylon-Gaze (Maschenweite 30 µm) filtriert, das Filtrat in ein 50 ml Falcon überführt und mit Basis-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Nach Zentrifugation (5 min. bei 1500 rpm) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 2 ml für jedes präparierte Hirn N2-Medium aufgenommen. Es folgte die Lebendzellzählung in der Thoma-Kammer.

### **3.3.5. Cholesterol-Extraktion aus lebenden Zellen**

Das Cholesterol aus den Membranen der Zellen wurde mit Hilfe von Methyl-β-Cyclodextrin extrahiert (*Harder et al., 1998*). Dazu wurde eine 5 mM Lösung von Methyl-β-Cyclodextrin in modifiziertem Eagle Medium mit 50 mM HEPES-Puffer, pH 7,3 und 0,35g/Liter Carbonat benutzt. In diesem Medium wurden die Zellen für 45 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie in 4% Paraformaldehyd in MEM für 10 min. bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen. Der Zustand der Wachstumskegel wurde mikroskopisch begutachtet. Die Wachstumskegel wurden dann als kollabiert angesehen, wenn sie keine sichtbaren Filopodien oder Lamellipodien mehr zeigten. Die Häufigkeiten von kollabierten Wachstumskegeln unter den verschiedenen Bedingungen wurden mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests verglichen.

### 3.3.6. Inkubation von Zellkulturen mit verschiedenen Pharmaka

40.000 Zellen wurden in 1 ml N2-Medium pro Well der Platte gegeben. Die Platte wurde dann bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> über Nacht im Brutschrank inkubiert. Corticale Neurone wurden in einer Dichte von 40.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> auf Glas ausgesät, das zuvor mit Poly-D-Lysin beschichtet wurde. Ntera2- und B35-Zellen wurden in DMEM-F12 Medium + 5% FCS, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin herangezogen. Zur Behandlung der Zellen in den Experimenten wurden folgende Reagenzien benutzt:

**Tabelle 8: Verwendete Pharmaka und deren Arbeitskonzentrationen.**

| <b>Reagenz</b>  | <b>Konzentration<br/>Stammlösung</b> | <b>Arbeitskonzentration</b> | <b>Wirkung</b>  |
|---|--------------------------------------|-----------------------------|---|
| Latrunculin A<br>(Sigma, Best.-Nr. L5163)                       | 100 µM in DMSO                       | 1 µM                        | Bindet an G-Actin und verhindert dessen Bindung an Actinfilamente |
| Nocodazol<br>(Sigma, Best.-Nr.M1404)                            | 10 mM in H <sub>2</sub> O            | 20 µM                       | Inhibiert die Polymerisation von freiem Tubulin                   |
| Dibutyryl-cAMP<br>(Sigma, Best.-Nr. D0627)                      | 200 mM in DMSO                       | 1mM                         | Aktiviert cAMP-abhängige Protein Kinase (PKA)                     |
| Phorbol-12-myristat-13-acetat<br>(Calbiochem, Best.-Nr. 524400) | 10 µM in DMSO                        | 100 nM                      | Aktiviert die Protein Kinase C (PKC)                              |
| Okada-Säure<br>(Calbiochem, Best.-Nr. 459620)                   | 10 µM in DMSO                        | 100 nM                      | Inhibitor der Protein Phosphatase 1 und 2A                        |
| Phenylarsenoxid<br>(Sigma, Best.-Nr. P3075)                     | 10 mM in H <sub>2</sub> O            | 100 µM                      | Inhibitor von Tyrosin-Phosphatasen                                |

Strukturen zu den Reagenzien siehe Anhang.

### **3.3.7. Mikroinjektion von rekombinantem Collapsin Response Mediator Protein-4 in Hela-Zellen.**

#### **3.3.7.1. Herstellung von Mikroinjektionskapillaren**

Mit Kapillarrohlingen können eigene Kapillaren für Injektionen gezogen werden. Dazu benötigt man einen sogenannten Mikroelektroden-Puller, der dies unter reproduzierbaren Bedingungen ausführen kann. Die einzelnen Parameter für die Herstellung der gewünschten Form der Kapillaren wurden empirisch bestimmt. Das folgende Programm und die darin aufgeführten Parameter sind nur als ‚Richtwerte‘ anzusehen, da die Form der Kapillarenspitze auch abhängig ist von der Form der Wendel und deren Alter, das heißt wie hoch die Temperatur ist, die sie noch erreicht.

Die angegebenen Werte wurden bei einer neuen Wendel ermittelt.

*Tabelle 9: Parameter des Kapillaren-Pullers zum Ziehen von Injektionskapillaren.*

|          | <i>Heat intensity<br/>(Units)</i> | <i>Heating time<br/>(sec.)</i> | <i>Pulling force<br/>(Units)</i> | <i>Pulling<br/>displacement<br/>(mm)</i> |
|----------|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|--|
| <b>1</b> | 35                                | 0                              | 25                               | 2,0                                      |
| <b>2</b> | 0                                 | 1,0                            | 0                                | 0  |
| <b>3</b> | 30                                | 0                              | 50                               | 24                                       |

Die hier ermittelten Werte werden in den Puller einprogrammiert, eine Rohkapillare wird eingelegt und der Vorgang des Ziehens wird gestartet. Danach kann die fertig gezogene Kapillare dem Puller entnommen werden und die Form und Qualität der Spitze kann unter dem Mikroskop überprüft werden. Da bei den selbstgezogenen Kapillaren die Spitze ungeschützt ist, ist sehr vorsichtig damit umzugehen.

#### **3.3.7.2. Der Mikromanipulator**

Die Kapillare wurde vorsichtig mit 1 bis 2 µl der Probe mit Hilfe eines Eppendorf Micro-Loaders beladen und dann mit Hilfe des Spannkopfes auf den Kapillarenhalter aufgeschraubt.

Die Steuerungseinheit und der Femto Jet wurden eingeschaltet. Nachdem der Femto Jet seinen Arbeitsdruck aufgebaut hatte und die Ventile kalibriert waren, wurde der Kapillarenhalter in dem Mikromanipulator fixiert und über den Injektionsschlauch mit dem Femto Jet verbunden. Es ist darauf zu achten, dass während des Verbindens des Kapillarenhalters mit dem Femto Jet sich dieser im „Capillary change“ Modus befindet. Diesen erreicht man durch einmaliges Drücken der „MODE“ Taste. Ist der Injektionsschlauch mit dem Femto Jet verbunden und der Kapillarenhalter

fest in den Mikromanipulator eingeschraubt, kann man durch erneutes drücken der „MODE“ Taste wieder in den Injektionsmodus zurück gelangen. Die Apparatur ist jetzt bereit für die Injektionen. Eingestellt werden können an der Femto Jet - Einheit noch die Druck- und ein Zeitparameter mit der die Injektionen durchgeführt werden. Die hier aufgeführten Werte sind für HeLa-Zellen und eine Proteinlösung ermittelt worden. Für andere Zelltypen und andere Stoffe, die injiziert werden sollen, können auch andere Werte nötig sein.

Injektionsparameter am Femto Jet für HeLa-Zellen und die Injektion einer Proteinlösung :

**Tabelle 10: Injektionsparameter der Mikroinjektion mit dem Femto-Jet 5247.**

|                    |                          |
|--------------------|--------------------------|
| Injektionsdruck    | $p_i = 110 \text{ hPa}$  |
| Injektionszeit     | $t_i = 0,5 \text{ sek.}$ |
| Kompensationsdruck | $p_c = 15 \text{ hPa}$   |

### **3.3.7.3. Vorbereitung von Zellen für die Mikroinjektion**

Die verwendeten Zellen in diesem Experiment waren HeLa-Zellen. Diese eignen sich für Injektionen gut, da sie relativ groß und stark adhärent sind. Sie werden auf 18 mm Glas Deckgläschen in einer 12-Well-Platte in D-MEM Nut Mix-F12 + 5% FCS+Penicillin/Streptomycin ( $c_{\text{Pen}} = 100 \text{ units/ml}$ ;  $c_{\text{Strep}} = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) am Vortag ausgesät. Die Deckgläschen blieben unbehandelt. Die Dichte der ausgesäten Zellen sollte so gewählt werden, dass die Zellen vereinzelt auf dem Deckgläschen wachsen (ca. 5000 Zellen/Well bei einem 18 mm Deckgläschen). Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen dann einzeln in jeweils eine 3,5 cm Schale mit 2 ml Medium überführt. In dieser Schale erfolgte dann die Injektion.

### **3.3.7.4. Probenvorbereitung**

Das Protein, das in die Zellen injiziert wurde, war ein rekombinantes Protein aus bakterieller Produktion und wurde chromatografisch aufgereinigt (*Rosslbroich, Diplomarbeit, 2000*). Vor der Injektion der Proteinlösung in die lebenden Zellen mußte noch eine weitere Aufkonzentrierung und Umpufferung des Proteins stattfinden. Der Puffer sollte in seinen Salzen und deren Konzentrationen einer isotonen Lösung entsprechen, um die Zelle nicht in einen osmotischen Schock zu versetzen. Das Umpuffern erfolgte mit Hilfe eines Microcon-Röhrchens (Amicon/Microcon YM-10). Der Puffer, in den umpuffert wurde, war 10 mM Tris/100 mM KCl,

pH 7,4.

Für die Umpufferung wurden 500 µl der gereinigten Proteinlösung ( $c = 2,5 \text{ mg/ml}$ ) genommen und diese wurden in einer Zentrifuge bei  $13.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  auf 50 µl eingengt. Zu diesen 50 µl wurden dann 450 µl des physiologischen Puffers zugegeben und es wurde erneut bis auf 50 µl eingengt. Diese Prozedur wurde noch ein zweites Mal wiederholt und die daraus resultierenden 50 µl wurden dann für die Injektionen eingesetzt. Um ausgefallenes Protein oder sonstige Schwebestoffe zu entfernen, damit diese die Kapillare nicht verstopfen, wurde die Proteinprobe dann noch für 2 min. in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei  $13.000 \times g$  zentrifugiert.

### **3.3.7.5. Injektion**

Die 3,5 cm Schale mit dem die Zellen tragenden Deckgläschen wurde auf dem Kreuztisch des Mikroskops fixiert. Da die Injektion nicht in einer Inkubationskammer durchgeführt wurde, sollte man die Zellen nicht länger als 20 Minuten außerhalb des Brutschanks belassen. Um den pH-Wert des Mediums zu stabilisieren, wurden 200 µl eines HEPES-Puffers (250 mM, pH 7,2) zugesetzt. Die Zellen wurden dann fokussiert (Vergrößerung 20-fach oder 40-fach).

Die mit der Proteinlösung beladene und in den Kapillarhalter eingeschraubte Kapillare wurde vorsichtig zu der Schale hinabgefahren, bis sie in das Medium eintauchte. Jetzt wurde in den langsamen Bewegungsmodus des Mikromanipulators umgeschaltet. Weiterhin blieb die Fokusebene des Mikroskops auf die Zellen scharf gestellt und man bewegte die Kapillare in der Horizontalen in den Lichtkegel über dem Objektiv. Im Okular war dann die unscharf erscheinende Kapillare zu sehen. Die Kapillare wurde langsam immer weiter abgesenkt, so dass ihr Bild immer schärfer wurde, bis die Spitze in den Fokus kam und sich damit auf der gleichen Höhe befand wie die Zellen. Die Kapillare kann sogar leicht auf den Boden aufgesetzt werden. Ist die Zellebene erreicht, kann diese Höhe an der Steuerungseinheit eingespeichert werden, was zur Folge hat, dass die Kapillare nicht weiter nach unten bewegt werden kann und somit auch nicht fälschlicherweise zu tief gesetzt werden kann. Wenn man die richtige Höhe gefunden hat, wird die Kapillare ein wenig angehoben, so dass man sich knapp über einer Zelle befindet und man bewegt sie zu dem Punkt über einer Zelle hin, wo man injizieren möchte. Ist das Ziel einer Injektion der Zellkern, so positioniert man die Spitze der Kapillare direkt über den Kern und schaltet an der Steuerungseinheit die Injektionsroutine ein. Dann muß man nur noch den Auslöseknopf am Joystick betätigen und die Injektion wird automatisch durchgeführt. Danach befindet sich die Kapillare wieder in der Ausgangsposition und man kann zur nächsten Zelle fahren, um den Vorgang zu wiederholen. Der tiefste Punkt der Kapillare, der zu Beginn festgelegt worden ist, ist

allerdings nur für höchstens einen halben Radius eines Gesichtsfeldes gültig, so dass dieser immer wieder kontrolliert und gegebenenfalls nachjustiert werden muß. Ist das Ziel einer Injektion das Cytoplasma, so muß man die Kapillare ganz nahe neben den Zellkern positionieren und versuchen, in die Cytoplasma-Verdickung, die durch das Anheben der oberen Membran durch den Zellkern entsteht, zu treffen. Ansonsten läuft diese Injektion genau so ab wie die Kerninjektion.

### **3.3.8. Zeitraffer-Video-Mikroskopie und Einzelzell-Migrationsassay**

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, die zuvor mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichtet wurden, und die mit Flexiperm Silikon Kammern (Kendro) unterteilt wurden. Untersucht wurden sie unter einem Axiovert 100 M Mikroskop (Zeiss) mit einem Neofluar 40x 1.3 Öl Objektiv, einer AxioCam (Zeiss) und einer Inkubationskammer „S“ (Zeiss).

Der Einzelzell-Migrationsassay der B35-Neuroblastomzellen wurde mit Hilfe der „Time lapse“ Video-Mikroskopie wie beschrieben in Prag et al. (2002) durchgeführt. Folgende Änderungen wurden vorgenommen. 100.000 B35-Neuroblastomzellen wurden in eine 35 mm Zellkulturschale (Falcon) ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2µg Plasmid-DNA (wovon 10% pEGFP Marker-Plasmid waren) mit Hilfe des Transfektionsreagenz EXGEN 500 (Fermentas) transfiziert. Die transfizierten Kulturen wurden am nächsten Tag im Migrationsassay untersucht. Für diesen Assay wurden Bereiche in den Kulturschalen ausgesucht, in denen einzelne Zellen deutlich abgrenzbar waren, die nicht mit benachbarten Zellen aggregierten. In diesen Bereichen wurden dann fluoreszenzmikroskopisch mit einem Achroplan 10x Objektiv (Zeiss) Bildsequenzen in zwölf Intervallen von jeweils 5 min. aufgenommen (insgesamt 60 min.) Die Migrationsdistanz zwischen den Zentren der Zellen in den ersten und letzten Bildern einer Aufnahmesequenz wurde interaktiv für alle im Bildausschnitt fluoreszierenden Zellen (im Durchschnitt 20 Zellen pro Gesichtsfeld) mit Hilfe des Axiovisionprogramms gemessen. In einer Schale konnten zwei bis drei Areale ausgewertet werden und die Experimente wurden drei bis fünf mal unabhängig voneinander von der Transfektion an bis zum Auszählen hin wiederholt. Die statistischen Auswertungen wurden mit MS Excel durchgeführt.

### 3.4. Molekularbiologische Arbeiten

#### 3.4.1. Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurden Agarose-Gele verwendet. Die den Gelen zugrundeliegende Agarose-Konzentration richtete sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente.

| Agarose-Konzentration [% (w/v)] | Trennbereich (kB) |
|---------------------------------|-------------------|
| 0,6                             | 20 - 1            |
| 0,9                             | 7 - 0,5           |
| 1,2                             | 6 - 0,4           |
| 1,5                             | 4 - 0,2           |
| 2,0                             | 3 - 0,1           |

#### 3.4.2. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien (*Hanahan, 1983*) wurde auf Eis aufgetaut und mit 1 ng zu transfizierender DNA vorsichtig gemischt. Dieses Gemisch wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend für 90 Sekunden in einem Heizblock auf 37°C erwärmt. Nach dieser Inkubation wurde dem Bakterien-DNA-Gemisch 1 ml von vorgewärmtem LB-Medium zugegeben und der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluß daran wurden 10 bis 500 µl des Transformationsansatzes auf eine, das selektierende Antibiotikum enthaltende LB-Platte ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit den am nächsten Tag gewachsenen Kolonien konnten nach der Überprüfung des transfizierten Plasmids Kulturen zur Plasmid Gewinnung angelegt werden.

#### 3.4.3. Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparationen wurden nach den Vorschriften des Herstellers Qiagen (Qiagen, Plasmid MIDI Kit) und unter Verwendung der gelieferten Puffer und Säulen durchgeführt. Die beschriebene Präparation geht von einem Kulturvolumen von 25 ml aus.

|            |                         |                       |
|------------|-------------------------|-----------------------|
| Puffer 1   | 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) |                       |
|            | 10 mM EDTA              |                       |
|            | 100 µg/ml               | RNase A               |
| Puffer 2   | 0,2 M                   | NaOH                  |
|            | 1 %                     | SDS                   |
| Puffer 3   | 3 M                     | Kaliumacetat (pH 5,5) |
| QBT-Puffer | 750 mM                  | NaCl                  |
|            | 50 mM MOPS (pH 7,0)     |                       |
|            | 15 %                    | Ethanol               |
|            | 0,15 %                  | Triton X-100          |
| QC-Puffer  | 1 M                     | NaCl                  |
|            | 50 mM MOPS (pH 7,0)     |                       |
|            | 15 %                    | Ethanol               |
| QF-Puffer  | 1,25 M                  | NaCl                  |
|            | 50 mM Tris/HCl (pH 8,5) |                       |
|            | 15 %                    | Ethanol               |

Es wurden 25 ml einer Bakterienkultur mit einer  $OD_{600} > 1$  bei  $8500 \times g$  abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml P1-Puffer resuspendiert, in ein Falcon Gefäß überführt und mit 4 ml von Puffer P2 versetzt. Der Inhalt wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden 4 ml von kaltem Puffer P3 zugegeben, sofort gemischt und dann wurde das Gemisch für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei  $4^{\circ}C$  und einer Beschleunigung von  $30.000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch ein Filterpapier filtriert. Das Filtrat wurde auf eine vorher mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA in der Lösung bindet beim Lauf über die Säule an das Silikat-Anionenaustauscher-Material. Nachdem die Lösung mit der Plasmid-DNA vollständig über die Säule gelaufen war, wurde diese 2x mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die gebundene DNA mit 5 ml von Puffer QF eluiert und in einem neuen Falcon Gefäß aufgefangen. Die DNA wurde mit dem 0,7-fachen Volumen des Elutionsvolumens Isopropanol bei RT gefällt und bei  $4^{\circ}C$  und  $4400 \times g$  für 45 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit

70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen von Trispuffer (10 mM; pH 8,5) aufgenommen.

### **3.4.4. Konzentrationsbestimmungen von DNA**

#### **3.4.4.1. Photometrische Bestimmung**

Die photometrische Messung von DNA erfolgte bei 260 nm gegen Trispuffer oder H<sub>2</sub>O in einer Quarzküvette. Eine optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) entspricht einer Konzentration 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

#### **3.4.4.2. Ethidiumbromid-Färbung im Agarosegel**

Für kleine DNA Mengen empfiehlt sich diese Methode zur Konzentrationsbestimmung. Dabei werden auf einem 1%-igen Agarosegel (0,5 µg Ethidiumbromid pro ml) 1 µl der DNA-Probe und 400 ng Hind III gesplante λ-DNA aufgetrennt. Die Fluoreszenzintensitäten der Probe und des Standards (die 2,3 kB Bande entspricht 20 ng an DNA) wurden auf einem UV-Transilluminator verglichen und die DNA-Konzentration der Probe bestimmt.

### **3.4.5. Modifikationen von DNA**

#### **3.4.5.1. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen**

Die Aktivität von Restriktionsendonucleasen wird in Units (U) angegeben. Eine Unit entspricht der Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-Phagen-DNA in einer Stunde vollständig zu schneiden.

Reaktionsansatz für die Spaltung von DNA: 1 µg DNA

2 µl 10 x Puffer (nach Herstellerangabe)

10 U Restriktionsendonuklease

ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Die Ansätze werden 60 min. bei 37°C inkubiert.

### **3.4.5.2. Ligation von DNA**

|   |  |
|---|--|
| Reaktionsansatz für die Ligation von DNA: | 20 ng Vektor-DNA                       |
|   | 4 µl 5x Puffer (nach Herstellerangabe) |
|   | x µl DNA-Fragment (20-100 ng)          |
|   | 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl)             |
|   | ad 20 µl H <sub>2</sub> O              |

Die Ligationen inkubierten 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C.

## **3.5. Allgemeine Arbeiten**

### **3.5.1. Präparation von Lipid Rafts aus dem Gehirn neugeborener Ratten**

Der durch Zentrifugation bei 1000 x g (10 min.) gewonnene postnukleäre Überstand aus einem Homogenat von neugeborenen Rattenhirnen wurde für 20 min. bei 4°C und einer Beschleunigung von 25.000 x g zentrifugiert, um die Membranfraktion zu pelletieren. Das entstandene Pellet wurde in einem 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,2 mit 0,02% NaN<sub>3</sub> resuspendiert. Das gleiche Volumen einer 2x Triton X-100 Lösung (2%) wurden den Membranfraktionen zugesetzt, es wurde gemischt und für 30 min. bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert (4°C; 37°C). Nach der Inkubationszeit wurden alle Lösungen auf 4°C gebracht und mit dem gleichen Volumen einer 80%-igen Saccharoselösung gemischt. 1 ml dieser Lösung wurde dann mit 11 ml eines Saccharose-Dichtegradienten mit einer Dichte von 5% bis 30% langsam überschichtet. Anschließend wurde für 18 h bei einer Temperatur von 4°C und 200.000 x g zentrifugiert. Allen Lösungen waren die Protease-Inhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (1mM), Leupeptin (1µM) und Pepstatin (1µM) zugesetzt.

### **3.5.2. Differentielle Zentrifugation und Detergenzextraktion von Rattenhirn-Homogenaten**

Nach der Dekapitation von neugeborenen Wistar Ratten wurden die Gehirne aus dem Schädel entfernt und auf Eis gekühlt. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Pro Gramm Feuchtgewicht der Gehirne wurden 2,5 ml Homogenisationspuffer

[(25mM HEPES, pH 7,2, 5mM EDTA, 300mM Saccharose, versetzt mit jeweils 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Leupeptin und Pepstatin)] zugegeben und das Hirngewebe wurde sofort in einem Teflon-Glas Douncer mit sechs Stößen homogenisiert. Die freigesetzten Kerne wurden durch Zentrifugation bei 1000 x g für 10 min. abgetrennt. Der bei dieser Zentrifugation entstandene Überstand wurde vom Pellet vorsichtig abgenommen und zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Das Pellet wurde noch einmal mit dem gleichen Volumen an Homogenisationspuffer resuspendiert, gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Überstand wurde mit dem vorher aufbewahrten vereinigt und dem nächsten Zentrifugationsschritt bei 20.000 x g für 30 min. unterzogen. Hierbei pelletierte die Membranfraktion. Wieder wurde der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes abgenommen und für einen weiteren Schritt aufbewahrt. Das entstandene Membranpellet wurde wieder in Homogenisationspuffer aufgenommen, mit 1% (w/v) Triton X-100 Detergenz versetzt und bei 4°C 60 min. lang inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde das unlösliche Material durch eine Zentrifugation bei 120.000 x g für 60 min. pelletiert. Den erhaltenen Überstand bezeichnen wir als „Triton 4°C“ Fraktion. Das pelletierte Material wurde in Extraktionspuffer (Homogenisationspuffer + 1% Triton) resuspendiert und dann für 60 min. bei 37°C inkubiert. Auch dieser Ansatz wurde dann wieder für 1 Std. bei 120.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und als „Triton 37°C“ bezeichnet.

Der Überstand der initialen Membranpelletierung wurde für 1 Std. bei 120.000 x g zentrifugiert und der daraus resultierende Überstand als „lösliche Fraktion“ bezeichnet. Gleiche Aliquots der „löslichen“, „Triton 4°C“ und „Triton 37°C“ Fraktionen wurden über Westernblot analysiert und die Aktivität des Markerenzym Lactat-Dehydrogenase gemessen. Dazu benötigt man einen 0,2 M Tris-HCl Puffer, pH 7,3; eine 6,6 mM NADH Lösung in Tris-HCl, pH 7,3; eine 30 mM Natriumpyruvat-Lösung in Tris-HCl, pH 7,3 und eine Lösung von 10% (w/v) Triton X-100.

Als erstes setzt man einen Reaktionsmix bestehend aus 360 µl der 6,6 mM NADH-Lösung, 360 µl der 30 mM Na-Pyruvat-Lösung und 108 µl der 10 % igen Triton X-100 Lösung an. Dieses Gemisch füllt man dann mit 0,2 M Tris-HCl pH 7,3 auf ein Volumen von 10 ml auf. Mit diesem Reaktionsmix wird der Blindwert des Photometers bei  $\lambda = 340$  nm justiert. Um die Aktivität des Enzyms Lactat-Dehydrogenase in einer Probe zu messen, werden 20 µl der Probe zu 980 µl des Reaktionsgemisches pipettiert, gemischt und das Gemisch für 2 Minuten im Photometer bei  $\lambda = 340$  nm gemessen.

### 3.5.3. F-Actin-Kosedimentationsexperimente

Kosedimentationsexperimente mit CRMP-4 und F-Actin wurden bei einer Beschleunigung von 15.000 x g durchgeführt. 15.000 x g ist eine Beschleunigung, bei der gebündeltes Actin während der Zentrifugation präzipitiert (Weiner *et al.*, 1993; Spoerl *et al.*, 2002). Proteine, die an diese Actinbündel gebunden sind, präzipitieren gemeinsam mit dem F-Actin und sind in einem SDS-Gel des pelletierten Materials als Bande auf der für das Protein charakteristischen Molekulargewichtshöhe zu erkennen.

Für die Experimente wurde F-Actin aus Präparationen aus dem Labor von Frau Professor A. Noegel (Biochemisches Institut I der Universität zu Köln) und Präparationen von CRMP-4 aus unserem eigenen Labor verwendet (Lingsong Dai und Norbert Rösel).

Das von uns bakteriell hergestellte, rekombinante CRMP-4 wurde nach seiner Aufreinigung aus dem Elutionspuffer in einen 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 Puffer durch eine Dialyse umgepuffert. Bevor die Präzipitationsansätze zusammenpipettiert wurden, wurden das Actin und das CRMP-4 durch eine Zentrifugation bei 100.000 x g für 30 min. bei 4°C von größeren Komplexen gereinigt. Nach dieser Zentrifugation wurden die folgenden Ansätze für den Kosedimentationstest zusammenpipettiert und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei betrug das molare Verhältnis von CRMP zu Actin in allen Ansätzen 6 µM Actin zu 8 µM CRMP. Die Endkonzentration des ATP betrug in allen Ansätzen 1 mM.

#### Blindwert für Actin

10 µl Actin (c = 6µM)  
 5 µl 10x Polymerisationspuffer  
 0,5 µl ATP  
 34,5 µl Wasser  


---

 50 µl Gesamtvolumen

#### Blindwert für CRMP-4

25 µl CRMP-4 (c = 8 µM)  
 5 µl 10x Polymerisationspuffer  
 0,5 µl ATP  
 19,5 µl Wasser  


---

 50 µl Gesamtvolumen

#### CRMP-4 mit F-Actin

10 µl Actin (c = 6µM)  
 25 µl CRMP-4 (c = 8µM)  
 5 µl 10x Polymerisationspuffer  
 0,5 µl ATP  
 9,5 µl Wasser  


---

 50 µl Gesamtvolumen

Nach der Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT wurden die Ansätze für jeweils 60 min. bei 4°C und 15.000 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die 50 µl Überstand vorsichtig abgenommen und auf Eis gelagert. Die Pellets wurden in jeweils 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und die Überstände in jeweils 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer. 15 µl jeder Probe wurden dann auf ein SDS Gel aufgetragen. Um zu überprüfen, wie sich das CRMP-2 gegenüber dem Actin verhält, wurde mit diesem der gleiche Kosedimentationstest durchgeführt. Dazu wurden folgende Ansätze gemacht.

#### **Blindwert für CRMP-2**

25,5 µl CRMP-2 (c = 8µM)  
 5 µl Polymerisationspuffer 10x  
 0,5 µl ATP  
 19 µl Wasser  


---

 50 µl Gesamtvolumen

#### **CRMP-2 mit Actin**

10 µl Actin (c = 6µM)  
 25,5 µl CRMP-2 (c = 8µM)  
 5 µl Polymerisationspuffer 10x  
 0,5 µl ATP  
 9 µl Wasser  


---

 50 µl Gesamtvolumen

Um die Gleichgewichtskonstante der Bindung von CRMP-4 an F-Actin zu ermitteln, wurden ebenfalls Zentrifugationsexperimente durchgeführt, bei denen die eingesetzte Konzentration von CRMP-4 variiert wurde. Es wurden Konzentrationen von 8µM, 4µM und 1µM beim CRMP-4 eingesetzt bei einer gleichbleibenden Konzentration von 6µM für das Actin. Nach dem „Spin down“ wurden Aliquots der Proben von Überstand und Pellet auf PAA Gele aufgetragen und diese Gele wurden mit Coomassie-Blau gefärbt. Scans dieser gefärbten Gele wurden in den Computer eingelesen, und die Bilder der Gele wurden einer Densitometrie mit Hilfe des Computerprogramms AIDA unterzogen. Aus den Daten der Densitometrie berechneten sich dann die Verhältnisse von pelletiertem, also gebundenem CRMP-4 zu freiem, und mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes wurden so Gleichgewichtskonstanten errechnet.

### **3.5.4. Quantitative Ermittlung der Kolo-kalisation zweier Proteine und Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson**

Um den Grad einer Kolo-kalisation zwischen zwei Proteinen in einer Zelle zu bestimmen, nutzten wir die Software „Image J 1.33u“ (National Institute of Health, USA). Diese beinhaltet eine Funktion, die es erlaubt, zwei digitale Bilder aus verschiedenen Farbkanälen zu überlagern und auf

Kolokalisationen der beiden Farbsignale hin zu analysieren. Bevor die beiden Kanäle zusammengefügt wurden, wurde bei Bedarf die Bildhelligkeit der beiden Bilder durch eine automatische Funktion des Programms aneinander angeglichen, so dass Intensitätsunterschiede in den Bildern, die durch die Photographie entstanden waren, ausgeglichen wurden. Diese so bearbeiteten Bilder wurden über die „Open“ Funktion im Pull-down-Menü „File“ geöffnet. Beide Grauwertverteilungen der Kanäle wurden dann über den Menüpunkt „Process“ → „Filters“ → „Gaussian Blur“ mit dem eingestellten Parameter „1“ geglättet. Die so eingestellten Kanäle wurden im nächsten Schritt über den Menüpunkt „Image“ → „Color“ → „RGB Merge“ zusammengefügt. In diesem Bild, in dem sich der rote und grüne Kanal überlagerten, wurde dann der Bildausschnitt festgelegt, der analysiert werden sollte. Dazu wurde der Bildausschnitt in ein Rechteck eingegrenzt und die ausserhalb dieses Rechtecks liegenden Bereiche mit der Funktion „Image“ → „Crop“ abgeschnitten. Die ausgewählte Region des überlagerten Bildes wurde für eine Kolokalisationsanalyse herangezogen. Dies geschah über den Menüweg „Plugins“ → „Colocalisation Finder“. Durch diese Funktion erstellt das Programm automatisch eine Abbildung der Orte der höchsten Kolokalisation im ausgewählten Bildausschnitt, ein Streudiagramm als grafische Darstellung der Intensität eines Bildpunktes sowohl im grünen als auch im roten Kanal und einen numerischen Wert, der sich aus der Verrechnung der Bildpunktintensitäten mit der Formel 1 ergibt und den den Korrelationskoeffizienten nach Pearson darstellt. In der Abbildung, in der das Programm das Streudiagramm der Analyse darstellt, wird gleichzeitig innerhalb des Diagramms ein „Fenster“ dargestellt, das die Region einschließt, welche die ermittelten Intensitätswerte der Analyse enthält, die in die Berechnung und die grafische Darstellung einfließen. Diese 'Region von Interesse' (engl. 'region of interest') kann vom Benutzer verändert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit bestimmte Intensitätsbereiche der Färbungen der Bilder bei Bedarf einzugrenzen. Bei unseren Analysen wurde die vom Programm voreingestellte Größe und Position dieses Fensters nicht verändert.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde nach folgender Formel berechnet:  
(Manders *et al.*, 1992)

$$r_P = \frac{\sum_i (R_i - R_{\text{aver}}) \cdot (G_i - G_{\text{aver}})}{\sqrt{\sum_i (R_i - R_{\text{aver}})^2 \cdot \sum_i (G_i - G_{\text{aver}})^2}}$$

**Formel 1: Formel zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson.**

Hierbei sind  $R_i$  und  $G_i$  die Grauwerte der Voxel  $i$  des roten, sowie grünen Kanals.

$R_{\text{aver}}$  und  $G_{\text{aver}}$  sind die Durchschnittswerte von  $R_i$  bzw.  $G_i$ .

### 3.5.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblots

#### 3.5.5.1. SDS-PAGE

Die Elektrophoresen der Proteine wurden in 10% SDS Polyacrylamid Gelen in Mini Protean Zellen (Bio-Rad, München, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Das frisch gemischte Trenngel wurde zunächst entgast, zwischen Glasplatten gegossen und sofort mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet. Nach 1 Stunde Polymerisation bei RT wurde das n-Butanol abgegossen, die Trenngeloberfläche mit Wasser gespült, mit dem Sammelgel überschichtet und der Probenkamm eingefügt. Nach 30 min. Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Probenaschen mit 1x Laufpuffer gespült und dann noch vorhandene Gelreste aus den Taschen entfernt. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer gemischt, 5 min. bei 95°C denaturiert und 2 min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde in die Taschen aufgetragen und mit 1x Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte über 3-4 Stunden bei 50 mA und 4°C.

#### 3.5.5.2. Westernblot nach dem Semi Dry Verfahren

Pro Gel wurden 6 Stück Whatman-Papier und ein Stück Nitrozellulose Membran auf die Größe des zu blottenden Gels zugeschnitten. Die Nitrozellulose Membran wurde in bidest. Wasser angefeuchtet und die Whatman Stücke in Blotpuffer getränkt. Dann erfolgte der Aufbau der einzelnen Schichten für den Blot. Auf die untere Platte der Apparatur (die Anode) wurden drei

Lagen des in Blotpuffer getränkten Whatman-Papiers gelegt. Darauf legte man dann die Nitrozellulose Membran und darauf das zu blottende Gel. Dieses wurde mit wieder drei Lagen von getränktem Whatman-Papier bedeckt, und die obere Platte der Apparatur (die Kathode) wurde aufgelegt. Die Blotzelle wurde an die Stromversorgungseinheit angeschlossen, und es wurde mit einer Stromstärke von 0,8 mA pro Quadratcentimeter Gelfläche geblottet. Die Zeit für den Blot beträgt 90 Minuten.

Nach dem Blot wurden die unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Dazu wurde die geblottete Membran zwei Stunden bei RT in Blocklösung inkubiert. Nach der Blockierung folgte die Inkubation der Membran mit entsprechenden Antikörpern. Die Primärantikörper wurden in Blocklösung verdünnt und die Membran wurde zwei Stunden bei RT in dieser Lösung inkubiert. Danach wurde 4 x für jeweils 5 min. mit einer TBS/Tween Lösung gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in Blocklösung verdünnt und dann für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde wieder 4 x für 5 min. mit TBS/Tween gewaschen. Das Signal des Westernblots wurde über das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) (Pierce) wiedergegeben. Dazu wurden die beiden Komponenten der Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und für 5 min. bei RT inkubiert. Danach konnte ein Film mit der Membran belichtet werden und der Film wurde in einer Curix 60 Entwicklungsmaschine (Agfa) entwickelt.

### **3.5.6. Färbungen von Polyacrylamid-Gelen**

#### **3.5.6.1. Coomassie Färbung**

Die Polyacrylamid Gele wurden 1-2 Stunden in der Färbelösung bei Raumtemperatur und unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Gele für mehrere Stunden in der Entfärbelösung entfärbt.

#### **3.5.6.2. Silberfärbung**

Die Gele wurden als erstes für eine Stunde in der Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie in Lösung A gegeben, dort unter Schütteln für 30 Minuten inkubiert und danach 4 x für 20 Minuten mit bidest. Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Gele für 30 Minuten in Lösung B gelegt und anschließend 3-4 mal kurz mit bidest. Wasser gewaschen. Danach gab man die Gele in Lösung C und beobachtete den Färbevorgang. Hatte die Färbung die gewünschte Intensität erreicht, wurde Lösung C abgesaugt und der Färbevorgang mit Lösung D gestoppt. Danach wurden die Gele noch einmal gewaschen und konnten getrocknet und fotografiert werden.

### **3.5.7. Densitometrie von Proteinbanden in Polyacrylamid-Gelen**

Um Proteinbanden in Polyacrylamidgelen oder Westernblots quantitativ erfassen und vergleichen zu können, wurden die Gele nach der Elektrophorese oder die Blots nach ihrer Entwicklung einer Densitometrie unterzogen. Dazu wurden sie mit Hilfe eines Scanners digitalisiert. Die digitalisierten Bilder wurden mit dem Densitometrie-Programm „AIDA“ [Version 2.11, (1999)] analysiert. Dabei wurden die speziellen Banden, die untersucht werden sollten, auf dem Bildschirm eingekreist und die Software errechnete daraus einen Zahlenwert. Mit einer Kopie des Flächenumfangs mit der dieser Wert ermittelt wurde, wurde in der gleichen Spur des Gels in einem Bereich ohne Blot-Signal das Hintergrundsignal für die Spur gemessen. Vom eigentlichen Signal wurde das Hintergrundsignal subtrahiert und man erhielt den Nettowert des Signals.

### **3.5.8. Proteinbestimmungen**

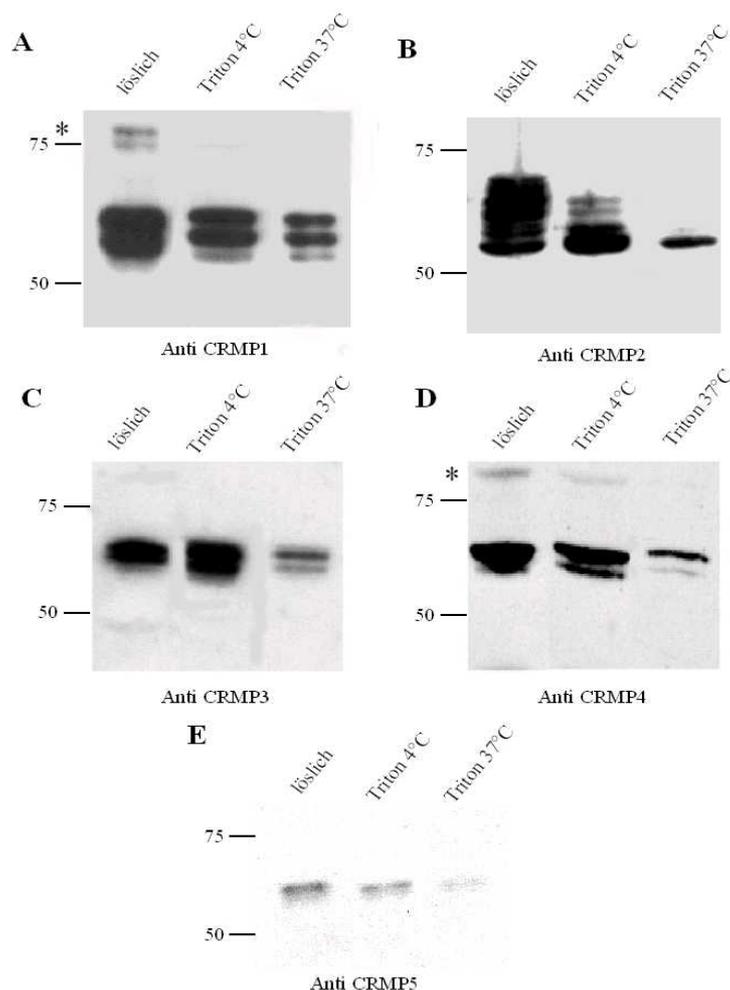
Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford mit Hilfe des Biorad Protein Assays mit BSA als Standard nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden fünf Verdünnungen von BSA von einer Konzentration von 0,05 mg/ml bis hin zu 0,5 mg/ml zur Erstellung einer Kalibrierkurve verwendet. Alle Werte wurden als dreifache Werte bestimmt. 10 µl des Standards, sowie auch der Proben wurden in ein Well gegeben und dann mit 200 µl des Reaktionsmixes gemischt. Das Gemisch wurde dann 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und in einem Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm gemessen.

## 4. Ergebnisse

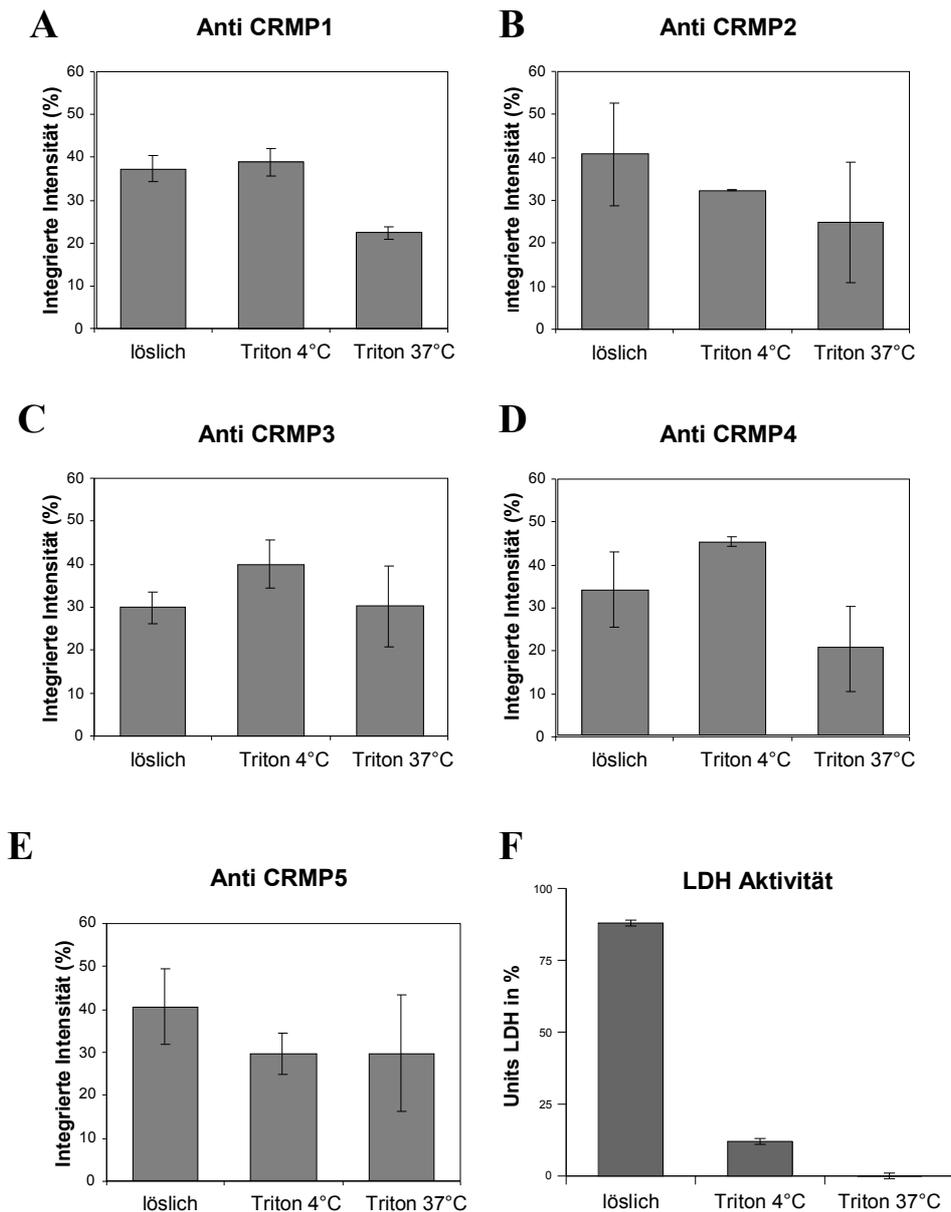
### 4.1. **Analyse der Expression und subzellulären Lokalisation der Collapsin Response Mediator Proteine im Gehirn neugeborener Ratten durch Westernblot-Analysen**

Die CRMPs üben innerhalb der Zelle eine Übertragungsfunktion zwischen dem Semaphorin 3A Rezeptorkomplex und dem Cytoskelett aus. Daher stellt sich die Frage, wo und wie die CRMPs an dieser Signaltransduktion teilhaben. Kann es eine direkte Assoziation der CRMPs mit dem membranständigen Rezeptorkomplex des Semaphorin 3A geben? Sind die CRMPs für diese Interaktion mit der Plasmamembran verbunden? Deshalb wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation der CRMPs untersucht. Dazu bedienten wir uns einer Westernblot-Analyse von Homogenaten von neonatalem Rattenhirn, von dem wir die Fraktionen löslicher und membranständiger Proteine mit CRMP-spezifischen Antikörpern untersuchten. Die Gehirne wurden mit Hilfe eines Douncers homogenisiert. Dadurch wurden die löslichen Proteine in den Puffer überführt und konnten nach einer Zentrifugation des Homogenats geerntet und analysiert werden. Diese Fraktion des Homogenats wurde als 'lösliche Fraktion' bezeichnet. Alle getesteten Antikörper gegen die verschiedenen CRMPs zeigten Hauptbanden von annähernd 65 kDa Molekulargewicht in den Westernblots der löslichen Fraktion (Abbildung 6, löslich) (*Franken et al., 2003*). Das Vorhandensein mehrerer Banden könnte auf unterschiedliche Grade der Phosphorylierung oder auf Proteolyse zurückzuführen sein. Zusätzlich zeigten CRMP-1 und CRMP-4 noch akzessorische Banden im Bereich von ca. 80 kDa (Abbildung 6 A{\*} und D{\*}). Bei diesen Banden handelt es sich wahrscheinlich um Translationsprodukte alternativ gespleißter mRNA (*Quinn et al., 2003; Leung et al., 2002*). Die Pellets, die nach dieser ersten Zentrifugation zur Gewinnung der löslichen Fraktion zurück blieben, beinhalteten die unlöslichen Bestandteile der Zellen, so also auch die fragmentierten Zellmembranen mit ihren assoziierten Proteinen. Um zu überprüfen, ob CRMPs auch in der unlöslichen Fraktion des Zellhomogenats vorhanden waren, wurden die Pellets der vorhergehenden Zentrifugation bei 4°C in Puffer mit Triton X-100 (1%) resuspendiert und die Suspension wurde erneut abzentrifugiert. In diesem Überstand zeigten sich die Proteine, die von dem Detergenz im Kalten (4°C) aus der Membran herausgelöst wurden (Abbildung 6, Triton 4°C). Dies sind Proteine, die zwar mit Membranfragmenten assoziiert, aber nicht an Lipid Rafts gebunden sind. Um zu überprüfen, ob sich durch diese Extraktion mit Triton X-100 alle CRMPs vollständig aus der Membranfraktion gelöst hatten, wurde mit den Pellets, die

bereits im Kalten (4°C) extrahiert worden waren, noch einmal eine Triton X-100 Extraktion, jetzt aber bei 37°C, durchgeführt. Bei dieser Temperatur lösen sich auch Raft-assoziierte Proteine und gehen in die lösliche Fraktion über. Wir schätzten die Menge der CRMPs, die gegen die Extraktion mit Triton X-100 bei 4°C resistent war, zwischen 10-20% (Abbildung 6, Triton 37°C). Die Verteilungen der einzelnen CRMPs unterschied sich beträchtlich von dem ebenfalls in den Fraktionen vorhandenen Marker-Enzym für cytosolische Proteine, der Lactat-Dehydrogenase. Diese war fast vollständig in der löslichen Fraktion (90%), während in dem Triton 4°C Extrakt nur 10% vorhanden waren und sie so gut wie nicht nachweisbar im 37°C Extrakt war (Abbildung 7 F). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich alle CRMPs sowohl in der löslichen Zellfraktion als auch in Assoziation mit Membranen fanden. Bei den membrangebundenen Formen läßt sich noch einmal zwischen einem in der Kälte Triton-löslichen Anteil und einem in der Kälte Triton-resistenten Anteil unterscheiden.



**Abbildung 6: Westernblot-Analyse der CRMP-Expression in neonatalem Rattenhirn.** Gleiche Aliquots von löslichen Proteinen (löslich) und Proteinen die mit Triton X-100 (1%) bei 4°C und 37°C extrahiert wurden, wurden auf 10% SDS-Polyacrylamid Gelen aufgetrennt und geblottet, so wie in der Abbildung beschrieben. Die Blots wurden mit den unterschiedlichen peptid-spezifischen Antiseren gegen die einzelnen CRMPs gefärbt. A) CRMP-1, B) CRMP-2, C) CRMP-3, D) CRMP-4 und E) CRMP-5/CRAM. {\*} = akzessorische 80 kDa Bande. Die Positionen des Molekulargewichtsmarkers sind an der linken Seite gezeigt (in kDa).



**Abbildung 7: Quantitative Auswertung der Westernblot-Analysen über die Verteilung der CRMPs in Extrakten aus neonatalem Rattenhirn.** Die Balken zeigen die prozentuale Verteilung eines CRMPs auf die drei Fraktionen (löslich, Triton 4°C und Triton 37°C) der Extraktion. Die Werte wurden durch die Densitometrie von Westernblots dieser Fraktionen gewonnen ( $n=3$ ) und zeigen die integrierte Intensität des Westernblot-Signals. Die Fehlerbalken zeigen die Differenz des am stärksten von dem Mittelwert abweichenden Meßwertes an. A) CRMP-1, B) CRMP-2, C) CRMP-3, D) CRMP-4 und E) CRMP-5/CRAM. F) Lactat-Dehydrogenase-Aktivität wurde als ein Indikator für lösliche, cytosolische Proteine bestimmt.

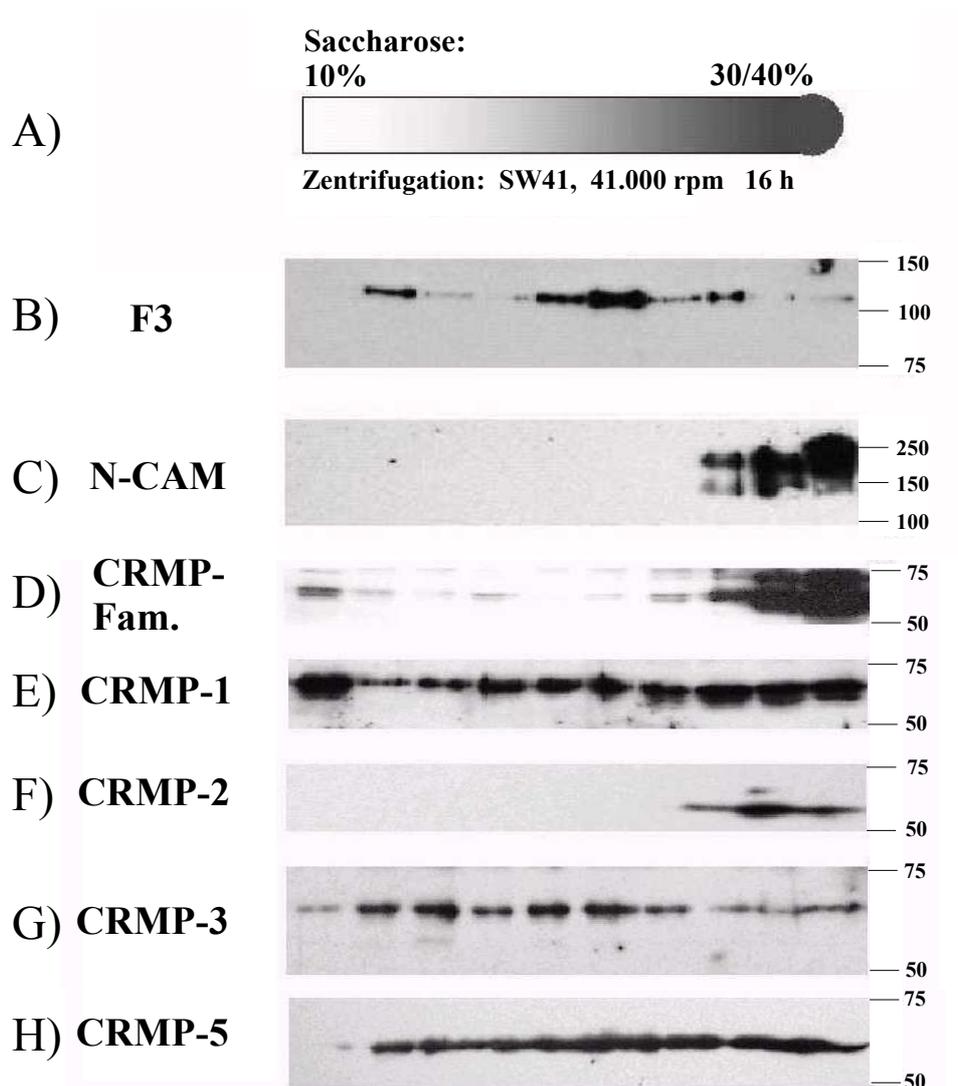
Die Verteilung der CRMPs auf die einzelnen Fraktionen wurde durch Densitometrie quantitativ bestimmt. Mit Hilfe dieser Methode wurden die Intensitäten der Westernblot-Signale der CRMPs gemessen und konnten so miteinander verglichen werden (Abbildung 7). Für jedes CRMP wurden drei Westernblots densitometriert und aus den ermittelten Werten die Mittelwerte gebildet. Diese wurden prozentual zur Summe des CRMP-spezifischen Signals eines Blots dargestellt. Dabei zeigte sich, dass bei den CRMPs -1 bis -4 und CRMP-5/CRAM der lösliche Anteil des Proteins

zwischen 30 und 40 Prozent lag. Die höchsten Werte fanden sich beim CRMP-2 und beim CRMP-5/CRAM, wo in beiden Fällen ein Anteil von circa 40% des Gesamtsignals gemessen wurde (Abbildung 7 B und E). Den geringsten Anteil in der löslichen Fraktion fanden wir beim CRMP-3, wo er knapp 30% ausmachte (Abbildung 7 C). Das CRMP-1 und CRMP-4 lagen zwischen diesen beiden Werten bei ungefähr jeweils 35% (Abbildung 7 A und D). Die Fraktionen der Triton-Extraktionen bei 4°C zeigten Werte zwischen einem Anteil von 30% (CRMP-5/CRAM) bis hin zu knapp 50% beim CRMP-4. Die anderen CRMPs lagen zwischen 30% und 40% Anteil des jeweiligen Proteins in dieser Fraktion. Bei den Fraktionen, die den Anteil der Proteine darstellen, die bei 37°C mit Triton X-100 extrahiert wurden, fanden wir Werte, die zwischen 20% und 30% betragen. Die geringsten Werte zeigten hier das CRMP-1 und das CRMP-4 mit jeweils 20% und die Höchstwerte fanden wir beim CRMP-3 und CRMP-5/CRAM mit jeweils 30% Intensitätsanteil. Das CRMP-2 in dieser Fraktion nahm mit ca. 25% eine mittlere Stellung ein. Beim CRMP-3 und dem CRMP-4 war der Hauptanteil der Proteine in der mit Triton bei 4°C extrahierten Fraktion zu finden. Beim CRMP-1 hielt sich dieser Wert die Waage mit der löslichen Fraktion, und bei den CRMPs -2 und -5/CRAM lag der größte Teil in der löslichen Fraktion vor. Zusammenfassend ist festzustellen, dass alle CRMPs membranassoziiert vorkommen. Außerdem existiert bei allen CRMPs ein gewisser Anteil, der resistent ist gegen Extraktion mit Triton X-100 in der Kälte.

#### **4.2. Analyse der Assoziation von Collapsin Response Mediator Proteinen mit Lipid Rafts durch Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation**

Die Detergenzresistenz der CRMPs könnte durch die Assoziation mit Lipid Rafts bedingt sein. Andererseits könnte aber auch eine Bindung an das Cytoskelett für die Detergenzresistenz der CRMPs verantwortlich sein. Die Möglichkeit, dass die CRMPs mit Lipid Rafts assoziiert sein könnten, wollten wir deshalb in einem anschließenden Experiment näher betrachten. Lipid Rafts sammeln sich bei einer Dichtegradienten-Zentrifugation in den oberen Schichten mit den geringen Dichten des Gradienten. Dies hat seinen Grund darin, dass Rafts einen hohen Anteil an Lipiden besitzen, woraus sich eine geringe Dichte ergibt. Bei ihrer Wanderung während der Zentrifugation nehmen sie an sich gebundene Proteine mit in diese Gradientenschicht. Westernblot-Analysen von Fraktionen von Hirn-Membranen, die vor einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation mit TritonX-100 bei 4°C extrahiert wurden, zeigten transmembrane Formen von NCAM (mit Hilfe des Antikörpers 5B8, der gegen die cytosolische Domäne von NCAM gerichtet ist) nur in den Bodenfraktionen, während das meiste des Raft-Markers F3 im Gradienten aufschwamm (Abbildung 8 B und C). CRMPs wurden sowohl in den Triton X-100-resistenten Fraktionen mit

einer geringen Schwimmdichte als auch in den Bodenfraktionen mit detergenzlöslichen Proteinen durch Westernblots mit dem panspezifischen Antiserum anti-CRMP-Fam.-Peptid (Abbildung 8 D) nachgewiesen. Westernblots mit monospezifischen Antikörpern zeigten eine starke Assoziation mit Lipid Rafts für CRMP-1, CRMP-3 und CRAM/CRMP-5 (Abbildung 8 E, G und H), aber interessanterweise nicht für CRMP-2 (Abbildung 8 F). Bereits in früheren Experimenten (Roßlenbroich et al., 2005; persönliche Mitteilungen L. Dai) konnte CRMP-4 in Lipid Rafts nachgewiesen werden.



**Abbildung 8: Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von Triton X-100 extrahierten Membranen aus neonatalem Rattenhirn: Verteilung der CRMPs.**

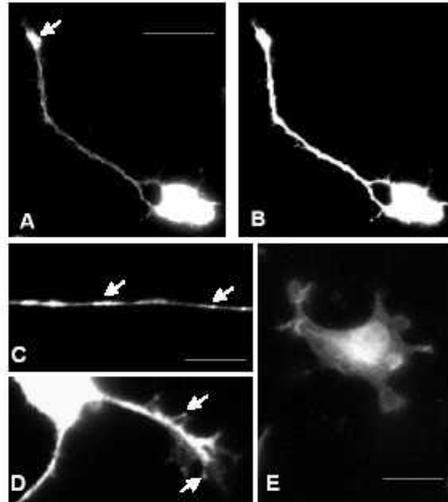
A) Schematische Darstellung des Dichtegradienten

B-G) Westernblot Analyse von Fraktionen der Zentrifugation mit Hilfe von F3 als Raftmarker (B), NCAM als Membranmarker (C), eines pan-spezifischen anti-CRMP-Familie Antikörpers (D) und mit peptidspezifischen Antikörpern gegen CRMP-1 (E), CRMP-2 (F), CRMP-3 (G) und CRAM/CRMP-5 (H).

Die Molekulargewichte sind auf der rechten Seite dargestellt (in kDa).

### **4.3. Immuncytochemische Darstellung von Collapsin Response Mediator Protein-4 in corticalen Neuronen der Ratte**

Da es uns durch die durchgeführten Experimente biochemisch gelungen war, die subzelluläre Lokalisation der CRMPs zu beschreiben, wollten wir diese durch Immuncytochemie noch genauer bestimmen. Da sowohl die Triton-Extraktion wie auch die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation Hinweise dafür lieferten, dass alle CRMPs zu einem gewissen Teil mit Membranen assoziiert sind und auch an Lipid Rafts gebunden sein könnten, untersuchten wir, ob sich diese Hinweise immuncytochemisch untermauern ließen. Für viele raftassoziierte Proteine ist das charakteristische Muster einer punktierten Verteilung an der Zellmembran beschrieben (*Harder et al., 1998; De Wit et al., 2005*). Wir wollten überprüfen, ob sich dieses Muster auch bei den CRMPs zeigen würde. Daher wurden die Antiseren gegen die einzelnen CRMPs affinitätsgereinigt und mittels Immuncytochemie getestet. Leider zeigte sich bei Verwendung der gereinigten Antikörper gegen CRMP-1, -2, -3 und -5 ein unspezifisches Bild bei den Färbungen. Der affinitätsgereinigte Antikörper gegen das CRMP-4 konnte aber als Werkzeug eingesetzt werden, da er gute Spezifität in der Immuncytochemie besaß. CRMP-4 wurde in corticalen Neuronen (Abbildung 9 A - D), in stabil CRMP-4 überexprimierenden HEK293-Zellen (Abbildung 9 E), aber nicht in untransfizierten HEK 293-Zellen nachgewiesen. Deshalb beschränkten wir unsere immuncytochemischen Beobachtungen auf die Verteilung von CRMP-4. Hier zeigte sich ein Großteil des CRMP-4 in den Perikaryen (Abbildung 9 A) von Zellen, die für das Mikrotubuli assoziierte Protein 2 (MAP-2) positiv und somit Neurone waren (Abbildung 9 B). Desweiteren fanden sich kleinere Mengen von CRMP-4 in den Neuriten der Zellen und in deren Wachstumskegeln (Abbildung 9 A, Pfeil). Im Gegensatz zu dem diffus verteilten immunreaktiven Material innerhalb des Perikaryons, zeigte sich in vielen Neuriten vor allem in peripheren Bereichen auch ein gepunktetes Färbungsmuster von CRMP-4 (Abbildung 9 C und D, Pfeile). Es ließ sich also auch vermuten, dass Lipid Rafts mit assoziiertem CRMP-4 in motilien Strukturen von Neuronen lokalisiert sind.



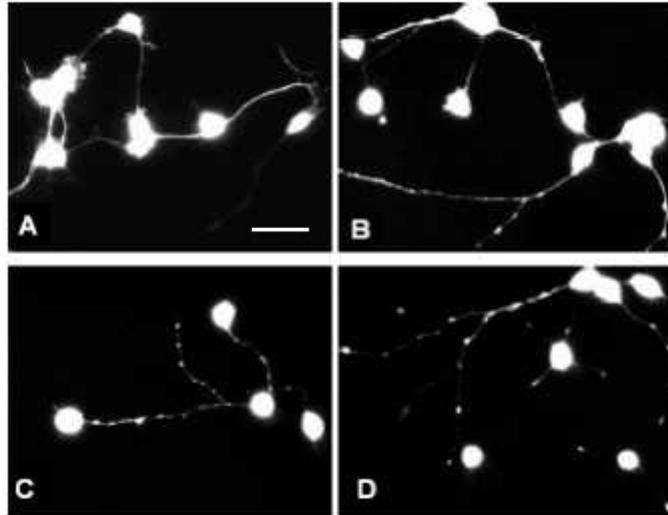
**Abbildung 9: Immunocytochemie von CRMP-4 in corticalen Neuronen der Ratte.** A) Verteilung von CRMP-4 in corticalen Neuronen (Pfeil: Wachstumskegel; Maßstab = 20  $\mu\text{m}$ ). B) Färbung der gleichen Zelle wie in A), hier mit einem Antikörper gegen Mikrotubuli assoziiertes Protein 2 (MAP 2). C) Diskontinuierliche und punktierte Ansammlungen von CRMP-4 (Pfeile) entlang eines Neuriten (Maßstab = 20  $\mu\text{m}$ ). D) Photo einer starken Vergrößerung eines Wachstumskegels, gefärbt gegen CRMP-4 (gleiche Vergrößerung wie in C), (Pfeile: Spitzen von Filopodien). E) CRMP-4 Färbung von HEK293-Zellen, die CRMP-4 stabil exprimieren.

#### **4.4. Wirkung einer Extraktion von Cholesterol mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin auf die Verteilung von Collapsin Response Mediator Protein-4 in corticalen Neuronen**

In einem weitergehenden Schritt blieb die Vermutung zu bestätigen, dass das punktförmige Muster der CRMP-4 Färbungen in den Fortsätzen der untersuchten Zellen durch eine Assoziation von CRMP-4 mit Lipid Rafts hervorgerufen wurde.

Cholesterol ist ein notwendiger Bestandteil von Lipid Rafts. Die Entfernung von Cholesterol aus den Lipid Rafts zerstört deren Struktur. Um die Vermutung weiter zu untermauern, das punktierte Muster von CRMP-4 in Neuriten und Wachstumskegeln könne einer Verbindung von CRMP-4 und Lipid Rafts entspringen, wurde Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, ein etabliertes Standard-Reagenz, um Cholesterol aus Zellen zu extrahieren (Harder *et al.*, 1998; Kilsdonk *et al.* 1995), zu den Kulturen gegeben, um die Lipid Rafts in den Membranen zu zerstören. Eine Umverteilung von CRMP-4 in mehrere, größere Areale entlang von Neuriten nach der Cholesterolextraktion fiel deutlich ins Auge (Abbildung 10 B-D). Der Verlust von Cholesterin aus der Plasmamembran und damit die Zerstörung von Lipid Rafts ging einher mit einem Verlust der bis dahin charakteristischen punktförmigen CRMP-4 Färbung. Des weiteren fiel auf, dass corticale Neuronen aus Kulturen, die auf Laminin/Poly-D-Lysin gewachsen waren, zahlreiche gut entwickelte Wachstumskegel mit vielen Filopodien und Lamellipodien zeigten (Abbildung 11 A), wohingegen der Anteil von Zellen,

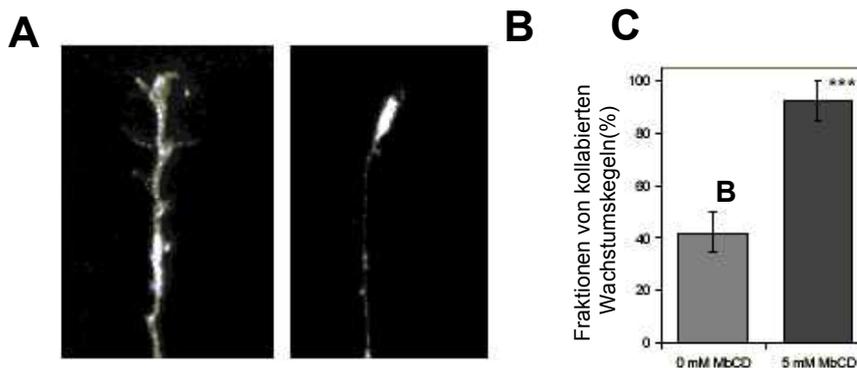
die einen kollabierten Wachstumskegel zeigten, sich nach der Cholesterol-Extraktion nahezu verdoppelte und auf mehr als 90% aller Zellen anstieg (Abbildung 11B und C). Dies ist ein Hinweis auf die Bedeutung von Lipid Rafts für die Integrität der Struktur von Wachstumskegeln.



**Abbildung 10: Extraktion von Cholesterol mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin aus corticalen Neuronen.**

*A-D) Corticale Neurone wurden mit 5 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin für verschiedene Zeiten inkubiert: A) 0 min., B) 15 min., C) 30 min., D) 45 min. Die Zellen wurden mit anti CRMP-4 Antikörper gefärbt.*

*Maßstab = 20  $\mu$ m.*



**Abbildung 11: Auswirkung der Cholesterol-Extraktion auf die Wachstumskegel von Neuronen.**

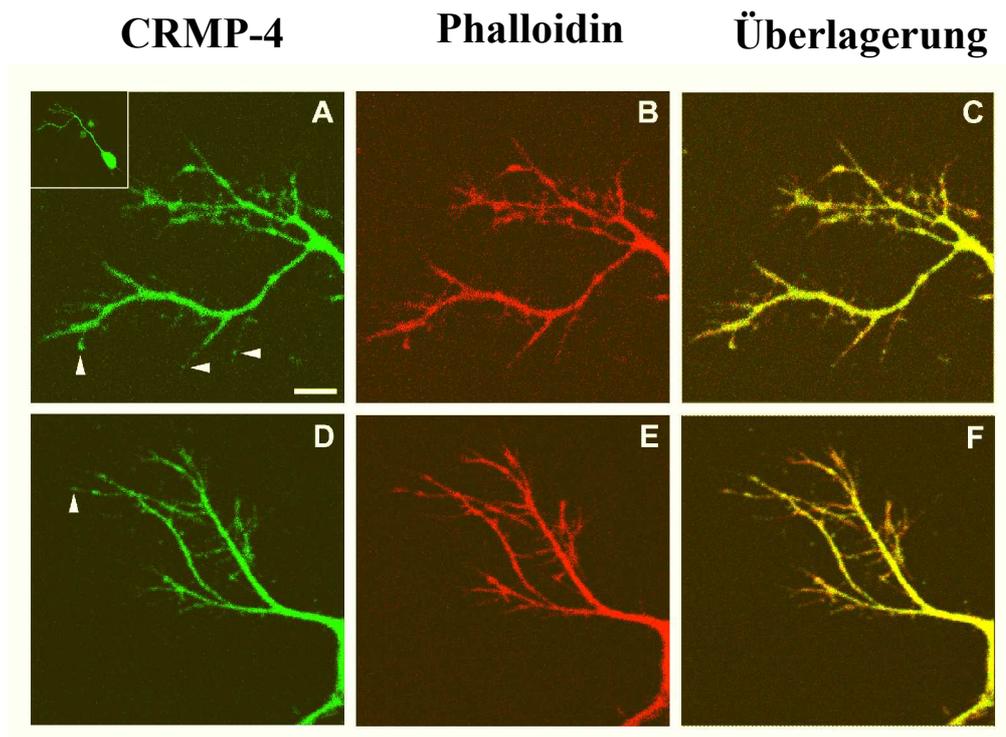
A) F-Actin Färbung eines repräsentativen Wachstumskegels mit Phalloidin-TRITC in Abwesenheit von Methyl-β-Cyclodextrin. Maßstab, 10 μm. B) Morphologie eines mit Phalloidin-TRITC gefärbten Wachstumskegels nach der Behandlung mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin für 45 Minuten. C) Anteil von kollabierten Wachstumskegeln in Kulturen, die mit 5 mM Methyl-β-Cyclodextrin für 45 Minuten behandelt wurden (5mM MbCD), im Vergleich zu Kontrollkulturen die nicht behandelt wurden (0mM MbCD). Für jede Bedingung wurden 3x 20 Wachstumskegel betrachtet. Die Balken zeigen den Mittelwert der drei Zählungen. Die Fehlerbalken zeigen die höchsten und niedrigsten Werte, die gezählt wurden. Der Unterschied zwischen den Häufigkeiten von kollabierten und intakten Wachstumskegeln in den zusammengenommenen Werten (n=60) zwischen beiden Bedingungen war hoch signifikant ( $p < 0,005$ ;  $\chi^2 = 65,90$ )

#### **4.5. Analyse der Kollokalisierung von Collapsin Response Mediator Protein-4 mit Cytoskelettproteinen in corticalen Neuronen**

##### **4.5.1. Kollokalisierung von Collapsin Response Mediator Protein-4 mit F-Actin**

Die vorangegangenen Experimente zeigten in corticalen Neuronen eine Lokalisation von CRMP-4 im Soma der Zelle, in ihren Neuriten und den Wachstumskegeln (Abbildung 9). Bei Wachstumskegeln handelt es sich um Strukturen, die in ihren Randbereichen eine starke Anreicherung von hochdynamischem F-Actin besitzen. Weil die Resistenz der CRMPs gegenüber einer Extraktion mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 in der Kälte auch durch eine Assoziation der CRMPs mit Cytoskelettproteinen bedingt sein könnte, war zu fragen, ob eine Zusammenlagerung von CRMPs mit dem Cytoskelett in corticalen Neuronen nachweisbar ist. Um dies zu untersuchen, wurden Kulturen von primären corticalen Neuronen auf einem Substrat von Poly-D-Lysin ausgesät. Diese zeigten gut entwickelte Neuriten und Filopodien. Bei der Untersuchung der Verteilung von CRMP-4 in diesen Neuronen zeigte sich das Protein im Soma

und in den Neuriten (Abbildung 12). CRMP-4 wurde in Filopodien gefunden. Es zeigte dort ein punktiertes Erscheinungsmuster und wurde auch an den Spitzen der Filopodien der Zellen lokalisiert. Eine Doppelfärbung mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin, zur Darstellung des Actincytoskeletts zeigte eine weit verbreitete Kolo-kalisation mit F-Actin. Eine Auszählung von unbehandelten Kontrollzellen zeigte, dass bei den meisten Zellen, besonders in den Neuriten eine positive Färbung für CRMP-4 und F-Actin vorlag (76 von 89 Zellen = 85%).

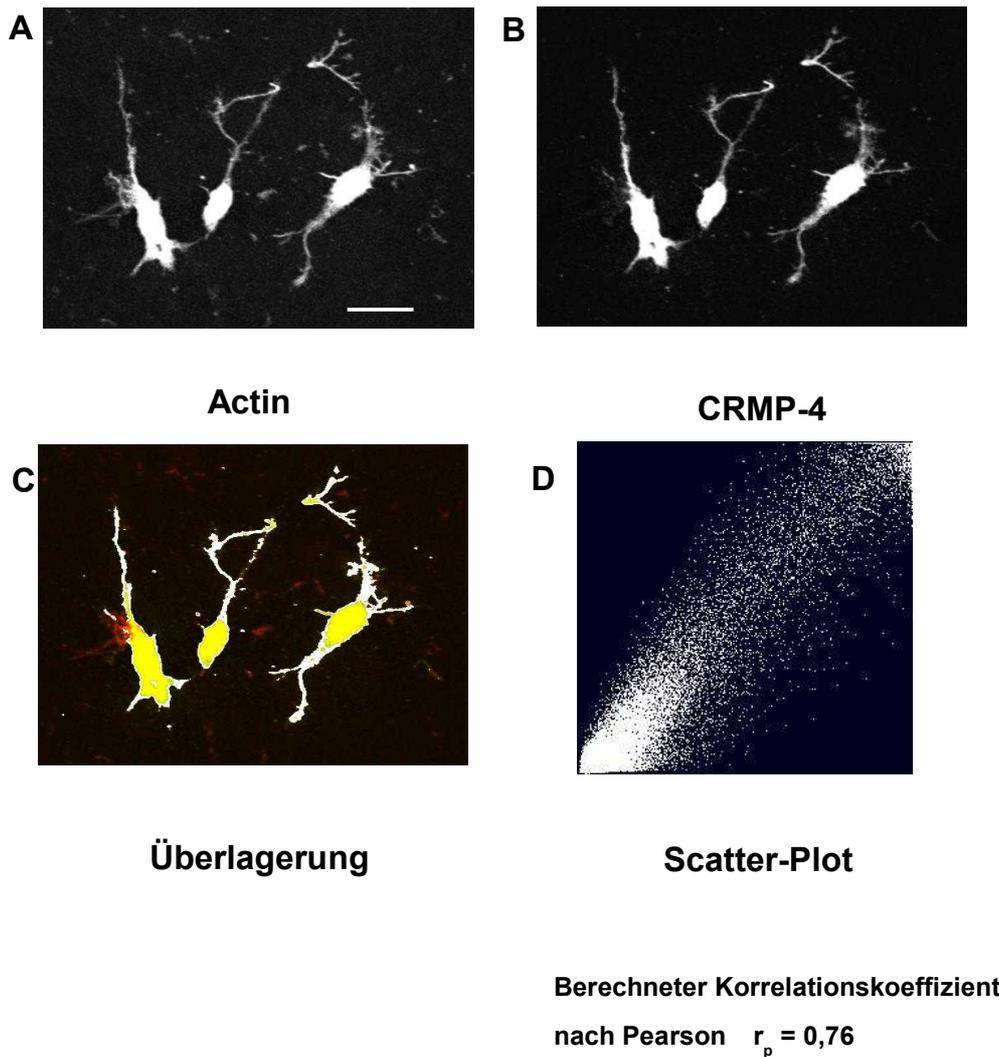


**Abbildung 12:** Konfokale Bilder von corticalen Neuronen, die gegen CRMP-4 und F-Actin (Phalloidin-TRITC) gefärbt sind. Zwei unterschiedliche Neurone (A+D) sind gezeigt. Der Einschub zeigt eine Übersichtsvergrößerung des Neurons aus A. CRMP-4 zeigt sich in den Filopodien und deren Spitzen (Pfeile). Maßstab, 16  $\mu\text{m}$ .

#### **4.5.2. Wirkung einer Behandlung mit Latrunculin A und Nocodazol auf die Verteilung von Collapsin Response Mediator Protein-4 in corticalen Neuronen**

Die immunocytochemisch gezeigte Lokalisation von CRMP-4 in Filopodien, Lamellipodien und auch seine Kolo-kalisation mit F-Actin warf den Gedanken auf, dass es eine Assoziation von CRMP-4 mit dem Actincytoskelett geben könnte. Wenn dem so wäre, müsste das Actincytoskelett einen Einfluss auf die Verteilung von CRMP-4 in diesen Zellen haben. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde der Effekt des F-Actin depolymerisierenden Reagenzes Latrunculin A (LatA) auf die Verteilung von CRMP-4 in corticalen Neuronen untersucht. Latrunculin A ist eine Substanz, die in der Zellbiologie benutzt wird, um das Actincytoskelett einer Zelle zu manipulieren.

Das Latrunculin A bindet in der Zelle an die monomeren Actinuntereinheiten und verhindert so deren Anlagerung an bestehende Actinfilamente. So unterdrückt es die weitere Polymerisation von Actinmonomeren zu Actinfilamenten. Über die Zeit kommt es in der Zelle zu einer Netto-Depolymerisation des Actincytoskeletts, wodurch sich die geordnete Struktur der F-Actinfilamente auflöst und man beobachten könnte, ob sich damit auch die Lokalisation des CRMP-4 verändert. Bemisst man die Kollokalisierung nach Augenmaß, so ist klar, dass dabei nur eine qualitative Bewertung möglich ist. Um quantitative Aussagen zu treffen, benötigt man eine Methode, die es gestattet, den Grad einer Kollokalisierung innerhalb eines Systems verlässlich zu messen und so auch Veränderungen der Intensität dieser Kollokalisierung aufzuzeigen. Eine solche Möglichkeit bietet der Korrelationskoeffizient nach Pearson. Dieser Koeffizient ist eines der Standardverfahren in der Mustererkennung, wenn man zwei Bilder miteinander vergleicht und den Grad ihrer Überlagerung feststellen will (*Manders et al., 1992; van Steensel et al., 1996*). Wir bedienten uns zur quantitativen Analyse der Kollokalisierung von CRMP-4 und F-Actin der Bildverarbeitungssoftware „Image J 1.33u“ (National Institute of Health, USA), die eine Funktion zur quantitativen Analyse mit der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson beinhaltet. Mit Hilfe dieser Funktion analysierten wir die Kollokalisierung zwischen CRMP-4 und F-Actin innerhalb von Zellen an Hand konfokaler Aufnahmen unter verschiedenen Bedingungen. Zuerst untersuchten wir corticale Neurone, die unter Kontrollbedingungen, also ohne Einwirkung von Reagenzien, die das Cytoskelett manipulierte, gegen F-Actin und CRMP-4 gefärbt wurden (Abbildung 13).



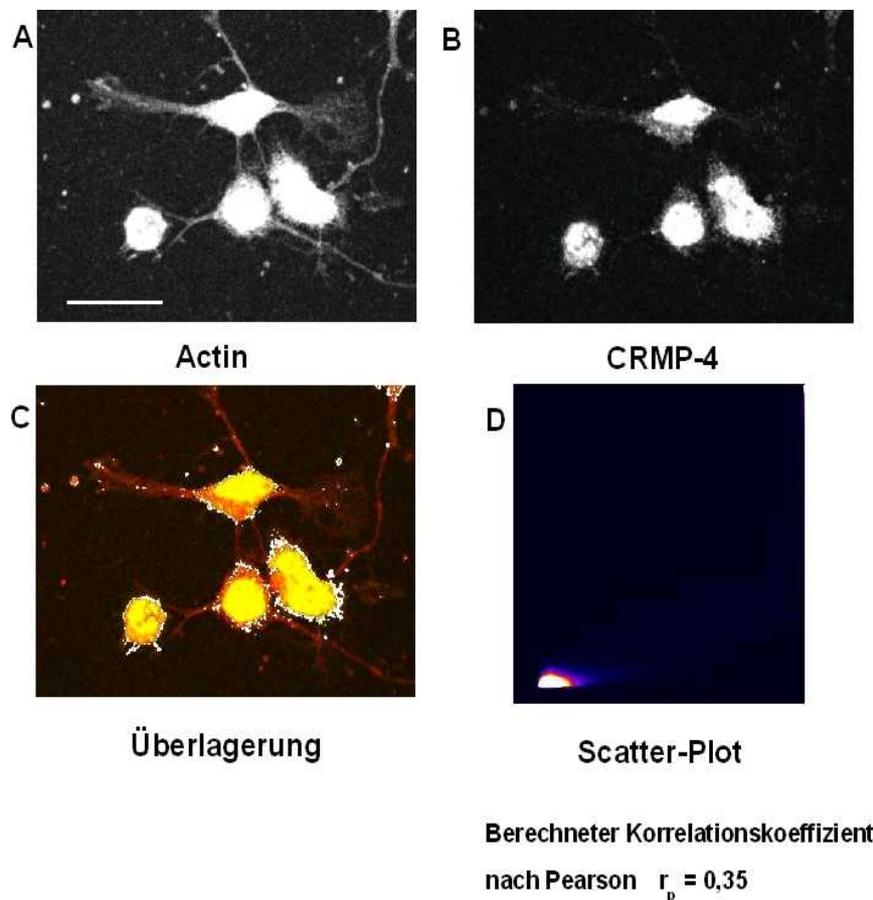
**Abbildung 13: Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin in corticalen Neuronen.**

Die Abbildung zeigt corticale Neurone unter Kontrollbedingungen mit Phalloidin gefärbtem Actincytoskelett A) und endogenes CRMP-4 B). C) zeigt die Überlagerung der beiden Bilder, wobei die Regionen mit der stärksten Kolokalisation weiß gefärbt sind. D) zeigt das Streudiagramm, auf dessen Werten die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson beruht. Maßstab, 20  $\mu\text{m}$

Die weiß gefärbten Regionen in Abbildung 13 C zeigen die Orte, an denen eine Kolokalisation durch die Analyse detektiert wurde. Das Streudiagramm (Abbildung 13 D) gibt den Zusammenhang der beiden Kanäle (F-Actin und CRMP-4) in einer graphischen Darstellung wieder, wobei die Intensitäten der einzelnen Bildpunkte für das CRMP-4 auf der Y-Achse, und für das F-Actin auf der X-Achse zu finden sind. Daraus ergibt sich in diesem Diagramm eine Punktwolke, die sich bei einer Korrelation der beiden Variablen, in diesem Fall ein Signal aus dem CRMP-4 Kanal und dem F-Actin Kanal, um eine imaginäre Gerade mit dem Ursprung im Nullpunkt des Diagramms, schart. Dies ist bei diesen Aufnahmen der Zellen unter Kontrollbedingungen der Fall. Die Punktwolke beginnt am unteren linken Ende des Diagramms und zieht in einem eng begrenzten Raum um eine gedachte Gerade weiter nach rechts oben. Dies interpretiert man als eine Korrelation

zwischen den beiden Farbkanälen, in denen CRMP-4 und F-Actin gefärbt wurden. Dies belegt der aufgrund der Bilddaten berechnete Korrelationskoeffizient nach Pearson, der mit 0,76 bestimmt wurde. Diese Korrelation zeigt eine starke Kolokalisation beider Proteine an. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson  $r_p$  (Definition siehe Material und Methoden) kann Werte im Bereich von -1 bis +1 annehmen, welche den Grad der Kolokalisation angeben. Ein Wert von  $r_p = 1$  zeigt eine vollständige Kolokalisation, ein Wert von  $r_p = 0$  eine fehlende Kolokalisation und ein Wert von  $r_p = -1$  einen vollständig gegenläufigen Zusammenhang zwischen den beiden Färbungen an.

Die Abbildung 14 zeigt corticale Neurone, die mit Latrunculin A behandelt wurden.

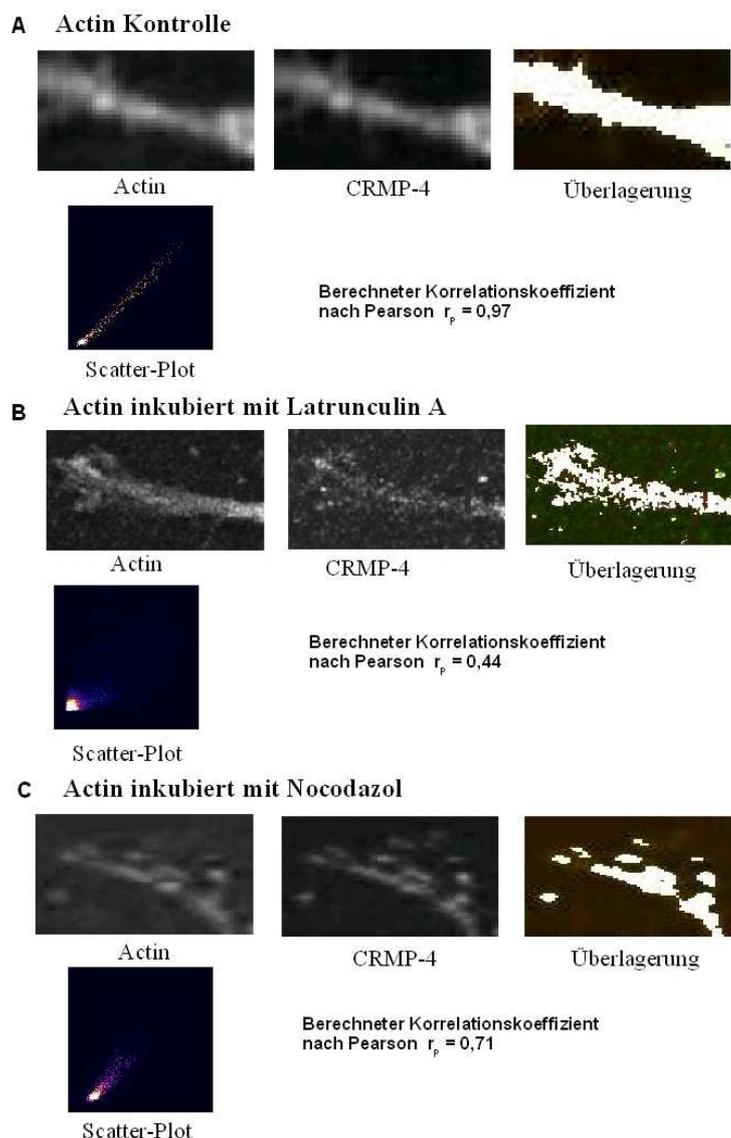


**Abbildung 14: Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin nach der Behandlung mit Latrunculin A.**

Die Abbildung zeigt corticale Neurone nach der Inkubation mit Latrunculin A (60 sec.). A) zeigt das mit Phalloidin gefärbte F-Actin und B) endogenes CRMP-4. C) zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle, wobei in Weiß die Regionen mit der stärksten Kolokalisation dargestellt sind. D) zeigt das Streudiagramm der Analyse, auf dessen Werten die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson beruht.

Maßstab, 20  $\mu\text{m}$

Bereits nach einer kurzen Inkubationszeit der Zellen (60 sec.) mit Latrunculin A, zeigte sich ein deutlich anderes Bild der Verteilung des CRMP-4 in den Zellen. Man sieht in den Einzelfärbungen, dass die Actinfärbung nicht mehr so intensiv ist wie unter Kontrollbedingungen (Abbildung 13), was auf die partielle Depolymerisation des F-Actins zurückzuführen ist (Abbildung 14 A). Bei der Färbung gegen CRMP-4 zeigten sich Signale im Soma und im Kern der Zellen. Die Lokalisation des CRMP-4 in den Neuriten erschien nun durchgehend punktförmig (Abbildung 14 B). Es fiel auf, dass es einerseits zu einer gewissen Umverteilung des CRMP-4 aus den Ausläufern der Zelle in Richtung des Zellkörpers der Neurone gekommen war, andererseits, dass das Färbemuster von CRMP-4 innerhalb der Neuriten verändert war (Abbildung 14 B, Abbildung 15 B).



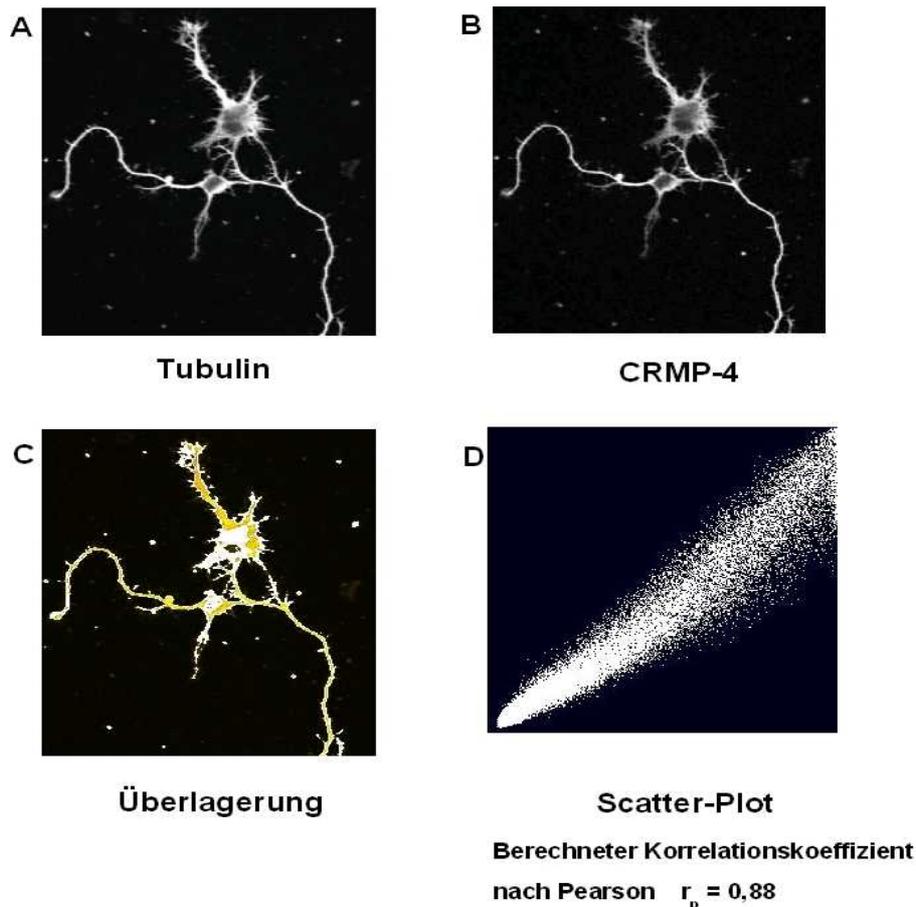
**Abbildung 15: Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson in den Fortsätzen von Neuronen.**

Teil A) zeigt einen Ausschnitt aus einem Neuriten unter Kontrollbedingungen. Teil B) zeigt einen Ausschnitt aus Neuronen, die mit Latrunculin A behandelt wurden, und Teil C) einen Ausschnitt von einem Neuriten, der mit Nocodazol inkubiert wurde. Bei allen drei Ausschnitten wurde gegen F-Actin und CRMP-4 gefärbt.

Dieser Eindruck bestätigte sich auch im Streudiagramm dieser Aufnahmen, bei der die Punktwolke nicht mehr wie bei einer Kolokalisation charakteristisch elliptisch um eine gedachte Gerade herum lokalisiert ist, sondern in diesem Fall mehr zur unteren Achse des Diagramms hin tendiert (Abbildung 14 D, Abbildung 15 B). Eine Verschiebung der Punktwolke in Richtung zu einer der beiden Achsen des Diagramms resultiert aus dem Auftreten von nur noch einer Färbung in den jeweiligen Bildpunkten einer Aufnahme. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine weniger ausgeprägte Kolokalisation vorliegt, was auch der errechnete Pearson's Koeffizient mit einem Wert von 0,35 zeigt.

Auch die Auszählung bestätigte eine Abnahme des Kolokalisationsgrades besonders in den Neuriten der Zellen. Bei 70 % der von uns beobachteten Zellen (52 von 74 Zellen) zeigte sich eine verringerte Kolokalisation der beiden Proteine. Diese Kolokalisationsanalysen bezogen sich auf die gesamten Zellen. Auch die quantitative Analyse der Kolokalisation innerhalb von Bildausschnitten, die nur Fortsätze von Neuronen enthielten, zeigte eine Abnahme der Kolokalisation zwischen CRMP-4 und F-Actin (Abbildung 15 B). Dies erklärt sich einerseits dadurch, dass die Intensität der F-Actin-Färbung im Vergleich zu Kontrollzellen abgenommen hatte. Gleichzeitig zeigte aber die Veränderung des CRMP-4-Färbemusters in Neuriten hin zu einer durchgehend feinpunktigen Verteilung an, dass die Gegenwart von F-Actin für die Verteilung des CRMP-4 in der Zelle von Bedeutung ist (Abbildung 15 B).

Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Nocodazol, einem Reagenz, das Mikrotubuli depolymerisiert, inkubiert. Um diese Daten genauer erörtern zu können, wird zunächst die Beziehung des CRMP-4 zum Mikrotubulsystem dargestellt.

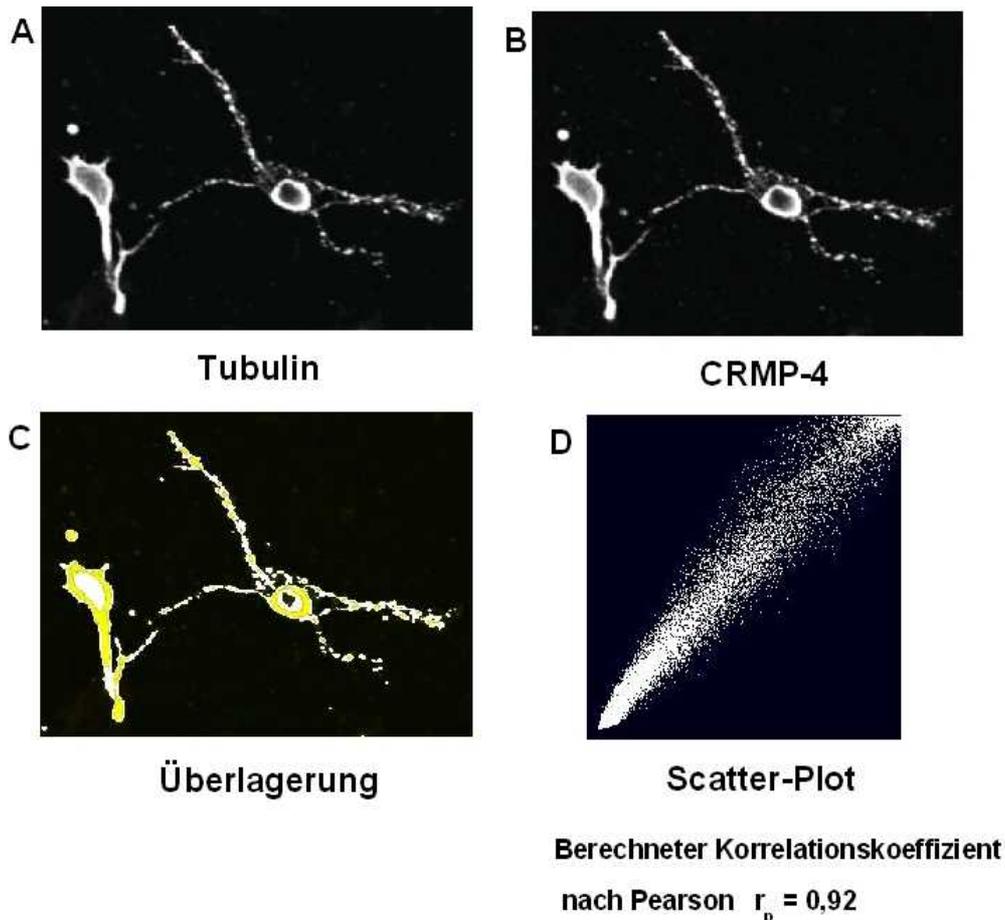


**Abbildung 16: Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und Tubulin in corticalen Neuronen.**

Die Abbildung zeigt die Verteilung des Cytoskelettproteins  $\beta$ -Tubulin A) und des endogenen CRMP-4 B) in corticalen Neuronen unter Kontrollbedingungen. C) zeigt die Kolokalisation der beiden Proteine (weiße Bereiche) in den abgebildeten Zellen und D) zeigt das Streudiagramm der Analyse.

Maßstab, 20  $\mu$ m

Es ist bekannt, dass CRMPs an Mikrotubuli und an Tubulin-Heterodimere binden (Fukata et al., 2002). Entsprechend zeigen Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen CRMP-4 und  $\beta$ -Tubulin eine deutliche Kolokalisation (Abbildung 16) in den Zellkörpern der Neurone und in den Zellausläufern (Abbildung 16 C). Das Streudiagramm und der Korrelationskoeffizient sprechen unter diesen Bedingungen ebenfalls für eine Kolokalisation beider Proteine (Abbildung 16 D).



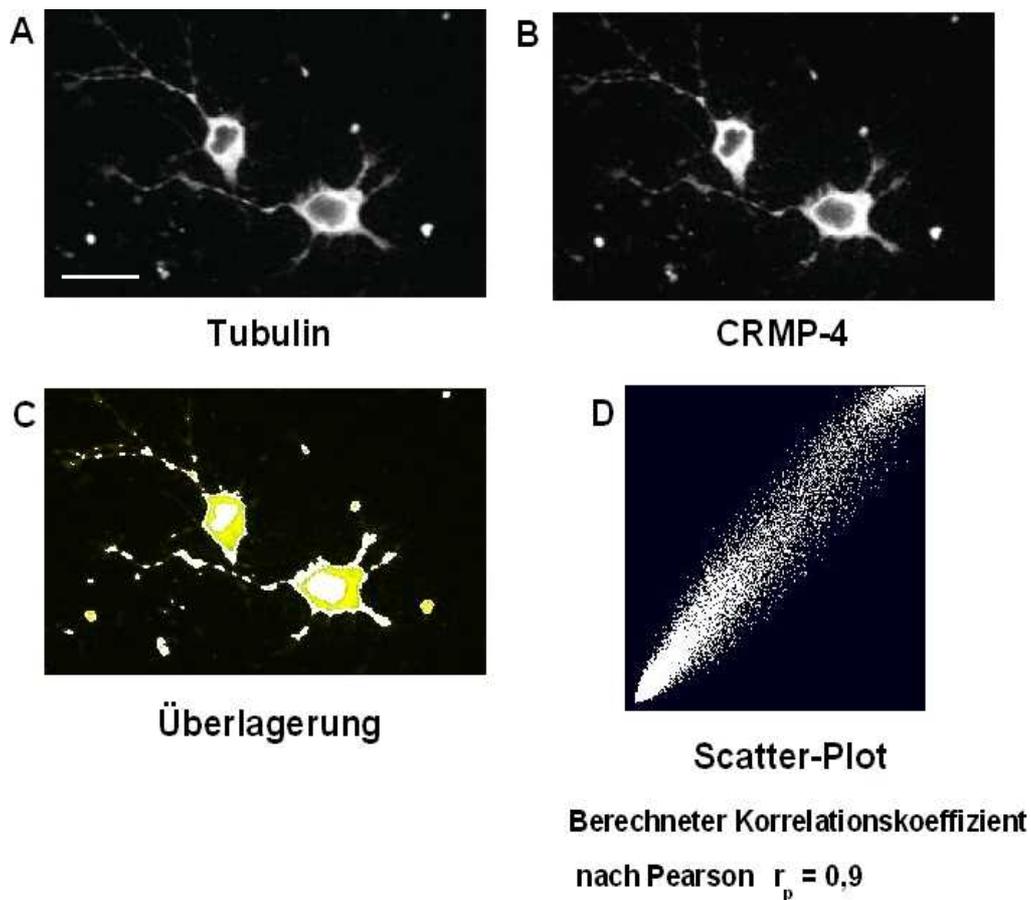
**Abbildung 17: Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und Tubulin nach Behandlung mit Nocodazol.**

Die Abbildung zeigt corticale Neurone, die mit Nocodazol inkubiert wurden. A) zeigt die Färbung gegen  $\beta$ -Tubulin, B) die Färbung gegen endogenes CRMP-4, C) die Überlagerung der Bilder A) und B) und D) das dazugehörige Streudiagramm.

Maßstab, 20  $\mu\text{m}$

Bei der Behandlung von Neuronen mit Nocodazol zeigte sich wie erwartet eine Umverteilung des Tubulins (Abbildung 17; Abbildung 19). Gleichzeitig kam es zu einer Umverteilung von CRMP-4. Das Signal für CRMP-4 in den Neuriten der Zellen nahm ab (Abbildung 17 B). Das Reagenz Nocodazol hat einen ähnlichen Einfluß auf die Polymerisationsdynamik der Mikrotubuli, wie das Latrunculin A auf die des Actins. Auch hier wird die weitere Polymerisation der Tubulin-Heterodimere zu Mikrotubuli verhindert. Daraus ergibt sich eine Netto-Depolymerisation der Mikrotubuli innerhalb der Zelle, und über einen längeren Zeitraum lösen sich die Mikrotubuli auf. Für die Färbung von Tubulin und CRMP-4 zeigt sich, dass im Vergleich zur Kontrollfärbung (Abbildung 16) keine faserförmigen Färbungen mehr für das Tubulin, und das CRMP-4 vorhanden waren. Es zeigte sich bei den beiden Proteinen ein eher gepunktetes Muster der Proteinverteilung, das über die ganze Zelle verteilt war (Abbildung 17 A und B). Dies ist auf die Auflösung der Mikrotubuli zurückzuführen. Interessant ist dabei die Ansammlung des Tubulins und auch des CRMP-4 in umschriebenen Arealen. Der Grad der Kolokalisation zwischen den beiden Proteinen

stieg sogar im Vergleich zur Kontrollbedingung noch etwas an. Der Korrelationskoeffizient nahm von 0,88 auf 0,92 leicht zu. Dies ist mit der besseren Bindung der CRMPs an Tubulin-Heterodimere als an Mikrotubuli zu erklären. Dieser Befund ist auch in der Literatur bei Fukata beschrieben (Fukata *et al.*, 2002).

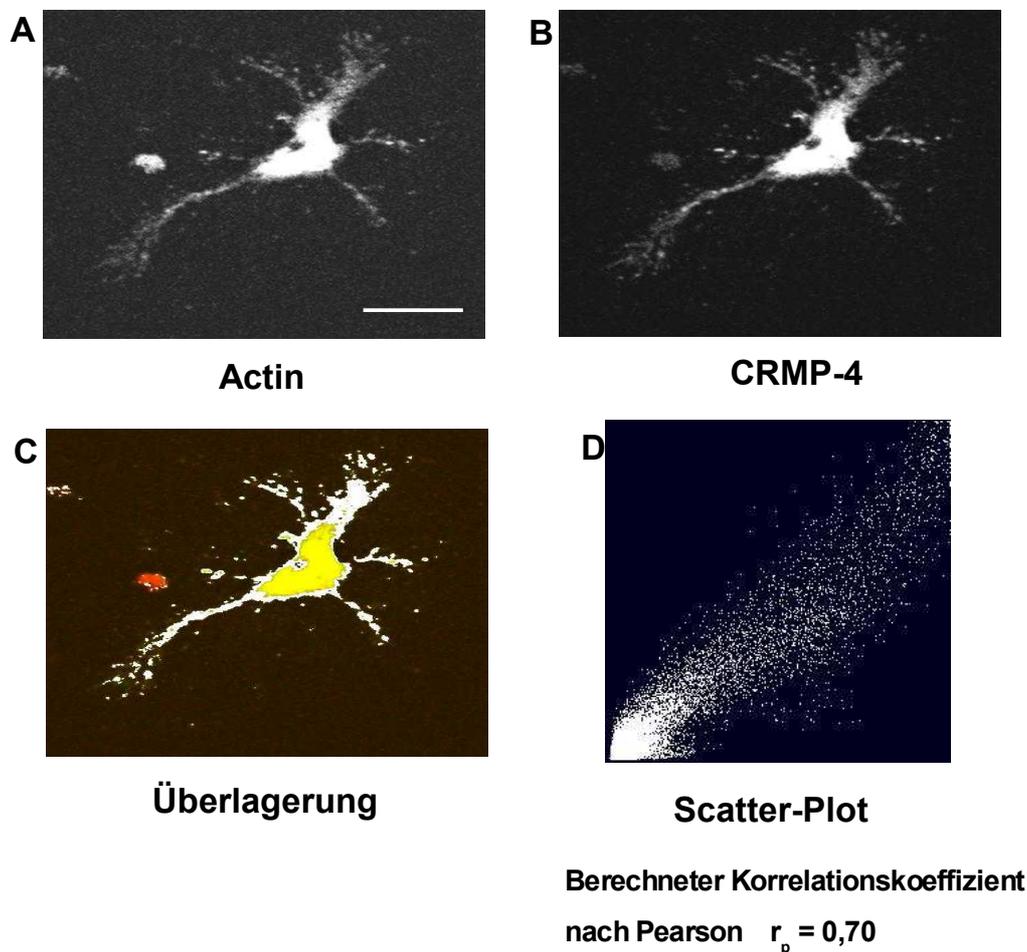


**Abbildung 18: Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und Tubulin nach Behandlung mit Latrunculin A.**

Die Bilder zeigen corticale Neurone, die mit Latrunculin A inkubiert wurden und gegen  $\beta$ -Tubulin (A) und endogenes CRMP-4 (B) gefärbt wurden. C) zeigt die Überlagerung der Bilder von A) und B) und D) das dazugehörige Streudiagramm.

Maßstab, 20  $\mu$ m

Außerdem wurde die Wirkung einer Inkubation der Zellen mit Latrunculin A auf die Verteilung des Tubulins untersucht (Abbildung 18). Hier zeigt sich, dass bei der Inkubation der Zellen mit diesem das Actin manipulierenden Reagenz auch die Verteilung von Tubulin in der Zelle beeinflusst wird. Dies steht wieder im Einklang mit der bekannten Interaktion zwischen dem Actin- und Tubulincytoskelett. Wie auch die Inkubation der Zellen mit Nocodazol die Verteilung der Cytoskelettkomponente F-Actin in diesen Zellen manipulierte (Abbildung 19), so zeigt sich auch hier die Wirkung des Reagenzes Latrunculin A auf das Tubulincytoskelettsystem. Dies ist wieder ein Hinweis auf die Interaktion dieser beiden Cytoskelettsysteme untereinander. Das Streudiagramm und der Korrelationskoeffizient von 0,9 zeigen aber auch hier eine Kolokalisation von Tubulin und CRMP-4 Proteinen an (Abbildung 18 D), die durch die Umverteilung nicht beeinträchtigt wird.



**Abbildung 19:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin nach Behandlung mit Nocodazol.

Die Abbildung zeigt corticale Neurone nach der Inkubation mit dem Mikrotubuli-depolymerisierenden Reagenz Nocodazol. A) zeigt die Färbung des F-Actin, B) die Färbung des CRMP-4, C) die Überlagerung der beiden Bilder A) und B) und D) zeigt das zugehörige Streudiagramm der Kolokalisation der beiden Proteine. Maßstab, 20 µm

Bei der Inkubation mit Nocodazol veränderte sich auch die Verteilung von F-Actin. Dies steht im Einklang mit der bekannten Wechselbeziehung dieser beiden Cytoskelettsysteme innerhalb der Zelle (*Wittmann und Waterman-Storer, 2001; Gordon-Weeks, 2004*). Was sich bei dieser Inkubation bemerkenswerter Weise wenig änderte, war der Grad der Kolo-kalisation zwischen dem F-Actin und dem CRMP-4, verglichen mit den Zellen, die unter Kontrollbedingungen inkubiert wurden (Abbildung 15 C, Abbildung 19). Hier zeigten sich sowohl im Streudiagramm als auch im Wert des berechneten Korrelationskoeffizienten eine Kolo-kalisation zwischen dem CRMP-4 und F-Actin. Das Streudiagramm zeigt eine charakteristische Punktwolke, die für eine Kolo-kalisation spricht (Abbildung 19 D) und auch der Korrelationskoeffizient spricht mit einem Wert von 0,70 dafür. Bei der Inkubation mit Nocodazol kommt es zu einer Umverteilung von F-Actin und CRMP-4, aber der Kolo-kalisationsgrad beider Proteine ändert sich nicht. Dies ließe sich auf die hier intakt gebliebene Struktur des F-Actins zurückführen, die ja durch das Nocodazol nicht angegriffen wird. Dies könnte ein Hinweis auf direkte Bindung von CRMP-4 an Actinfilamente sein.

**Tabella11: Zusammenstellung der ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die Kolo-kalisation von CRMP-4 und Actin und CRMP-4 und Tubulin.** Die Werte wurden in corticalen Neuronen ermittelt, die mit Latrunculin A und Nocodazol inkubiert wurden.

| <b><i>Inkubationsbedingungen für Zellen</i></b> | <b><i>Korrelationskoeffizient nach Pearson <math>r_P</math> für die Kolo-kalisation zwischen Actin und CRMP-4</i></b> |
|---|---|
| Kontrolle                                       | 0,76  |
| Latrunculin A                                   | 0,35  |
| Nocodazol                                       | 0,7   |
|   | <b><i><math>r_P</math> zwischen <math>\beta</math>-Tubulin und CRMP-4</i></b>   |
| Kontrolle                                       | 0,88  |
| Latrunculin A                                   | 0,9   |
| Nocodazol                                       | 0,92  |

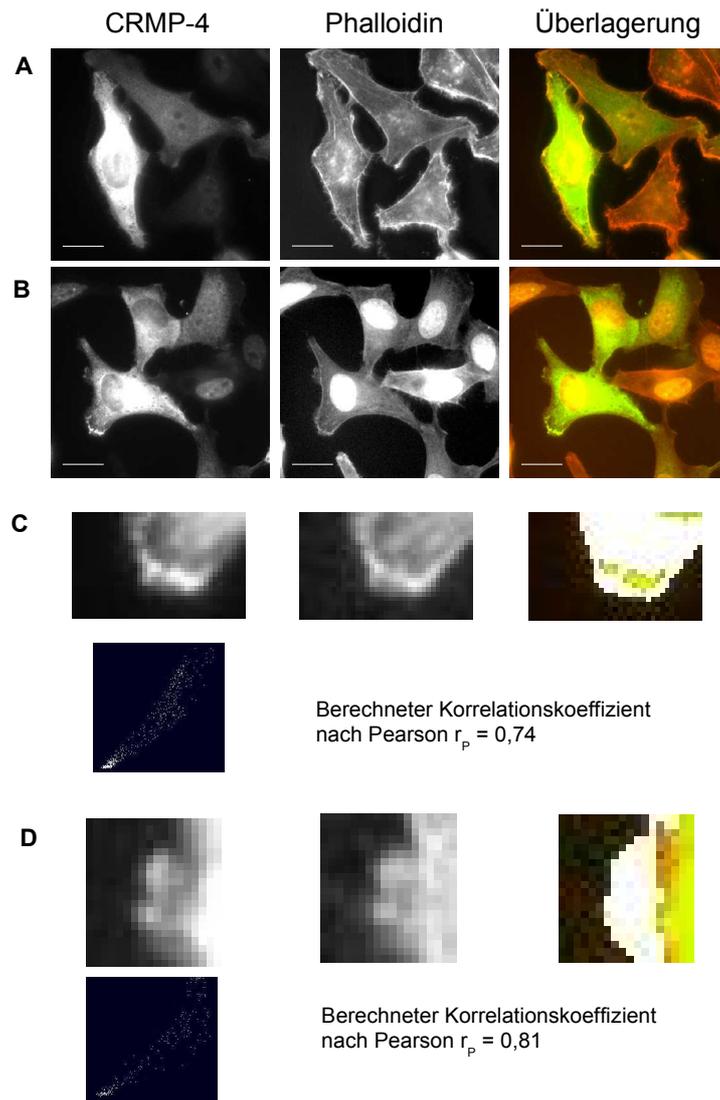
Zusammenfassend kann man als Ergebnis dieser Experimente festhalten, dass die in der Literatur beschriebene Kolo-kalisation von CRMP-4 mit Tubulin und von CRMP-4 mit F-Actin sich bestätigte. Die Aufhebung der geordneten Strukturen dieser Cytoskelett-Bestandteile zog zum einen eine gleichzeitige Zerstörung der Kolo-kalisation von CRMP-4 mit F-Actin nach sich und zum anderen eine erhöhte Kolo-kalisation zwischen Tubulin und CRMP-4, wenn die polymeren Mikrotubuli in kleinere Einheiten zerlegt wurden. Außerdem konnte mit diesen Experimenten

gezeigt werden, dass eine enge Wechselbeziehung zwischen den Cytoskelettsystemen von Actin und Tubulin besteht, da die Manipulation des einen auch eine Veränderung des anderen nach sich zog. Diese Befunde geben einen starken Hinweis darauf, dass innerhalb der corticalen Neurone Interaktionen zwischen CRMP-4, F-Actin und Tubulin bestehen. Insbesondere spricht die spezifische Reduktion des Kollokalisationsgrades zwischen F-Actin und CRMP-4 nach Behandlung mit Latrunculin A, aber nicht nach Behandlung mit Nocodazol für eine Bindung von CRMP-4 an Mikrofilamente. Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson, die unter den verschiedenen Bedingungen ermittelt wurden, sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

#### **4.6. Interaktion von rekombinantem Collapsin Response Mediator Protein-4 mit F-Actin**

##### **4.6.1. Mikroinjektion von rekombinantem Collapsin Response Mediator Protein-4 in HeLa-Zellen**

Um zu untersuchen, ob eine direkte Interaktion zwischen CRMP-4 und F-Actin besteht, wurde bakteriell exprimiertes rekombinantes CRMP-4 der Ratte verwendet (*Roßlenbroich, Diplomarbeit 2000*). Dieses Protein wurde eingesetzt, um die Bindung an F-Actin in vivo mittels Mikroinjektion in HeLa-Zellen und in vitro mittels Kosedimentationsstudien zu charakterisieren. Nachdem das rekombinante, gereinigte CRMP-4 in die HeLa-Zellen injiziert wurde, beobachteten wir, wie es sich in Lamellipodien der Zelle anreicherte und dort mit F-Actin kollokalisierte (Abbildung 20). Aus diesen Beobachtungen schlossen wir, dass es bei unserem rekombinantem CRMP-4 keinen Anhalt für eine Fehlfaltung des Proteins gab, welche zu einer verminderten oder aufgehobenen Bindung an das F-Actin führen könnte, und verwendeten dieses für weitere Experimente. Interessanterweise löste die Mikroinjektion des Proteins keinen verstärkten Cytoskelett-Kollaps der Zellen aus. So war die Anzahl der Zellen, die nach der Injektion kollabiert erschienen, kleiner als 10%. In Daten von drei unabhängigen Experimenten zeigten sich nach der Mikroinjektion von CRMP-4 5 von 63 Zellen mit einer eher kollabierten Morphologie. Nach der Injektion von einem Kontrollprotein war das Verhältnis 4 von 63 Zellen. Ein durchgeführter  $\chi^2$ -Test zeigte, dass dieser Unterschied nicht signifikant war. Es gab bei den Beobachtungen in diesem Experiment keinen Hinweis auf eine Kontraktion oder einen Kollaps des Actincytoskeletts der Zellen. Ebenso zeigte sich keine Umorganisation der Zellform und auch keine verstärkte Bildung von Filopodien, verglichen mit den Zellen, in die das Kontrollprotein injiziert wurde.



**Abbildung 20: Mikrojektion von rekombinantem CRMP-4 in lebenden Zellen.**

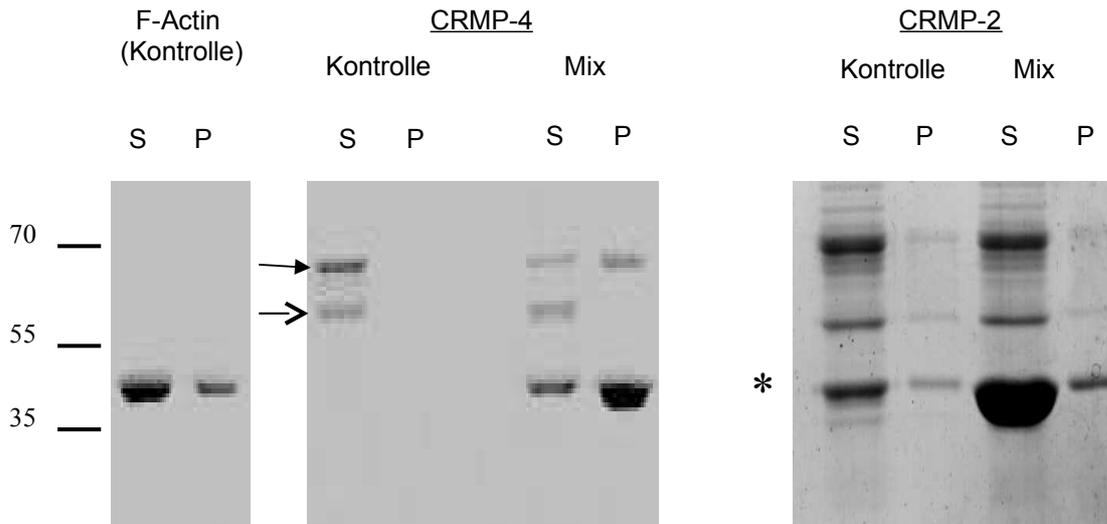
A) und B) zeigen mikroskopische Bilder von Hela-Zellen nach Mikrojektion von rekombinantem CRMP-4 und anschließender Färbung der Zellen gegen CRMP-4 und F-Actin (Phalloidin-TRITC). C) und D) zeigen vergrößerte Ausschnitte aus B) an denen eine quantitative Bestimmung der Kolo-kalisation durchgeführt wurde.

Maßstab, 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.6.2. Kosedimentationsexperimente mit CRMP-4 und F-Actin

Um zu bestätigen, dass die Kolo-kalisation von CRMP-4 mit F-Actin in Zellen auf einer direkten Interaktion von CRMP-4 mit F-Actin beruht, führten wir Kosedimentationsstudien mit den beiden gereinigten Proteinen durch. Bei diesen Kosedimentationsexperimenten unterzogen wir die Proteine Zentrifugationen mit Beschleunigungen von 100.000 x g. Bei dieser Beschleunigung sedimentiert F-Actin und kann ein gebundenes Protein mit sich in die Pelletfraktion der Zentrifugation ziehen. Dieses Protein wird dann bei der SDS-PAGE in der Pelletfraktion sichtbar.

Als erstes wurde in einem solchen Experiment untersucht, wie sich die Proteine alleine bei der Zentrifugation verhalten, ohne den möglichen Interaktionspartner. Das Protein, dessen Bindung an F-Actin untersucht werden soll, darf sich nicht in der Pelletfraktion im Ansatz ohne Actin zeigen. Dies fanden wir aber für das CRMP-4. Hier zeigte sich, dass ein Teil des Proteins bei diesen Zentrifugationsbedingungen in die Pelletfraktion überging. Aus diesem Grund war leider eine qualitative Bewertung der Ergebnisse aus diesem Teil des Experiments schwierig. Beobachtungen, die in unserem Labor gemacht wurden, zeigten, dass in voller Länge exprimierte, unverkürzte, rekombinante CRMP-4 Homooligomere bildet, [wie in einer Gelfiltrations Chromatographie von Dai gezeigt wurde (*Dai, Dissertation; Rosslenbroich et al., 2005*)]. Dies legt nahe, dass CRMP-4-Oligomere F-Actin zu Bündeln miteinander vernetzen könnten. Deshalb wurden Kosedimentationstests auf Actin-Bündelung hin gemacht, die bei 15.000 x g durchgeführt wurden (Abbildung 21). Eine Beschleunigung von 15.000 x g ist eine charakteristische Größe, bei der Actinbündel in einer Zentrifugation pelletieren und gebundene Proteine mit sich in die Pelletfraktion ziehen. Unter diesen Bedingungen wurden Kontrollzentrifugationen mit rekombinantem CRMP-4 und F-Actin durchgeführt. Dabei wanderte nur ein geringer Teil des Actins in die Pelletfraktion und das CRMP-4 gar nicht (Abbildung 21). Wenn CRMP-4 und F-Actin im Versuch gemeinsam inkubiert wurden, so pelletierte das meiste der 65 kDa Form des CRMP-4 zusammen mit dem F-Actin (Abbildung 21). Das truncierte 55 kDa CRMP-4 Peptid blieb dagegen quantitativ im Überstand der Zentrifugation. Diese Ergebnisse wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten erzielt, die mit verschiedenen Präparationen von rekombinantem CRMP-4 durchgeführt wurden. Die große, oligomerisierende Form von CRMP-4 bindet demnach an F-Actin und führt zu dessen Bündelung. In Kontrollexperimenten wurde rekombinantes CRMP-2 der Ratte eingesetzt. Das affinitätsgereinigte Protein zeigte ähnlich wie das CRMP-4 neben der Hauptbande mit dem erwarteten Molekulargewicht ein Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa. Zusätzlich fand sich noch ein weiteres, kleineres Fragment mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa. In Kosedimentationsexperimenten bei 15.000 x g ergab sich kein Anhalt für eine Interaktion von CRMP-2 mit F-Actin (Abbildung 21).

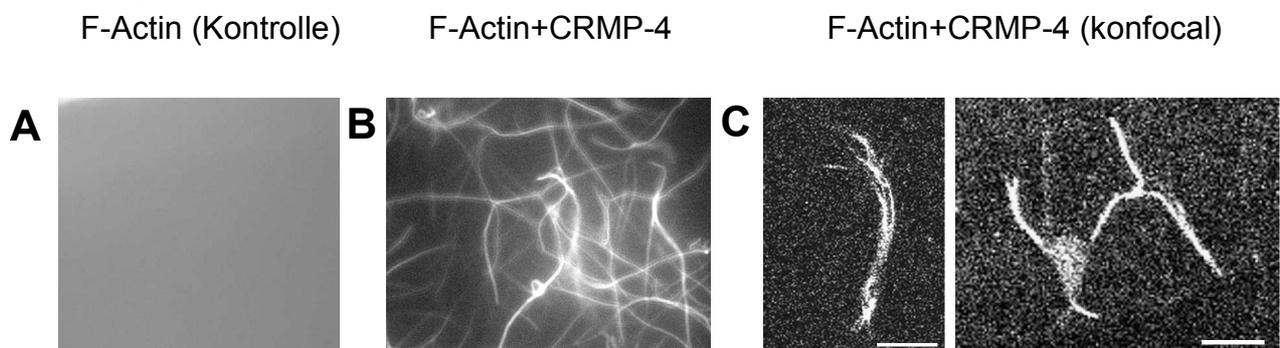


**Abbildung 21: Analyse der Interaktion von rekombinantem CRMP-4 mit F-Actin *in vitro* durch einen Kosedimentationsassay.**

Polymerisiertes  $\beta$ -Actin, rekombinantes CRMP-4 und ein Mix aus  $\beta$ -Actin und CRMP-4 wurden für 30 min. bei 15.000 x g zentrifugiert und gleiche Aliquots von den entstehenden Überständen (Ü) und Pellets (P) wurden über SDS-PAGE (10%) und eine anschließende Coomassie Färbung analysiert.

Diese Analyse wurde analog ebenfalls für CRMP-2 durchgeführt. Die Balken an der linken Seite zeigen die Molekulargewichte in kDa an. Die Pfeile zeigen die Positionen der 65 kDa bzw. 55 kDa His-CRMP-4 Polypeptide an. Der Stern zeigt die Position einer durch Proteolyse entstandenen Proteinbande in den Präparationen von CRMP-2. Die oligomerisierende Form von CRMP-4 bildet Kosedimente mit F-Actin und führt zu Bündelung.

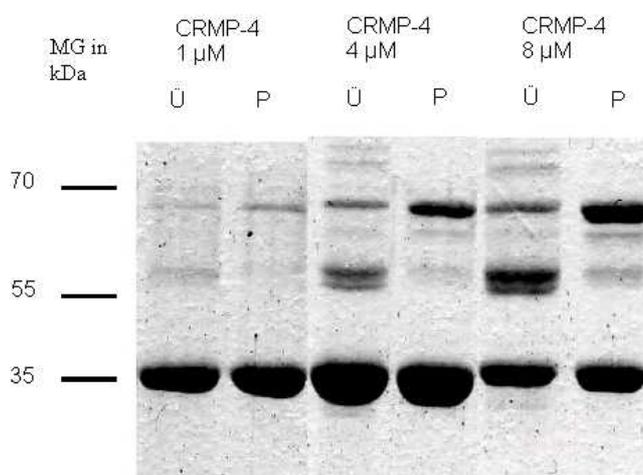
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der F-Actin-CRMP-4 Komplexe, die mit TRITC-markiertem Phalloidin gefärbt wurden, zeigten die Bildung eines dichten Netzwerkes von gebündelten Actinfasern mit einem homogenen Durchmesser (Abbildung 22 B). Eine Kontrollfärbung von F-Actin alleine zeigte keine Actinbündelung (Abbildung 22 A). Mit Hilfe hochauflösender Bilder eines konfokalen Mikroskops wurde der durchschnittliche Durchmesser der Actinbündel, die sich durch die Zugabe des CRMP-4 gebildet hatten, mit ungefähr 1  $\mu\text{m}$  bestimmt (Abbildung 22 C).



**Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von F-Actin in Abwesenheit und Anwesenheit von CRMP-4 *in vitro*.**

Fluoreszenzmikroskopische Bilder von polymerisiertem F-Actin in Abwesenheit ((A), Kontrolle) und Anwesenheit (B) von CRMP-4. Das Zusammentreffen der beiden Komponenten führt zur Entstehung gebündelter Actinfasern. Diese Faserbündel zeigen auch die konfokalen Bilder (C). Maßstab, 20  $\mu\text{m}$ .

Um die Bindungsaffinität zwischen dem CRMP-4 und dem F-Actin zu messen, wurden Kosedimentationsassays mit den beiden Bindungspartnern durchgeführt, bei denen die Konzentration des CRMP-4 zwischen  $1\mu\text{M}$  und  $8\mu\text{M}$  variiert wurde (Abbildung 23). Die Durchführung der einzelnen Kosedimentationsexperimente für diese Konzentrationsreihe verlief genauso wie das Standardexperiment, was die Inkubation der beiden Bindungspartner und die anschließende Zentrifugation betraf.



**Abbildung 23: Coomassie-Gel zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Bindung von CRMP-4 an F-Actin.**

Das CRMP-4 wurde in den Konzentrationen 1, 4 und  $8\mu\text{M}$  eingesetzt, die Konzentration des F-Actin blieb konstant bei  $6\mu\text{M}$ . Pro Konzentration wurden nach der Zentrifugation die Überstand-Fractionen (Ü) und die Pellet-Fractionen (P) aufgetragen.

**Tabelle 12: Densitometriedaten eines Coomassie Gels zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von CRMP-4 und F-Actin.**

| c(CRMP-4) Gesamt = $8\mu\text{M}$ | Form und Lokalisation    | gemessene Werte | Werte ohne Hintergrund |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|
| c(Actin) Gesamt = $6\mu\text{M}$  | CRMP Überstand           | 297981          | 236166                 |
|                                   | Hintergrund              | 61815           |                        |
|                                   | CRMP trunziert Überstand | 759000          | 654393                 |
|                                   | Hintergrund              | 104607          |                        |
|                                   | Actin Überstand          | 819140          | 741024                 |
|                                   | Hintergrund              | 78116           |                        |
|                                   | CRMP Pellet              | 643011          | 573117                 |
|                                   | Hintergrund              | 69894           |                        |
|                                   | CRMP trunziert Pellet    | 162007          | 107816                 |
|                                   | Hintergrund              | 54191           |                        |
|                                   | Actin Pellet             | 869274          | 792950                 |
|                                   | Hintergrund              | 76324           |                        |

Durch die so bestimmten Konzentrationen der freien Bindungspartner und des Komplexes konnte die Gleichgewichtskonstante  $K$  berechnet werden, die ein Maß der Bindungsstärke zwischen zwei Bindungspartnern darstellt. Die Konstante  $K$  ist umso größer, je stärker die Bindung ist.

Als Beispiel ist hier die Berechnung von  $K$  für die Inkubation von CRMP-4 in einer Konzentration von  $8 \mu\text{M}$  und F-Actin mit  $6 \mu\text{M}$  gezeigt. Die Werte der Densitometrie hierzu sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Der Wert für das gesamte, im Ansatz vorhandene CRMP-4 ergibt sich aus der Summe der beiden Formen trunkiert und nicht trunkiert in beiden Fraktionen.

$$\text{CRMP Gesamt} = \text{CRMP im Überstand} + \text{CRMP trunkiert im Überstand} + \text{CRMP im Pellet} + \text{CRMP trunkiert im Pellet} = 1571492$$

Im nächsten Schritt wird der Wert bestimmt, der nicht trunkiertes CRMP angibt, also der Anteil vom Gesamt-CRMP der für die Bindung an das Actin zur Verfügung steht.

Dieser ergibt sich aus den Werten für CRMP im Überstand + CRMP im Pellet = 809283.

Daraus folgt, dass der Anteil des nicht trunkierten CRMP-4 am gesamten CRMP-4 im Ansatz 52% beträgt, woraus sich eine Konzentration von  $4,1 \mu\text{M}$  von bindungsfähigem CRMP-4 unter diesen Bedingungen, bei der das CRMP-4 in einer Konzentration von  $8 \mu\text{M}$  eingesetzt wurde, ergibt.

Für den Bindungspartner F-Actin berechnen sich die einzelnen Werte wie folgt:

Als erstes wird auch hier der Gesamtwert für sämtliches Actin das sich im Versuchsansatz befindet durch Addition ermittelt.

$$\text{F-Actin gesamt} = \text{F-Actin im Überstand} + \text{F-Actin im Pellet} = 1533974.$$

Der Wert des F-Actins im Überstand beschreibt den Anteil des Actins, der keine Bindung eingegangen ist, also frei vorliegt. Er beträgt in diesem Fall 741024. Das entspricht einem Anteil von 48,3% am Gesamt-Actin, woraus sich eine Konzentration von  $2,88 \mu\text{M}$  für diesen Ansatz berechnen lässt.

Die Konzentration des bindungsfähigen, aber nicht gebundenen CRMP-4, also freien CRMP-4 ergibt sich aus dem Quotienten von CRMP-4 im Überstand / sämtliches nicht trunkiertes CRMP-4 im Ansatz. Dieser beträgt 29,2%. Daraus ergibt sich eine Konzentration von  $1,2 \mu\text{M}$  freiem CRMP-4 in diesem Versuch.

Als letzte Variable für die Berechnung einer Gleichgewichtskonstante mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes benötigt man noch die Konzentration des Komplexes, den die beiden gebundenen Bindungspartner darstellen. Diese erhält man aus dem Quotienten (CRMP-4 im Pellet) / (sämtliches nicht trunkiertes CRMP-4 im Ansatz). Er beträgt 0,708 oder 70,8%. Daraus errechnet sich eine Konzentration von  $2,9 \mu\text{M}$  für den Komplex zwischen CRMP-4 und F-Actin.

Die Konzentrationen von CRMP-4, F-Actin und den Komplex der beiden Bindungspartner für die anderen Ansätze sind in der folgenden Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13: Konzentrationen für CRMP-4, F-Actin und dem CRMP-4-F-Actin-Komplex zur Berechnung der Gleichgewichtskonstanten.**

$K$  gibt die aus diesen Werten ermittelte Gleichgewichtskonstante an,  $K_D$  die dazu reziproke Dissoziationskonstante.

|                              |                          |                        | $K_{(1/\mu M)}$ | $K_{D(\mu M)}$ |
|------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------|----------------|
| $c(\text{CRMP-4}) = 8 \mu M$ | CRMP-4 (frei)            | 1,2 $\mu M$            |                 |                |
|                              | F-Actin (frei)           | 2,88 $\mu M$           |                 |                |
|                              | Komplex (CRMP-4/F-Actin) | 2,9 $\mu M$            | 0,64            | 1,56           |
|                              |                          |                        |                 |                |
| $c(\text{CRMP-4}) = 8 \mu M$ | CRMP-4 (frei)            | 1,36 $\mu M$           |                 |                |
|                              | F-Actin (frei)           | 3,0 $\mu M$            |                 |                |
|                              | Komplex (CRMP-4/F-Actin) | 2,64 $\mu M$           | 0,84            | 1,19           |
|                              |                          |                        |                 |                |
| $c(\text{CRMP-4}) = 4 \mu M$ | CRMP-4 (frei)            | 0,48 $\mu M$           |                 |                |
|                              | F-Actin (frei)           | 3,06 $\mu M$           |                 |                |
|                              | Komplex (CRMP-4/F-Actin) | 1,61 $\mu M$           | 1,1             | 0,91           |
|                              |                          |                        |                 |                |
| $c(\text{CRMP-4}) = 1 \mu M$ | CRMP-4 (frei)            | 0,26 $\mu M$           |                 |                |
|                              | F-Actin (frei)           | 3,12 $\mu M$           |                 |                |
|                              | Komplex (CRMP-4/F-Actin) | 0,36 $\mu M$           | 0,44            | 2,27           |
|                              |                          |                        |                 |                |
| $c(\text{CRMP-4}) = 1 \mu M$ | CRMP-4 (frei)            | 0,24 $\mu M$           |                 |                |
|                              | F-Actin (frei)           | 2,82 $\mu M$           |                 |                |
|                              | Komplex (CRMP-4/F-Actin) | 0,43 $\mu M$           | 0,63            | 1,59           |
|                              |                          | <b>Mittelwert</b>      | <b>0,73</b>     | <b>1,37</b>    |
|                              |                          | Standardabweichun<br>g | 0,25            | 0,51           |

Mit Hilfe der bestimmten Konzentrationen der einzelnen Variablen für das Massenwirkungsgesetz ist es dann möglich, durch das Einsetzen dieser Variablen in die Gleichung die Gleichgewichtskonstante zu berechnen.

Die allgemeine Gleichung für die Berechnung von K lautet:

$$\frac{[AB]}{([A] \cdot [B])} = K$$

Formel 2

wobei A und B die beiden Bindungspartner beschreiben. [A] und [B] stehen für die jeweiligen einzelnen, freien Formen der beiden Moleküle, und [AB] für den Bindungskomplex der beiden Partner.

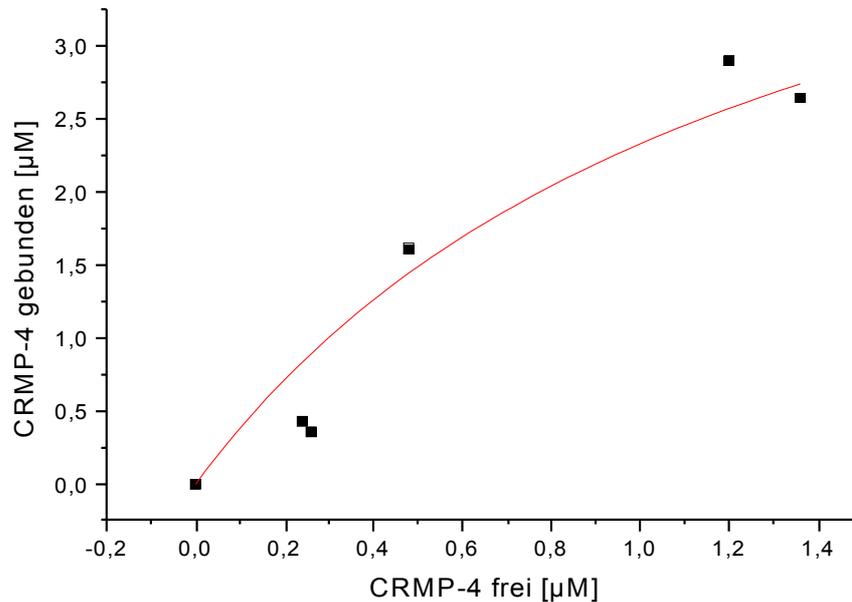
In unserem speziellen Fall ersetzen wir A und B durch CRMP-4 und F-Actin. Daraus ergibt sich dann:

$$\frac{[CRMP-4/F-Actin]}{([CRMP-4] \cdot [F-Actin])} = K$$

Formel 3

Für die Kosedimentationsassays bei den unterschiedlichen Konzentrationen und den aus den Versuchen abgeleiteten Daten ergaben sich nach der Verrechnung dieser Daten nach dem Massenwirkungsgesetz die in der Tabelle 13 angegebenen Konstanten.

Aus den Werten für diese fünf Konzentrationen ergab sich ein Mittelwert der Bindungskonstanten von  $0,73 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Dies entspricht einer mittleren Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,37 \text{ } \mu\text{M}$ . Dieser Wert liegt in der Größenordnung anderer actinbindender Proteine wie zum Beispiel der des Fascins der  $1,1 \text{ } \mu\text{M}$  beträgt (*Yamakita et al., 1996*). Abbildung 24 zeigt ein Diagramm, in dem die ermittelten Konzentrationen für freies CRMP-4 und an F-Actin gebundenes CRMP-4 aus Tabelle 13 gegeneinander aufgetragen sind. Hierbei wurden die Werte durch eine Hyperbel approximiert. Bei der Kurvenanpassung wurde  $K_D = 1,37 \text{ } \mu\text{M}$  konstant gehalten. Diese zeigt den charakteristischen Verlauf einer Sättigungskurve. Allerdings konnten bei den Messungen keine so hohen Konzentrationen des CRMP-4 eingesetzt werden, dass die Meßpunkte im Sättigungsbereich der Kurve gelegen hätten. Weiterhin ließ sich aus diesen Werten auch eine Stöchiometrie zwischen den beiden Bindungspartnern ermitteln, die ein Verhältnis von 1:1 zwischen den beiden Proteinen beschreibt.



**Abbildung 24:** Diagramm zum Verhältnis von gebundenem und freiem CRMP-4.

Auftrag des freien, nicht gebundenen CRMP-4 (X-Achse, Überstand) gegenüber dem an gebündeltes F-Actin gebundenen CRMP-4 (Y-Achse, Bündel-assoziiert). Die Kurve zwischen den Punkten ist eine berechnete nichtlineare Regressionskurve, der die eingetragenen Punkte zugrunde liegen.

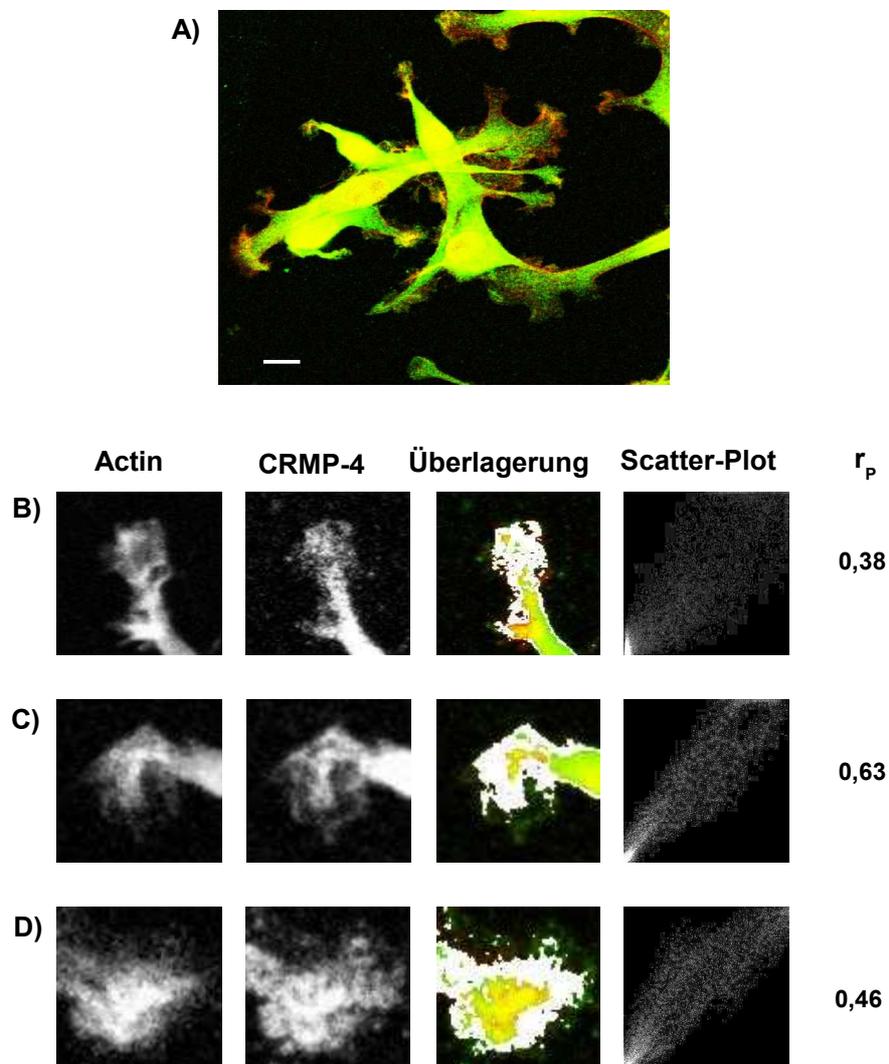
Aufgrund dieser Kosedimentationsexperimente lässt sich zusammenfassend feststellen, dass in vitro CRMP-4 an F-Actin bindet, dass es eine Bündelung von F-Actin bewirkt und dass die von uns ermittelte Gleichgewichtskonstante in einem Bereich liegt, der sich auch mit dem anderer Actin bindender und bündelnder Proteine vergleichen lässt.

#### **4.7. Verteilung von CRMP-4 und F-Actin nach der Behandlung von Zellen mit Pharmaka, welche die Proteinphosphorylierung beeinflussen**

Für die CRMPs ist bekannt, dass sie Phosphoproteine sind. Um die Möglichkeit zu testen, ob eine Erhöhung der Proteinphosphorylierung die Interaktion von CRMP-4 mit Actinfilamenten in lebenden Zellen regulieren könnte, wurden B35-Neuroblastomzellen, mit verschiedenen Reagenzien, die die Proteinphosphorylierung erhöhen, behandelt. B35-Neuroblastomzellen gelten als ein Zellkultursystem, das sich sehr gut eignet, um Neurone des zentralen Nervensystems zu untersuchen (Otey et al., 2003). Sie bieten daher eine gute Alternative zu primären Neuronen, da sie einfacher zu kultivieren sind und sich im Experiment robuster gegenüber den experimentellen

Bedingungen verhalten. Um zu beobachten, welche Wirkungen diese Pharmaka auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin haben, betrachteten wir spezielle Bereiche des Zellcortex, die Lamellipodien zeigten. In diesen Bereichen führten wir ebenfalls, wie in den Experimenten mit Latrunculin A und Nocodazol (Abschnitt 4.5.2.), eine quantitative Bestimmung der Kolokalisation zwischen den beiden Proteinen durch. Mit Hilfe des Programms „Image J 1.33u“ ( National Institute of Health, USA) berechneten wir den Korrelationskoeffizienten nach Pearson und werteten diesen als ein Maß für die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin. Als Vergleich dienten unbehandelte B35-Zellen, die unter Standardbedingungen in der Zellkultur gehalten wurden.

Die erste Abbildung zeigt ein Beispiel für die Kontrollzellen und für die ermittelten Koeffizienten aus einzelnen Bereichen dieser Zellen.

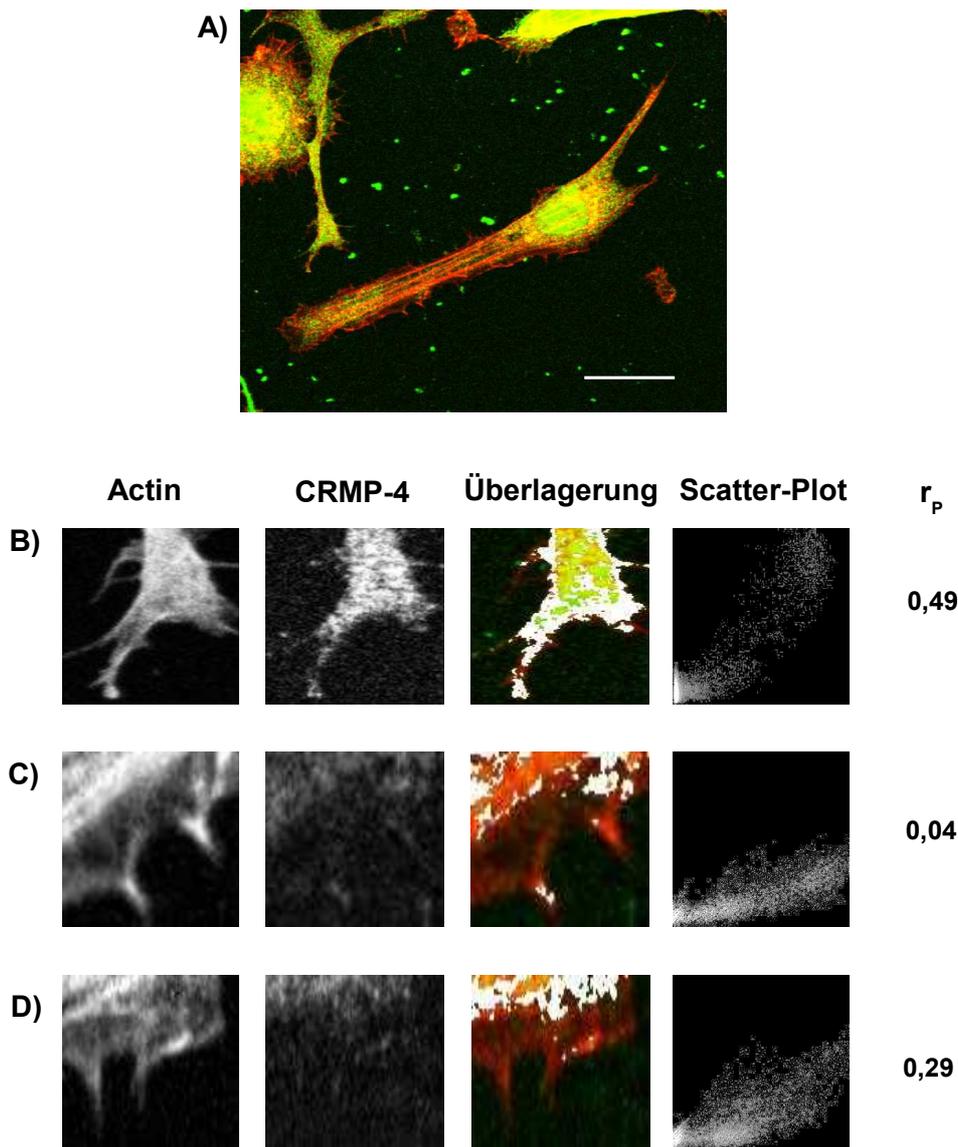


**Abbildung 25: Quantifizierung der Kolokalisation von F-Actin und CRMP-4 in B35-Neuroblastomzellen.**

Die Abbildung zeigt B35-Zellen unter Kontrollbedingungen. Das Actincytoskelett ist mit Phalloidin-TRITC gefärbt, CRMP-4 mit affinitätsgereinigtem CRMP-4 Antikörper. A) zeigt die Übersicht über die Gruppe von Zellen, aus denen die Bereiche, die untersucht wurden, stammen. B-D) zeigen drei vergrößerte Bereiche aus A), deren Kolokalisation zwischen CRMP-4 und F-Actin quantifiziert wurden.  $r_p$  = Korrelationskoeffizient nach Pearson. Maßstab, 20  $\mu\text{m}$ .

In den drei ausgewählten Bereichen (Abbildung 25 B bis D) sind Ausläufer der Zellen zu erkennen, die Lamellipodien enthalten. Bei allen Dreien zeigten die Bilder, die die Überlagerung der beiden Kanäle für CRMP-4 und F-Actin darstellen, eine partielle Kolo-kalisation der beiden Proteine (weiße Bereiche) und die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen  $r_p = 0,38$  und  $0,63$ . Bei den corticalen Neuronen lag der gemessene Wert für den Korrelationskoeffizienten nach Pearson unter Kontrollbedingungen bei  $r_p = 0,76$  (Abbildung 13). Dieser Wert lag etwas höher als bei den hier verwendeten B35-Zellen, wobei allerdings zu beachten ist, dass wir bei den Neuronen die ganze Zelle betrachteten und hier nur ausgewählte Bereiche am Zellcortex.

Da CRMP-4 Konsensus-Sequenzen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase A und durch die Proteinkinase C besitzt (*Franken, Dissertation, 2000*), wurden Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) (Abbildung 26) und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Abbildung 27) als spezifische Aktivatoren dieser beiden Kinasen den B35-Zellen in Kultur appliziert. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Aktivität der Kinasen, was zu einem höheren Phosphorylierungsstatus des CRMP-4 führen sollte. Abbildung 26 zeigt Beispiele für Bereiche aus einer Zelle, die mit Dibutyryl-cAMP behandelt wurde.

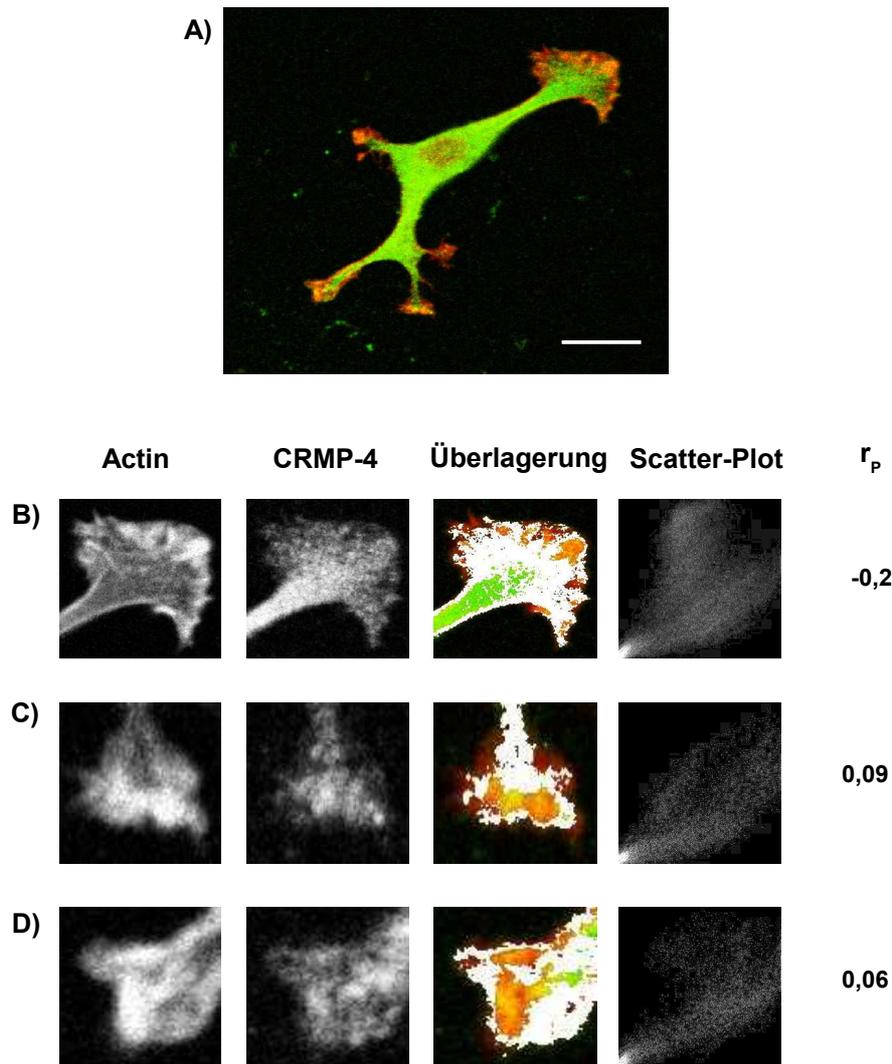


**Abbildung 26: Auswirkung von Dibutyryl-cAMP auf die Kolo-kalisation von CRMP-4 und F-Actin.**

Diese B35-Zellen wurden mit Dibutyryl-cAMP ( $c = 1 \text{ mM}$ ), einem Aktivator der Proteinkinase A, behandelt ( $t = 2h$ ). A) zeigt einen Überblick über die Zellen aus denen die Bereiche in B, C und D ausgewählt wurden.

Maßstab,  $20 \mu\text{m}$ .

In den drei Bereichen zeigte sich (Abbildung 26 B) ein leicht reduzierter Kolo-kalisationsgrad von CRMP-4 und F-Actin. Dies sah man sowohl am Bild der Überlagerung der beiden Kanäle in dem optisch durch die weiß markierten Flächen eine Kolo-kalisation markiert wird, sowie auch an dem ermittelten mittleren Korrelationskoeffizienten von 0,27. Hier zeigte sich deutlich, dass die Kolo-kalisation zwischen CRMP-4 und F-Actin abgenommen hatte. Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) regt die Proteinkinase C zu einer höheren Aktivität an und sollte so ebenfalls für einen höheren Phosphorylierungsgrad beim CRMP-4 sorgen. Die folgende Abbildung zeigt B35-Zellen, die mit Phorbol-12-myristat-13-acetat inkubiert wurden.

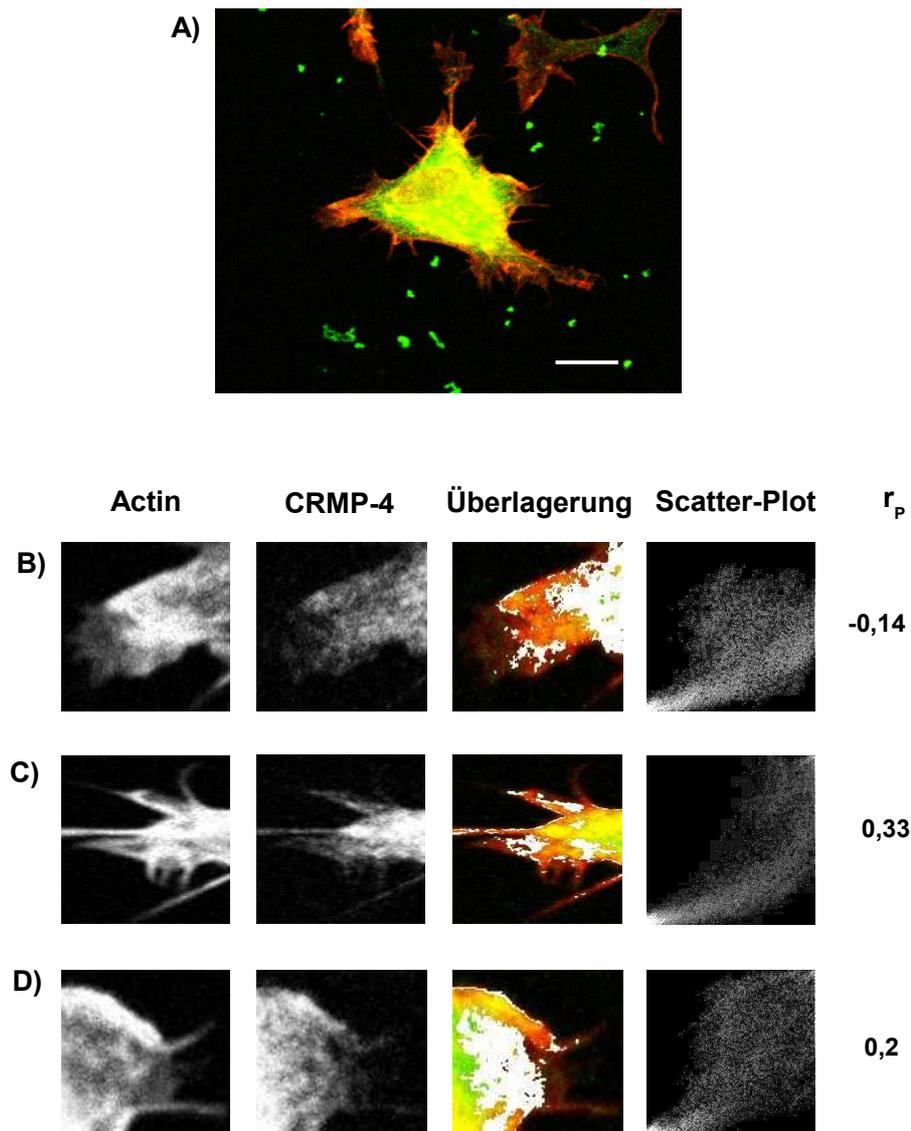


**Abbildung 27: Auswirkung von Phorbol-12-myristat-13-acetat auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin.**

Bereiche aus B35-Zellen, die mit Phorbol-12-myristat-13-acetat, einem Aktivator der Proteinkinase C, inkubiert ( $c = 100 \text{ nM}$ ) wurden ( $t = 2 \text{ h}$ ). A) zeigt eine Übersicht der Zelle, aus der die Bereiche in B) bis D) ausgewählt wurden.  $r_p =$  Pearson's Korrelationskoeffizient. Maßstab,  $20 \mu\text{m}$ .

In diesen drei dargestellten Bereichen ist die Abnahme der Kolokalisation zwischen den beiden Proteinen noch deutlicher zu erkennen als bei der Inkubation mit Dibutyryl-cAMP. Hier zeigt sich gerade in den äußersten Bereichen der Lamellipodienstrukturen eine fast gänzliche Auflösung der Kolokalisation. In den Verbindungen der Ausläufer zum Zellkörper hin kommt es hingegen zu einer Ansammlung des CRMP-4, was die weißen Bereiche in diesen Regionen erklären könnte (Spalte 'Überlagerung' und 'CRMP-4'). Durch die starke Ansammlung von CRMP-4 könnte es zu einer unspezifischen Überlagerung der Signale der einzelnen Proteinen kommen, was aber keiner echten Kolokalisation entsprechen würde. Dafür sprechen auch die niedrigen Korrelationskoeffizienten, die eher einer Kolokalisation widersprechen.

In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen mit Okada-Säure (Abbildung 28), einem potenten Inhibitor von Serin- und Threonin-Protein-Phosphatasen (Protein Phosphatase 1 und 2A) (Cohen und Cohen, 1989) und Phenylarsenoxid (Abbildung 29), einem spezifischen Inhibitor der Protein Tyrosin Phosphatase (PTPase) (Singh und Aggarwal, 1995) inkubiert. Diese beiden Reagenzien unterdrücken die Dephosphorylierung von Proteinen. Dadurch sollte es zu einer Akkumulation von hoch phosphoryliertem CRMP-4 in der Zelle kommen. Die Auswirkungen der Inhibition der Proteinphosphatasen 1 und 2A durch Okada-Säure ist in Abbildung 28 festgehalten.

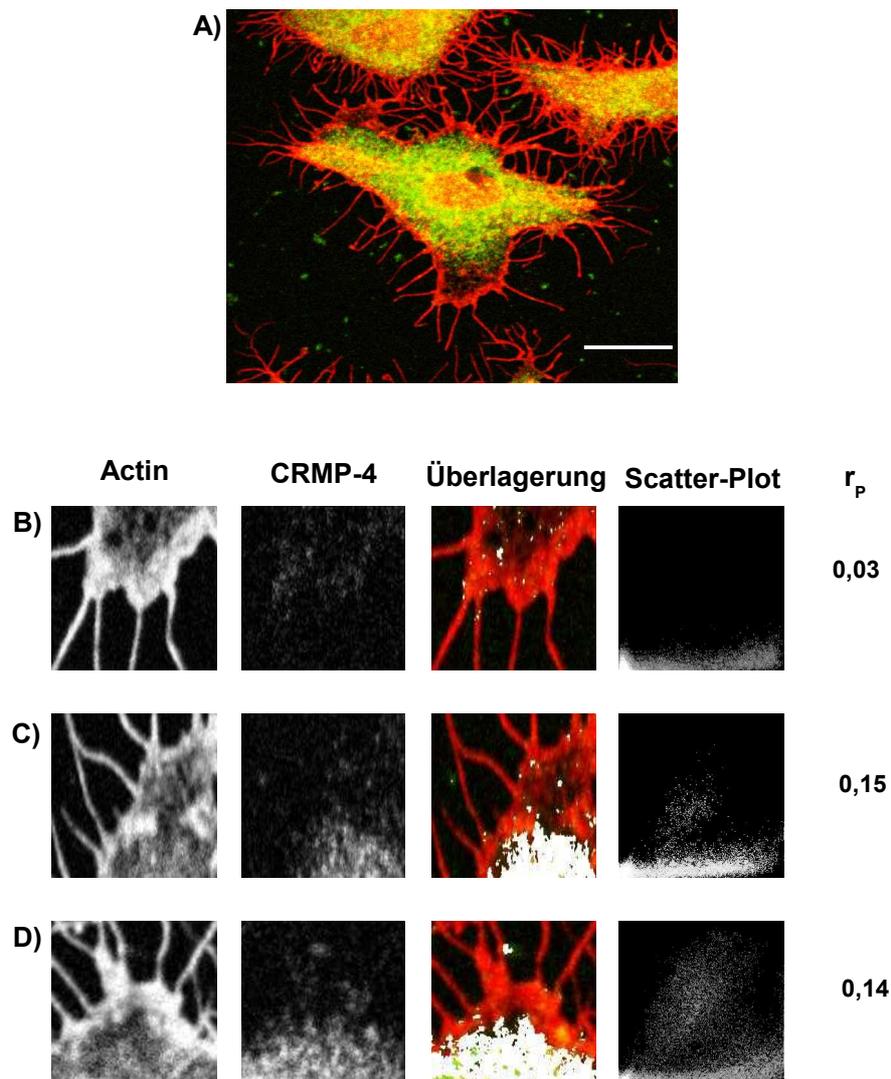


**Abbildung 28: Auswirkung von Okada-Säure auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin.**

(A) Die Abbildung zeigt eine B35-Zelle, die mit Okada-Säure, einem Inhibitor von Serin- und Threonin-Proteinphosphatasen, ( $c = 100 \text{ nM}$ ), inkubiert wurde, ( $t = 2\text{h}$ ) und drei Bereiche aus dieser Zelle, die detaillierter betrachtet wurden (B-D).  $r_p$  = Pearson's Korrelationskoeffizient.

Maßstab,  $8\mu\text{m}$ .

Bei dieser Inkubation zeigt sich ein deutlicher Effekt des Reagens, der sich in einer Reduktion der Kolokalisation des CRMP-4 und des F-Actins äußert. Die ausgewählten Bereiche, in denen die Zelle Lamellipodien hat, weisen keine starke Kolokalisation der beiden Proteine mehr auf. Das CRMP-4 befindet sich hier zwar noch in diesen Bereichen, aber die Bilder der Überlagerung der beiden Kanäle sowie auch die ermittelten Korrelationskoeffizienten sprechen für eine Reduktion der Bindung der beiden Proteine. Die morphologische Struktur der Lamellipodien scheint hier allerdings noch intakt zu sein. Die Reaktion der Zellen bei einer Einwirkung von Phenylarsenoxid, welches die Protein Tyrosin Phosphatase (PTPase) hemmt, zeigt sich in der Abbildung 29.



**Abbildung 29: Auswirkung von Phenylarsenoxid auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin.**

Die Abbildung zeigt eine B35-Zelle, die mit Phenylarsenoxid, einem Inhibitor von Tyrosin-Phosphatasen, ( $c = 100 \mu M$ ) inkubiert wurde, ( $t = 2h$ ) und drei Bereiche aus dieser Zelle, die detaillierter betrachtet wurden (B-D).  $r_p$  = Pearson's Korrelationskoeffizient.

Maßstab,  $16 \mu m$ .

Bei den Zellen, die mit Phenylarsenoxid inkubiert wurden, zeigte sich der drastischste Effekt in deren Morphologie. Der komplette Cortextbereich der Zellen zeigte keine Kolokalisation mehr zwischen dem CRMP-4 und dem F-Actin. Darüber hinaus ist auch eine Umgestaltung der Struktur dieser Zellbereiche zu erkennen, bei der sich anstatt von Lamellipodien Retraktionsfasern gebildet haben, bevor es im weiteren Zeitverlauf zu einem Kollaps des Actincytoskeletts kam. Hier ist also auch eine massive Umgestaltung des Actincytoskeletts sichtbar, die mit einem Verlust der Kolokalisation beider Proteine einhergeht. Eine Kolokalisation ist, wenn überhaupt noch, weit zurückgezogen im Cytoplasma der Zellen zu erkennen, und das CRMP-4 findet man in den Außenbereichen und speziell in den Retraktionsfasern so gut wie gar nicht mehr. Entsprechend gering fallen hier auch die Werte der Korrelationskoeffizienten aus, die den optischen Eindruck eines Verlusts der Kolokalisation unterstreichen. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

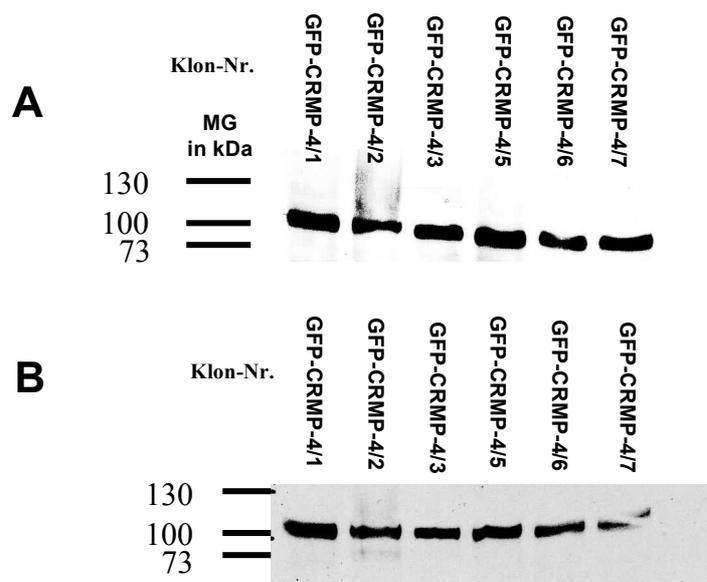
Zusammenfassend läßt sich aus diesen Befunden schließen, dass eine Interaktion von CRMP-4 mit dem F-Actin innerhalb von Zellen unter den Bedingungen erhöhter Proteinphosphorylierung inhibiert sein könnte.

**Tabelle 14: Zusammenstellung der ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson bei der Inkubation von B35-Zellen mit Reagenzien, die die Proteinphosphorylierung beeinflussen.**

| <i>Inkubationsbedingungen für die Zellen</i> | <i>Ermittelter Korrelationskoeffizient nach Pearson <math>r_p</math> für die Kolokalisation zwischen Actin und CRMP-4</i> | <i>Standardabweichung des Mittelwerts</i> |
|--|---|---|
| Kontrolle                                    | 0,38  |   |
|  | 0,63  |   |
|  | 0,46  |   |
|  | Mittelwert  | +/- 0,13                                  |
|  |   |   |
| Dibutyryl-cAMP                               | 0,49  |   |
|  | 0,04  |   |
|  | 0,29  |   |
|  | Mittelwert  | +/- 0,23                                  |
|  |   |   |
| Phorbol-12-myristat-13-acetat                | -0,2  |   |
|  | 0,09  |   |
|  | 0,06  |   |
|  | Mittelwert  | +/- 0,16                                  |
|  |   |   |
| Okada-Säure                                  | -0,14   |   |
|  | 0,33  |   |
|  | 0,2   |   |
|  | Mittelwert  | +/- 0,24                                  |
|  |   |   |
| Phenylarsenoxid                              | 0,03  |   |
|  | 0,15  |   |
|  | 0,14  |   |
|  | Mittelwert  | +/- 0,07                                  |

#### 4.8. Dynamik der Lokalisation von GFP-CRMP-4 in lebenden Zellen

Die bis hierhin aufgezeigte Interaktion des CRMP-4 mit dem Actincytoskelett und die Möglichkeit der Modulation der Affinität dieser beiden Proteine zueinander durch Proteinphosphorylierung läßt eine weitere Frage zu. Könnte das CRMP-4 zelluläre Vorgänge regulieren, bei denen das Actin beteiligt ist? Das Migrationsverhalten einer Zelle ist an den gerichteten Umbau seines Cytoskeletts gekoppelt und bei einer direkten Interaktion zwischen dem CRMP-4 und dem F-Actin liegt der Schluß nahe, dass das CRMP-4 einen Einfluß auf das Migrationsverhalten von Zellen durch die Organisation des Cytoskeletts nehmen kann. Deshalb untersuchten wir die Verteilung von CRMP-4 in lebenden Zellen während der Zellmigration. Um dies zu tun, wurde ein N-terminal markiertes GFP-CRMP-4 Fusionsprotein konstruiert. Nach der stabilen Expression dieses Fusionsproteins in HEK293-Zellen wurde eine Westernblotanalyse von einem Lysat der Zellen durchgeführt, und es zeigte sich eine einzelne Proteinbande mit dem zu erwartenden Molekulargewicht des Konstrukts (Abbildung 30 A und B).

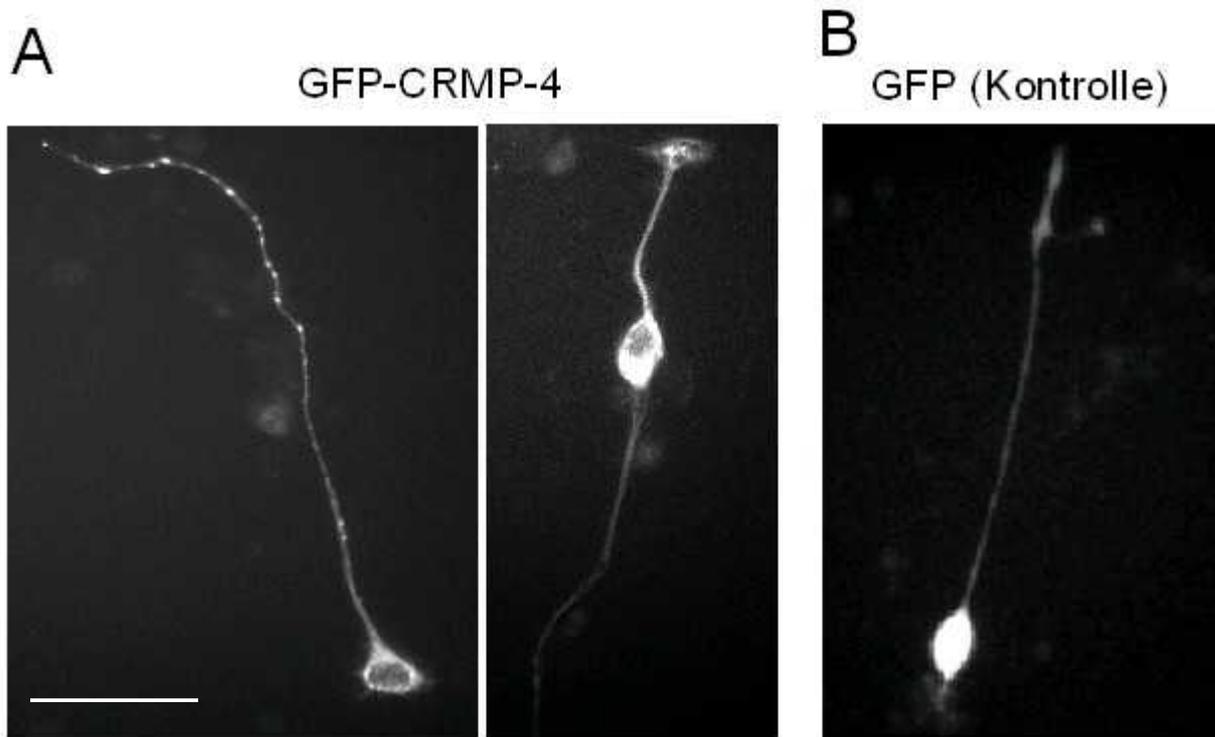


**Abbildung 30: Westernblot-Analyse des GFP-CRMP-4 Fusionsproteins.**

Einzelne Klone von stabil mit GFP-CRMP-4 transfizierten HEK 293-Zellen wurden lysiert und das Lysat auf ein PAA Gel aufgetragen. Die Gele wurden geblottet und mit entsprechenden Antikörpern inkubiert. A) Inkubation mit anti CRMP-Familien-Antikörper ( $V = 1 : 10.000$ ) B) Inkubation mit anti GFP-Antikörper ( $V = 1 : 5000$ ) Beide Blots zeigen die erwarteten Banden beim Molekulargewicht von etwa 100 kDa das sich aus der Summe der Molgewichte von GFP und CRMP-4 ergibt.

Nach transientscher Expression des GFP-CRMP-4 Fusionsproteins in corticalen Neuronen wurde ein punktiertes Verteilungsmuster dieses Proteins entlang von Neuriten und in Wachstumskegeln in den Zellen gefunden (Abbildung 31 A), wie es auch die Färbung des endogenen CRMP-4

(Abbildung 9 A und C) (Rosslenbroich *et al.*, 2003) zeigte. Dieses Muster steht in klarem Kontrast zu dem homogen verteilten GFP in Kontrollzellen (Abbildung 31 B).



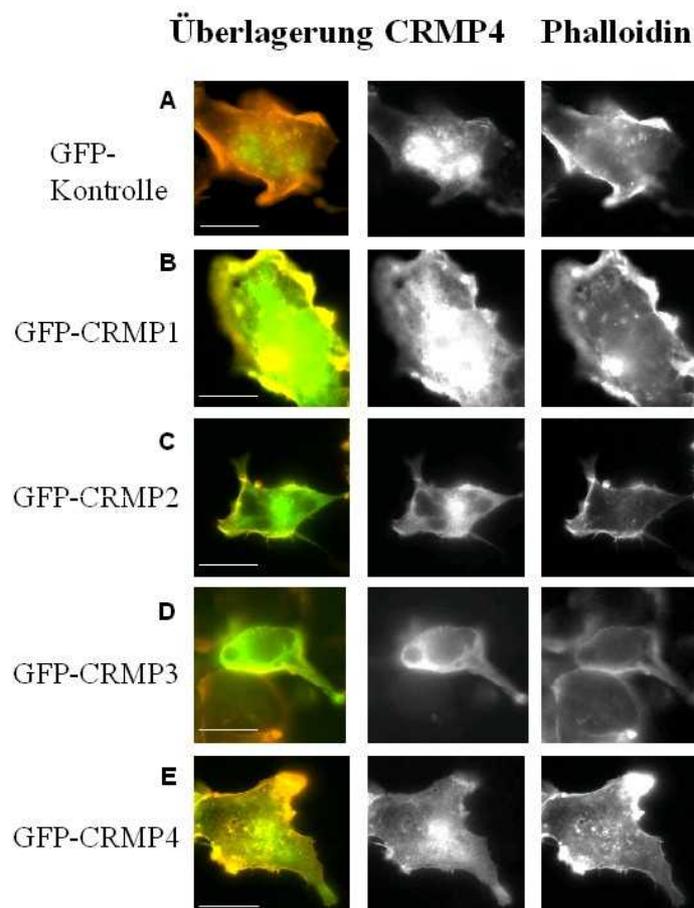
**Abbildung 31: Expression von GFP-CRMP-4 in corticalen Neuronen.**

Transiente Transfektion von corticalen Neuronen. (A) Primäre neokortikale Neurone wurden transient mit GFP-CRMP-4 und (B) GFP (Kontrolle) transfiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Maßstab, 50 µm.

Des weiteren zeigte sich auch eine Kollokalisierung von GFP-CRMP-1 und GFP-CRMP-4 mit F-Actin in Ntera2-Zellen (Abbildung 32 B und E). Dort war die Kollokalisierung am deutlichsten in Lamellipodien zu sehen. Für das GFP-CRMP-2 und GFP-CRMP-3 zeigten sich kleinere Bereiche von Kollokalisierung an einigen Stellen an den Rändern der Zellen. Diese Bereiche waren jedoch nicht so ausgeprägt wie bei CRMP-1 und CRMP-4 (Abbildung 32 C und D). Die geringe Effizienz der Transfektionen primärer Neuronen (Effizienz < 0,1% transfizierter Zellen) schloß die systematische Erhebung von Daten dieser Art bei den Neuronen leider aus. Nachdem GFP-CRMP-4 in B35-Neuroblastomzellen exprimiert werden konnte (Abbildung 33 A und B), wurden diese Zellen weitergehend benutzt, um die zelluläre Lokalisation des GFP-CRMP-4 Fusionsproteins zu untersuchen. Die B35-Neuroblastomzellen bilden ein sehr gutes Zellkultursystem für Neurone des zentralen Nervensystems. Sie eignen sich gut, um an ihnen Zellmotilität und Neuritenwachstum zu studieren (Otey *et al.*, 2003). Daher erschien uns diese Zelllinie geeignet, um Veränderungen in der Verteilung des GFP-CRMP-4 Proteins in Zusammenhang mit der Umorganisation des

Actincytoskeletts zu beobachten. Zeitrafferaufnahmen einzelner Zellen in hoher Vergrößerung zeigten, dass das GFP-CRMP-4 sich im Leitsaum von Zellen an bestimmten Orten lokal ansammelte (Abbildung 33 A; ausgefüllte Pfeile) und dass es in entstehenden Lamellipodien in bündelartigen Strukturen akkumuliert wurde (Abbildung 33 B; offene Pfeile). Die Inkubation von lebenden B35-Neuroblastomzellen mit Latrunculin A hatte einen raschen Verlust von bündelartigen Strukturen von GFP-CRMP-4 zur Folge (schon nach 40 Sekunden; Abbildung 33 B). Die Kolokalisation von GFP-CRMP-4 mit F-Actin in B35-Neuroblastomzellen wurde nach der Fixierung der Zellen und anschließender Färbung mit TRITC-markiertem Phalloidin bestätigt (Abbildung 33 C).

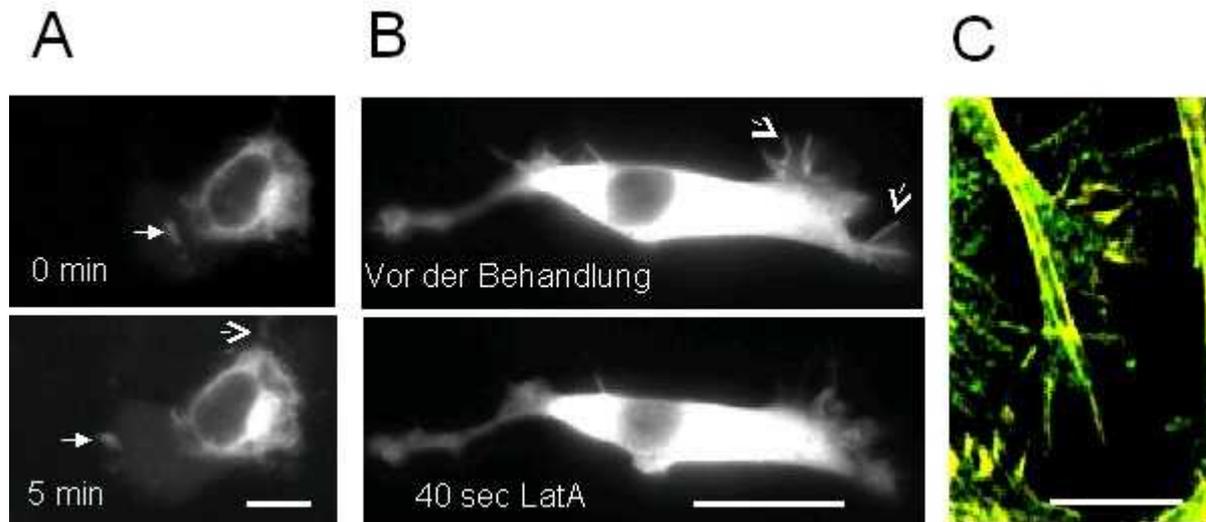


**Abbildung 32: Expression von GFP-CRMP-Fusionsproteinen in NTera2-Zellen.**

Die Abbildung zeigt mit GFP (A) und GFP-CRMP-Fusionsproteinen (B-E) transfizierte NTera2-Zellen, bei denen das Actincytoskelett mit Phalloidin-TRITC gefärbt wurde. Bei der Überlagerung der beiden Kanäle zeigen sich beim CRMP-1 und auch beim CRMP-4 Regionen, in denen die beiden Proteine kolokalisieren.

Maßstab, 20 µm.

Genauso wie in primären Neuronen wurde CRMP-4 entlang von Actinfilamenten und in Microspikes nachgewiesen. Als zusätzliche Kontrolle wurden Zellen auch für eine Minute mit dem Mikrotubuli depolymerisierenden Reagenz Nocodazol behandelt. Dabei zeigte sich innerhalb des kurzen Zeitraums keine erkennbare Änderung der Verteilung von GFP-CRMP-4 in den Zellen. Wir schließen aus diesen Beobachtungen, dass die Störung des Actincytoskeletts spezifisch die Verteilung von CRMP-4 in migrierenden Zellen beeinflusst.



**Abbildung 33: Dynamische Umverteilung von GFP-CRMP-4-Fusionsprotein in lebenden Zellen.**

A) Zeitraffer-Videomikroskopie von B35-Neuroblastomzellen, die GFP-CRMP-4 exprimieren. Es zeigt sich eine dynamische Anreicherung des Fusionsproteins am Leitsaum der Zellen und deren Filopodien (siehe Pfeile). Maßstab, 10  $\mu\text{m}$ .

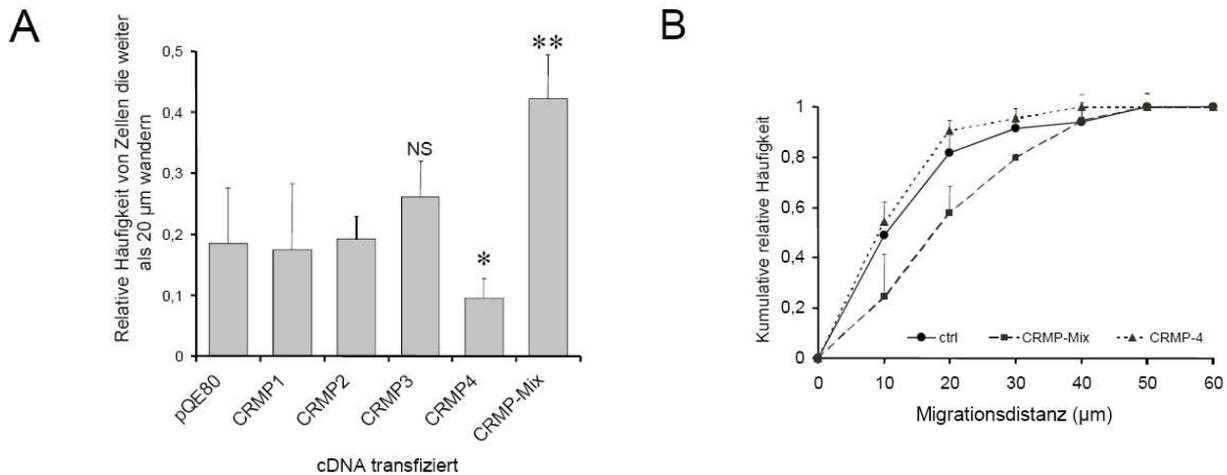
B) Behandlung von lebenden Zellen mit Latrunculin A. B35-Neuroblastomzellen, die transient GFP-CRMP-4 exprimierten wurden mit Latrunculin A behandelt und Zeitraffer-Videomikroskopie-Aufnahmen gemacht. Es zeigt sich das Verschwinden von GFP-CRMP-4 aus den Mikrospikes (Pfeile) nach etwa 40 sek.. Maßstab, 20  $\mu\text{m}$ .

C) Kontrolle nach der Fixierung und Färbung mit Phalloidin-TRITC. Überlagerungsbild von B35-Neuroblastomzellen, die transient CRMP-4 exprimieren, nach der Fixierung. Es wurde gegen CRMP-4 (grün) und F-Actin (rot) gefärbt. Das Bild zeigt eine Z-Stapel Analyse, bearbeitet mit 3D-Dekonvolution (iterativer Algorithmus), um die Auflösung der Actinfasern zu optimieren. Maßstab, 10  $\mu\text{m}$ .

#### **4.9. Die Modulation der Migration von B35-Neuroblastomzellen durch CRMPs**

Wir zeigten mit den vorangegangenen Experimenten, dass CRMP-4 mit dem Actincytoskelett assoziiert ist und dass es auch der Dynamik dieses Cytoskelettelements folgt, wenn eine Zelle ihre Gestalt verändert oder aktiv einen Ortswechsel durchführt. Eine weitergehende Frage in die Richtung der Funktion des CRMP-4 lautete, ob dieses Protein einen Einfluß auf die Bewegungen einer Zelle hat. Als einen funktionellen Ansatz, um den Einfluß der CRMPs auf die Dynamik des

Actincytoskeletts in lebenden Zellen quantitativ zu untersuchen, betrachteten wir die Migration von B35-Neuroblastomzellen mit Hilfe von Zeitraffer-Video-Mikroskopie. Die Zellen wurden dazu transient mit CRMP cDNAs in Kombination mit GFP cDNA zur Markierung transfiziert und dann beobachtet. Unter diesen Bedingungen exprimierte nur ein geringer Anteil von 23% der Zellen nur eines der beiden Plasmide. 77 % der GFP exprimierenden Zellen hatten demnach auch den CRMP exprimierenden Vektor aufgenommen und konnten für die Auswertung herangezogen werden. Wir führten transiente Transfektionen durch, weil bei stabil transfizierten Klonen die Gefahr besteht, Klone auszuwählen, die fixierte somatische Mutationen tragen, welche die Migration beeinflussen. Um die Migrationsdistanzen zu messen, wurde die Distanz zwischen der Position einer Zelle im ersten und letzten Bild einer Aufnahmesequenz für alle im Bildausschnitt fluoreszierenden Zellen (im Durchschnitt 20 Zellen pro Gesichtsfeld) mit Hilfe der Messfunktion des Axiovisionprogramms ermittelt. Die Verteilung der Migrationsgeschwindigkeiten war bei wiederholter Versuchsdurchführungen gut reproduzierbar. Interessanterweise inhibierte die Überexpression von CRMP-4 leicht die Zellmigration, wenn man Zellen betrachtete, die in diesem Test die Migrationsdistanz von 20  $\mu\text{m}$  überschritten, verglichen mit den Kontrollzellen, die nur mit dem GFP-Kontrollplasmid transfiziert worden waren (Abbildung 34 A\*). Dagegen schien CRMP-3 die Zellmigration leicht zu fördern (Abbildung 34 A), wobei das Ergebnis allerdings statistisch nicht signifikant war. CRMP-1 und CRMP-2 beeinflussten das Wanderungsverhalten der Zellen nicht (Abbildung 34 A). Die Transfektion einer Kombination von CRMP-1, -2, -3 und -4 erhöhte die Anzahl der Zellen, die weiter als 20  $\mu\text{m}$  wanderten um mehr als das Doppelte als unter Kontrollbedingungen (Abbildung 34 A\*\*). Ebenso wurde die Distanzverteilung der Zellpopulation in Richtung höherer Werte hin verschoben und der Mittelwert der Migrationsdistanzen wurde um beinahe 50% erhöht (Abbildung 34 B). Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Überexpression von CRMP-4 die Zellmigration der B35-Neuroblastomzellen inhibierte, wohingegen die Transfektion einer Kombination aus den vier verschiedenen CRMPs die Einzel-Zell-Migration der Zellen aus der B35-Population förderte. Dies sind Hinweise darauf, dass CRMPs die Zellmigration modulieren. Dies geschieht abhängig von ihrer jeweiligen Konzentration und Kombination.



**Abbildung 34: Einzelzell-Migration von B35-Neuroblastomzellen nach Transfektion mit CRMP-cDNAs.**

A) Relative Häufigkeiten von Migrationsdistanzen, welche die halbmaximale Distanz von 20 µm nach der transienten Kotransfektion von B35-Neuroblastomzellen mit CRMP-cDNAs und GFP-cDNAs (als Marker) überschritten. Die Balken zeigen die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten (Kontrolle, CRMP-1: n = 4; CRMP-2,-3,-4 und -Mix: n = 3; die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung). Der  $\chi^2$ -Test (Untersuchung der Häufigkeiten gegenüber der erwarteten Werte berechnet aus den zusammen genommenen Einzeldaten) zeigte im Vergleich zur Kontrolle (pQE80) signifikante Abweichungen für CRMP-4 (\*  $p < 0,025$ ) und den CRMP-Mix (\*\*  $p < 0,001$ ). Die anderen Bedingungen zeigten keine signifikanten Abweichungen von den erwarteten Häufigkeiten (N.S., nicht signifikant).

B) Kumulative Verteilungen der relativen Häufigkeiten für die Migrationsdistanzen. Gezeigt sind diese hier für Transfektionen mit Expressionsvektor ohne Insert (Kontrolle; ●), CRMP-4; (■) und den CRMP-Mix (▲). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen.



## 5. Diskussion

### 5.1. *Collapsin Response Mediator Proteine und Lipid Rafts*

Goshima et al. (1995) haben gezeigt, dass Mitglieder der CRMP-Familie in sensorischen Neuronen vorhanden sein müssen, damit Semaphorin 3A einen Wachstumskegel-Kollaps auslösen kann (Goshima et al., 1995). Es wurde damit die notwendige Beteiligung von CRMPs an diesem Semaphorin 3A Signaltransduktionsweg nachgewiesen. Zu Beginn unserer Experimente stellten wir die Frage, auf welche Weise CRMPs direkt mit der Plasmamembran in Kontakt treten, da dies die Voraussetzung für eine Interaktion mit membranständigen Rezeptoren wie zum Beispiel dem Semaphorin 3A Rezeptorkomplex darstellt. Alle Vertreter der CRMP-Familie werden aufgrund ihrer Sequenzen als cytosolische Proteine betrachtet. Die Untersuchungen von Homogenaten des Gehirns neugeborener Ratten durch subzelluläre Fraktionierung und Westernblotting zeigten, dass alle CRMPs zu diesem Entwicklungszeitpunkt exprimiert wurden und einerseits als cytosolische Proteine vorlagen, andererseits aber auch an Zellmembranen gefunden werden konnten (Abbildung 6). Die Expression der CRMPs zu diesem Zeitpunkt steht im Einklang mit den Publikationen anderer Arbeitsgruppen (Byk et al., 1998; Horiuchi et al. 2000; Wang et al., 1996; Inatome et al., 2000; Arimura et al., 2000; Minturn et al., 1995). Außerdem ist bekannt, dass CRMPs in der löslichen Fraktion und auch in der Membranfraktion vorkommen (Byk, et al., 1996). Aufgrund der hier getesteten Extrahierbarkeit der CRMPs mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 konnten aber über die Literatur-Daten hinausgehende Abschätzungen über die Affinität der Assoziation von CRMPs mit zellulären Membranen gemacht werden. Es zeigte sich, dass alle CRMPs nur partiell durch eine Detergenz-Extraktion der Membranfraktion bei 4°C freigesetzt werden konnten. Die solubilisierten Anteile lagen zwischen 30% und 50% (Abbildung 6; Abbildung 7). Nach der stringenteren Extraktion bei 37°C wurden bei allen CRMPs nochmals ein Anteil zwischen 20% und 30% der Immunreaktivität freigesetzt. Ein Vergleich dieser Werte mit der Aktivität der Lactatdehydrogenase als cytosolisches Markerenzym in den einzelnen Fraktionen zeigte, dass es sich bei den ermittelten Werten nicht um die Folge einer generellen Kontamination der Membranfraktion mit löslichen Proteinen handelte (Abbildung 7 F). Folglich kommen alle CRMPs als membranassoziierte Proteine vor und sind darüber hinaus partiell resistent gegenüber einer Extraktion mit einem nicht-ionischen Detergenz in der Kälte. Es stellte sich die Frage, wie dieses Verhalten erklärt werden kann. Eine Möglichkeit, warum sich ein Protein resistent

gegenüber einer Triton X-100 Extraktion zeigen kann, besteht darin, dass eine Assoziation mit Cytoskelettfasern wie Mikrotubuli oder F-Actin besteht (*Simons und Toomre, 2000; Sawada und Sheetz, 2002*). Für CRMP-1, CRMP-2, CRMP-3 und CRMP-4 wurde eine Interaktion mit Tubulin-Heterodimeren nachgewiesen (*Fukata et al., 2002*). Diese Interaktionen könnten zu einer Bindung an Mikrotubuli führen. Entsprechend wurde eine Kolo-kalisation eines GFP-CRMP-2-Fusionsproteins mit Mikrotubuli nachgewiesen (*Fukata et al., 2002*), was mit einer Detergenz-Resistenz dieses Proteins im Einklang stünde. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht aber darin, dass CRMPs an Lipid Rafts gebunden sein könnten (*Simons und Toomre, 2000*).

Lipid Rafts sind Strukturen, die sich aufgrund ihres biochemischen und biophysikalischen Verhaltens definieren lassen. Neben der Resistenz gegen Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien in der Kälte ist ihre geringe Schwimmdichte während einer Dichtegradienten-Zentrifugation ein wichtiges operationales Kriterium. Lipid Rafts sammeln sich aufgrund ihrer spezifischen Zusammensetzung in den oberen Gradientenschichten mit geringer Dichte. Außerdem zeigen mit Lipid Rafts assoziierte Moleküle immuncytochemisch oft ein charakteristisches gepunktetes Muster. Tatsächlich zeigten Westernblot-Analysen der Fraktionen einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von Gehirnextrakten eine verschieden starke Assoziation von CRMP1, -3 und -5 mit Lipid Rafts (Abbildung 8). Außerdem ist CRMP-4 mit Rafts assoziiert (*Rosslénbroich et al. 2003*). Nur CRMP-2 wurde nicht in den Raft Fraktionen gefunden (Abbildung 8 F), obwohl es sich partiell resistent gegenüber der Extraktion mit Triton X-100 im Kalten zeigte (Abbildung 6 B). Es ist nicht auszuschließen, dass CRMP-2 mit niedriger Affinität an Rafts bindet, weil Rafts, die mit Hilfe einer Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation präpariert werden, an Proteinen verarmen, die schnell von Rafts abdissoziieren (*Simons und Toomre, 2000*). Eine labile Interaktion von CRMP-2 mit Lipid Rafts ist daher nicht ausgeschlossen. Andererseits ist gezeigt worden, dass die Verbindung von Rezeptoren oder Rezeptorkomplexen mit Lipid Rafts eher leicht sein können, solange kein extrazellulärer Ligand an den Rezeptor bindet. Beim Zusatz von extrazellulären Leitmolekülen könnte diese Bindung dann aber verstärkt werden (*Guirland et al., 2004*). Da im durchgeführten Versuchsansatz kein Semaphorin 3A zugefügt wurde, könnte dies auch eine Erklärung für die schwache Interaktion des CRMP-2 mit Rafts sein. Auf der anderen Seite könnte die Assoziation von Proteinen mit Cytoskelettelementen, wie zum Beispiel die nachgewiesene Interaktion von CRMP-2 mit Tubulin (*Fukata et al., 2002*), der Grund für seine Detergenz-Resistenz sein (*Simons und Toomre, 2000; Sawada und Sheetz, 2002*). Außerdem könnte CRMP-2 gleichzeitig mit Mikrotubuli und mit Lipid Rafts assoziiert sein. In diesem Fall würde auch Raft-assoziiertes CRMP-2 in das Pellet gezogen werden (*Simons und Toomre, 2000*). Im Fall des CRMP-4 konnte dessen Assoziation mit Lipid Rafts auch durch immuncytochemische

und zellbiologische Daten weiter untermauert werden. Immunocytochemisch war CRMP-4 in den Perikaryen der corticaler Neuronen in einer diffusen Verteilung nachweisbar (Abbildung 9 A und D), während Neuriten, Wachstumskegel und deren Filopodien kleine, punktierte Ansammlungen von CRMP-4 zeigten (Abbildung 9A, C und D; Abbildung 12). Dieses punktierte immunocytochemische Muster von CRMP-4 ist mit einer Assoziation dieses Proteins mit Lipid Rafts gut vereinbar. Die These der Verbindung von CRMP-4 mit Lipid Rafts wurde durch weitere zellbiologische Experimente mit corticalen Neuronen gestützt. Dabei gingen wir davon aus, dass im Fall einer Assoziation von CRMP-4 mit Lipid Rafts die Zerstörung von Rafts zu einer Störung der charakteristischen immunocytochemischen Verteilung von CRMP-4 führen müsste. Lipid Rafts lassen sich auflösen, wenn man Cholesterol als essentiellen Strukturbestandteil entfernt. Ein Reagenz, das für diese Aufgabe vornehmlich eingesetzt wird, ist das Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (Harder *et al.*, 1998; Kilsdonk *et al.*, 1995). Cyclodextrine besitzen aufgrund ihrer Molekülstruktur einen hydrophoben Hohlraum, der es ihnen erlaubt, andere hydrophobe Moleküle einzukapseln und so zu solubilisieren. In diesem Hohlraum kann auch das hydrophobe Molekül Cholesterol eingelagert werden und dann aus der Zellmembran entfernt und abtransportiert werden. Durch die Entfernung von Cholesterol aus den Lipid Rafts werden diese Strukturen zerstört. Nach der Inkubation corticaler Neurone mit 5 mM Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin zeigte sich das CRMP-4 umverteilt zu größeren Ansammlungen entlang von Neuriten. Das spricht dafür, dass die punktierte CRMP-4 Färbung auf einer Assoziation des Proteins mit Lipid Rafts beruht (Abbildung 10). Eine weitere Beobachtung war, dass die Zerstörung des Lipidgerüsts von Lipid Rafts einen Zusammenbruch von Wachstumskegeln in den Kulturen von corticalen Neuronen (Abbildung 11) nach sich zog. Daraus ist zu schließen, dass Lipid Rafts für eine intakte Struktur und Funktion von Wachstumskegeln corticaler Neurone essentiell sind.

Unsere Vermutung, dass Lipid Rafts eine wichtige Bedeutung für die Wachstumskegel besitzen, wird durch mehrere Veröffentlichungen unterstützt. So führt eine selektive Inaktivierung von einzelnen Rafts in der Zellmembran von Wachstumskegeln durch sogenannte Chromophore-assisted Laser Inactivation (sog. Micro-CALI-Methode) zu einer veränderten Motilität von Wachstumskegeln (Nakai *et al.*, 2002). Die Bewegung von Wachstumskegeln cerebellärerer Körnerzellen in Abhängigkeit von L1 und N-CAD wurde durch Micro-CALI von GM1-Gangliosiden und durch Cholesterol-Extraktion spezifisch gehemmt (Nakai *et al.*, 2002). Die Wirkung äußerte sich in einer herabgesetzten Fortbewegungsgeschwindigkeit der geschädigten Wachstumskegel und in einer Umorganisation ihres Cytoskeletts. Dabei war eine Umstrukturierung von Lamellipodien zu Filopodien zu beobachten. Darüber hinaus wurde in einer jüngeren Publikation gezeigt, dass die Inhibition des Axonwachstums, die Repulsion des Wachstumskegels

und der Wachstumskegelkollaps durch die Einwirkung von Semaphorin 3A auf embryonale Motoneurone des Krallenfroschs von intakten Lipid Rafts abhängig sind und durch die Behandlung der Zellen mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin blockiert werden können (*Guirland et al., 2004*). Interessanterweise zeigt auch die Bindung eines GFP-Sema 3A Fusionsproteins an die Oberfläche von corticalen Neuronen ein für Rafts charakteristisches gepunktetes Muster (*De Wit et al., 2005*).

Lipid Rafts bilden Mikrodomänen der Plasmamembran, an denen bestimmte, funktionell zusammenwirkende Proteine angereichert werden können. Auf diese Weise können Rafts an der Signaltransduktion mitwirken (*Simon und Toomre, 2000*). Eine solche Funktion wurde für den T-Zell-Rezeptorkomplex herausgearbeitet. Lipid Rafts könnten für den Semaphorin 3A Rezeptorkomplex eine ganz ähnliche Bedeutung besitzen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass das Zelladhäsionsmolekül L1, welches Bestandteil des Semaphorin 3A Rezeptor-Komplexes ist, in cerebellären Raft-Fractionen von neugeborenen Mäusen vorkommt (*Nakai et al., 2002*). Außerdem wurde für den Semaphorin 3A Rezeptor Plexin A2 gezeigt, dass er mit den nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen Fyn und Fes interagiert (*Sasaki et al., 2002*). Tyrosinkinasen der Src-Familie wie Fyn besitzen typischerweise eine Affinität zu Lipid Rafts (*Simons et al., 2000*). Darüber hinaus wurde die kleine Rho GTPase Rac1, welche das Cytoskelett auf Reize von Semaphorin 3A hin reguliert (*Jin et al., 1997*), in Rafts aus Rattenhirnen gefunden (*Kumanogoh et al., 2001*). Insgesamt kann man diese Beobachtungen dahingehend zusammenfassen, dass das Zusammenspiel zwischen Semaphorin 3A, seinem Neuropilin/Plexin/L1-Rezeptorkomplex, assoziierten cytosolischen Kinasen und CRMPs an Lipid Rafts stattfindet. Lipid Rafts bilden Mikrostrukturen der Plasmamembran, die eine lokalisierte Aktivierung von Signaltransduktionswegen nach Stimulation durch Axon-guidance Molekül-Proteine wie das Semaphorin 3A ermöglichen könnten. Die Rafts fungieren als Sammelpunkte von Komponenten von Signaltransduktionswegen, die sich an diesen Plattformen gruppieren, um funktionelle Komplexe an einer definierten subzellulären Lokalisation zu formen (*Nakai et al., 2002; Guirland et al., 2004*). CRMPs sind notwendige Komponenten des eng verknüpften und verwobenen Netzwerks von Signalmolekülen, welches die Rezeptoren von Führungsmolekülen für die Navigation von Zellen oder Wachstumskegeln mit dem Cytoskelett verbindet (*Song und Poo, 2001*). Die Anreicherung von CRMP-1,-3,-4 und CRAM in Lipid Rafts, bettet diese Proteine in ein Umfeld ein, das mit spezifischen Signalproteinen und Cytoskelettelementen (siehe unten) angereichert ist (*Simons et al., 2000*). Wahrscheinlich finden CRMPs sich als lösliche Proteine unter bestimmten Bedingungen an der Membran ein und assoziieren mit Lipid Rafts, um ihre Rolle bei der Signalübertragung wahrnehmen zu können. Diese Kompartimentierung von CRMPs an den Lipid Rafts könnte zur räumlichen Organisation der Signalübertragung innerhalb von Wachstumskegeln beitragen.

## 5.2. Collapsin Response Mediator Protein-4 und F-Actin

Es wurde in der Literatur beschrieben, dass auch Cytoskelettproteine mit Lipid Rafts assoziieren können. Actin und Tubulin kofraktionieren beispielsweise mit Rafts aus Rattenhirn (*Maekawa et al., 1997*) und das Actin spaltende Protein Gelsolin wurde ebenfalls als eine Komponente von Lipid Rafts identifiziert (*Funatsu et al., 2000*). Dies zeigt, dass nicht nur die Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle für Semaphorin 3A in Rafts angereichert sind, sondern auch die cytoskelettalen Effektoren, die am Wachstumskegelkollaps beteiligt sind. Bei diesem spielt besonders das Actincytoskelett eine wichtige Rolle. Dies wirft die Frage auf, ob CRMPs und insbesondere das CRMP-4 einen direkten Einfluß auf das Actincytoskelett nehmen. In corticalen Neuronen fand sich eine Kolokalisation des endogenen CRMP-4 mit F-Actin (Abbildung 9 und 12). Darüber hinaus bestand eine deutliche Kolokalisation der GFP-Fusionsproteine mit CRMP-1 und mit CRMP-4 mit dem F-Actin in Ntera2-Zellen (Abbildung 32) und in B35-Neuroblastomzellen zeigte das GFP-CRMP-4 Fusionsprotein Kolokalisation mit F-Actin in bündelartigen Strukturen (Abbildung 33). In lebenden B35-Zellen war ebenfalls eine bündelartige Anreicherung von GFP-CRMP-4 in motilen Strukturen deutlich sichtbar (Abbildung 33). Nach der Mikroinjektion von CRMP-4 in Hela-Zellen kolokalisierte das Protein mit F-Actin, aber es rief keinen Kollaps des Cytoskeletts hervor und führte auch nicht zu einer erhöhten Bildung von Filopodien (Abbildung 20). Unsere Beobachtungen der Kolokalisation von CRMP-4 mit F-Actin stehen im Einklang mit vorhergehenden Berichten anderer Gruppen (*Minturn et al., 1995; Yuasa-Kawada et al., 2003*). Der Befund einer Kolokalisation zwischen CRMP-4 und F-Actin wurde durch Studien mit der F-Actin-depolymerisierenden Substanz Latrunculin A bestätigt. Nach der Zerstörung des F-Actin Gerüsts fanden wir eine Reduktion der Kolokalisation zwischen CRMP-4 und Actin, und an der lebenden Zelle kam es zum Verlust bündelartiger GFP-CRMP-4 Strukturen nach kurzzeitiger Inkubation mit Latrunculin A.

Für die Kolokalisation von CRMPs mit Mikrofilamenten sind zwei Gründe denkbar: entweder besteht eine direkte Bindung der beiden Proteine aneinander, oder es handelt sich um eine indirekte Interaktion, die durch andere Proteine vermittelt wird. Auf der Grundlage von *in vitro* Kosedimentations-Experimenten konnte in dieser Arbeit erstmals eine direkte Interaktion zwischen F-Actin und CRMP-4 bewiesen werden (Abbildung 21). Bei diesen Experimenten wurde Actin polymerisiert, mit rekombinantem CRMP-4 gemischt und dann bei 15.000 x g zentrifugiert. Da in diesem Test CRMP-4 zusammen mit F-Actin sedimentierte, muß eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen stattfinden. Interessanterweise zeigt das C-terminal verkürzte CRMP-4 Fragment mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 55kDa keine Kosedimentation (*Rosslbroich et al., 2005; Dai Dissertation, 2005*). Nach Färbung der Präparate mit Phalloidin-TRITC zeigte sich nur in Gegenwart von CRMP-4 eine ausgeprägte Bündelung des F-Actins. Daraus ist zu schließen, dass

das CRMP-4 nicht nur die Eigenschaft besitzt, an F-Actin zu binden, sondern auch die Bildung von F-Actin Strukturen einer höheren Organisationsform fördert. Die quantitative Auswertung der Kosedimentationsstudien lieferte eine scheinbare Dissoziationskonstante der F-Actin-CRMP-4 Interaktion von  $K_D = 1,37 \mu\text{M}$ . Nach dieser Auswertung bestand im CRMP-4-F-Actin-Komplex eine 1:1 Stöchiometrie. Für die anderen im F-Actin Kosedimentations-Test von uns untersuchten CRMPs ergaben sich keine Hinweise auf eine Bindung an F-Actin. Ebenso haben Yuasa-Kawada et al. 2003 keine direkte Interaktion zwischen CRMP-2 und F-Actin nachweisen können. Für CRAM/CRMP-5 wurde vor kurzem gezeigt, dass dieses Protein an der Bildung von Filopodien beteiligt ist (*Hotta et al., 2005*), die ebenfalls gebündeltes F-Actin enthalten. Eine direkte Interaktion von CRAM/CRMP-5 mit F-Actin wurde bislang aber noch nicht nachgewiesen. CRMP-4 ist bisher das einzige Protein seiner Proteinfamilie, für das eine Bindung an F-Actin und die Bündelung von F-Actin gezeigt werden konnte.

Actin-bündelnde Proteine sind allgemein dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens zwei Actin-bindende Domänen besitzen, die über einen kurzen Abstand starr miteinander verbunden sind. Die Tabelle 15 gibt einen Überblick über wichtige Vertreter dieser Proteinklasse. Es ist hervorzuheben, dass die von uns ermittelte scheinbare Gleichgewichtskonstante der Bindung von CRMP-4 an F-Actin in demselben Konzentrationsbereich liegt, wie er auch für die Dissoziationskonstanten der in der Tabelle genannten Proteine angegeben wurde (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Übersicht actinbündelnder Proteine.

| <i>Protein</i>    | <i>Struktur, Di-Oligomerisierung</i> | <i>Isoformen (Vorkommen)</i>   | <i>Dissoziationskonstante <math>K_D</math></i> |
|-------------------|--------------------------------------|--|--|
| $\alpha$ -Actinin | 2x 100 kDa Dimer                     | Actinin-1 (fokale und Adhäsive Kontakte)<br>Actinin-2<br>Actinin-3<br>Actinin-4 (stark konzentriert am „leading edge“ von motilen Zellen)<br>(Honda, 2005) | 0,6-4,7 $\mu$ M<br>(Wachsstock et al., 1993)   |
| Espin             | 110 kDa Monomer                      | Small Espin<br>(Bartles, 1998)<br>SC Espin<br>(Bartles, 1996)  | 70 nM<br>(Chen et al., 1999)                   |
| Fascin            | 55 kDa Monomer                       | Fascin-1 (mesenchymales Gewebe, Nervensystem)<br>Fascin-2 (Photorezeptoren)<br>Fascin-3 (Testes)   | 1,1 $\mu$ M<br>(Yamakita et al., 1996)         |
| Fimbrin           | 68 kDa Monomer                       | I-Fimbrin (Bürstensaum des intestinalen und renalen Epithels)<br>T-Fimbrin (solide Gewebe)<br>L-Fimbrin (hämatopoetisches System)                          | 100 nM<br>(Oshawa et al., 2004)                |
| MIM               | 37 kDa Monomer                       | MIM (Lee, 2002)<br>MIM-B (Woodings, 2003)<br>(Basalkarzinomzellen, Blasenkarzinomzellen)<br>(Callahan, 2004)   | 0,5 $\mu$ M<br>(Gonzalez-Quevedo et al., 2005) |
| Villin            | 92,5 kDa Monomer                     | (absorbierende Epithelzellen des Darmes und der Niere)<br>(Bretscher und Weber, 1979; Matsudeira und Burgess, 1979; Robine, 1985)                          | 1,4 $\mu$ M<br>(Burgess et al., 1987)          |

Die actinbündelnden Eigenschaften von CRMP-4 lassen sich gut mit dem, was bislang über die räumlichen Struktur von CRMPs bekannt ist, in Einklang bringen. Bei den Kosedimentationsstudien zur Bindung an das F-Actin fiel auf, dass eine am C-Terminus des Proteins trunkierte Form bei der Zentrifugation nicht mit dem Actin sedimentierte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der C-Terminus eine Domäne des Proteins ist, die wichtig ist für die Bindung an das Actin. Es ist bekannt, dass CRMPs Tetramere bilden (Wang und Strittmatter, 1997; Rosslenbroich et al., 2005; L.Dai, persönliche Mitteilung). Die mittlerweile aufgelöste Röntgenstruktur einer nicht vollständigen Form des CRMP-1 (Deo et al., 2004), das zu 73% mit

dem CRMP-4 in seiner Aminosäureprimärstruktur identisch ist, zeigt eine globuläre „lungenförmige“ Struktur des Monomers. Diese Struktur ähnelt weitgehend der von bestimmten Hydantoinasen. Das auch in diesen Kristallen vorliegende Tetramer des CRMP-1 zeigt, dass Teile der Dihydroorotase-artigen Domäne in die Oligomerisierung (*Deo et al., 2004*) involviert sind. Interessanterweise wurden keine strukturellen Informationen über den C-Terminus gefunden, was anzeigen könnte, dass es sich bei dieser Domäne des Proteins um eine der Umgebung exponierte, flexible Struktur des Proteins handelt, die fähig wäre, mit der Umgebung zu interagieren. Die Aminosäuren, die zur Tetramerisierung des unvollständigen CRMP-1 beitragen, sind hoch konserviert durch die ganze Proteinfamilie der CRMPs (CRMP-1-4) (*Deo et al., 2004*). Die Struktur von Oligomeren der anderen CRMPs könnte ähnlich der des CRMP-1 Tetramers sein (*Deo et al., 2004*). Es ist daher anzunehmen, dass Tetramere von CRMP-4 vier Actin-Bindungsstellen auf einem starren und kompakten Gerüst besitzen. Da bekannt ist, dass kleine, kurze „Cross-linking“-Proteine Actinfilamente derart zusammen halten, dass die einzelnen Actinfilamente in eine gebündelte, parallele Struktur zusammengeführt werden, fügt sich die vorhergesagte räumliche Struktur von CRMP-4 Oligomeren gut mit der experimentell gezeigten starken Bündelungs-Aktivität von CRMP-4 zusammen (Abbildung 20 und 21).

Unsere Beobachtung *in vitro*, dass CRMP-4 eine Actin-Bündelung hervorruft, eröffnet die Möglichkeit, dass CRMPs in die Regulierung von Actinbündeln *in vivo* involviert sein könnte. Ein derartiger zellbiologischer Nachweis konnte in der vorliegenden Studie nicht geführt werden. Es ist anzumerken, dass weder nach der Überexpression von CRMP-4 in Ntera2-Zellen, HEK293-Zellen und B35-Neuroblastomzellen noch nach der Mikroinjektion von rekombinantem CRMP-4 in Hela-Zellen eine vermehrte Bildung von Filopodien induziert werden konnte. Dies zeigt, dass eine gesteigerte Expression von CRMP-4 keine hinreichende Bedingung für die Entstehung von Filopodien darstellt. Dies könnte damit zusammenhängen, dass vergleichsweise hohe cytosolische CRMP-4 Konzentrationen vorhanden sein müssen, um entsprechende Effekte erwarten zu lassen, wenn man die scheinbare Dissoziationskonstante der Wechselwirkung in Betracht zieht. Ob CRMP-4 in Zellen, die dieses Protein endogen exprimieren, für die Bildung von Filopodien notwendig ist, kann auf der Grundlage der vorliegenden experimentellen Daten nicht beantwortet werden. Um diese Frage zu beantworten, wären „Knockdown“-Versuche notwendig. L. Dai führte in den Arbeiten zu seiner Dissertation solche „Knockdown“-Experimente durch, in denen die Expression von endogenem CRMP-4 in B35-Zellen herunterreguliert wurde (*Dai, Dissertation 2005*). Dabei zeigte sich, dass die Reduktion der Produktion von CRMP-4 zu einer Steigerung der Migration der Zellen in einem Migrationstest führte. Auch morphologisch waren Unterschiede zu Zellen mit einer normalen CRMP-4 Expression zu sehen. In den Zellen, die eine geringere

Expression von CRMP-4 zeigten, war eine ungeordnete F-Actin-Struktur in Lamellipodien zu beobachten. Dai kam in seiner Arbeit zu dem Schluß, dass es sich beim CRMP-4 um einen Regulator der Actin-Bündelung handelt und dass diese Funktion während der neuronalen Navigation durch Collapsin kontrolliert sein könnte. Actinbindende und actinbündelnde Proteine sind Proteine, die die Actin-Polymerisierung und die räumliche Anordnung von Filamenten von Actin beeinflussen können und so einen Einfluss auf die Dynamik des Actincytoskeletts haben können. Die Dynamik des Cytoskeletts hat eine wichtige Bedeutung für die Motilität der Zelle. Für einige actinbündelnde Proteine wurde gezeigt, dass sie entweder eine migrationssteigernde oder auch migrationshemmende Wirkung besitzen. So ließe sich eine Verbindung zwischen der Funktion des CRMP-4 und seiner Wirkung auf die Zelle herstellen. Ein molekularer Mechanismus für die Wirksamkeit von CRMP-4 ist noch nicht bekannt. Andere actinbindende Proteine wie zum Beispiel das Actinin-1, haben durch die Beeinflussung der Bildung von Fokalkontakten eine Wirkung auf die Motilität von Zellen (*Otey und Carpen, 2004*). Auf der Grundlage von Zellmigrationsstudien konnte hier aber eine Wirkung der Überexpression von CRMP-4 auf F-Actin-abhängige Funktionen nachgewiesen werden. In diesen Migrationsexperimenten inhibierte die Überexpression von CRMP-4 in Abwesenheit von äußeren Führungssignalen die Migration von B35-Neuroblastomzellen (Abbildung 34). Auf der anderen Seite hatte die Überexpression von CRMP-1, CRMP-2 und CRMP-3 keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der B35-Zellen in unserem Testsystem (Abbildung 34). Diese Befunde bestätigen, dass speziell CRMP-4 die F-Actin abhängige Migration von B35-Neuroblastomzellen beeinflusst. Interessanterweise zeigte die Transfektion einer Kombination von CRMP-1 bis -4 eine signifikante Aktivierung der Migration dieser Zellen (Abbildung 34). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit B35-Neuroblastomzellen wurde gezeigt, dass CRMP-1 die Migration von Lungentumorzellen hemmt (*Shih et al., 2001*) Somit scheinen die Effekte von CRMPs auf die Zellmigration kritisch von dem intrazellulären Kontext abzuhängen.

Die Organisation des Cytoskeletts in hochdynamischen, motilen Strukturen - wie den Wachstumskegeln oder dem Leitsaum migrierender Zellen - muß entsprechend dynamisch sein. Die rapide Umverteilung von GFP-CRMP-4 innerhalb der Zelle während der Zellmigration (Abbildung 33) zeigt, dass die Interaktion von CRMP-4 mit Actinfasern schnell reguliert wird. Im Fall des actinbindenden Proteins Fascin ist bekannt, dass die Phosphorylierung von Fascin die Actin-Bindung und die Actin-Bündelung, die dieses Protein normalerweise hervorruft, inhibiert (*Yamakita et al., 1996*). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch im Falle des CRMP-4 wirksam sein, da es sich auch bei den CRMPs um Phosphoproteine handelt (*Byk et al., 1996; Byk et al., 1998; Gu et al., 2000*). Am Beispiel von PC-12 Zellen wurde gezeigt, dass deren Differenzierung

in Anwesenheit von NGF von einer Änderung des Phosphorylierungszustandes von CRMP-4/ULIP begleitet wird (Byk *et al.*, 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass die cytosolische Tyrosin-Kinase Fes alle CRMPs phosphoryliert (Mitsui *et al.*, 2002), dass CRMP-1 und CRMP-2 Substrate der Rho-Kinase sind (Arimura *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2002) und dass GSK-3 $\beta$  CRMP-2 und CRMP-4 phosphoryliert (Cole *et al.*, 2004).

Im Einklang mit der Vorstellung, dass die Phosphorylierung die Bindung von CRMP-4 an F-Actin reduzieren könnte, bewirkte die Steigerung der Aktivität der Proteinkinase A oder der Proteinkinase C eine Reduktion der Kolo-kalisation von CRMP-4 mit F-Actin (Tabelle 14, Abb. 26 und 27). Dies erklärt sich mit dem Vorhandensein von Konsensus-Sequenzen für die Phosphorylierung durch diese beiden Kinasen in der Aminosäuresequenz des CRMP-4 (Franken, *Dissertation*, 2000).

In den Experimenten, in denen das Verhalten der Kolo-kalisation zwischen F-Actin und CRMP-4 in B35-Neuroblastomzellen bei der Einwirkung verschiedener Pharmaka beobachtet wurde, war der auffälligste Effekt bei der Inkubation der Zellen mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat zu sehen. Es zeigte sich eine gravierende Abnahme der Kolo-kalisation, was sich sowohl in den ermittelten Werten des Korrelationskoeffizienten nach Pearson, wie auch in den dazugehörigen Streudiagrammen zeigte (Abbildung 27). Phorbol-12-myristat-13-acetat ist ein bekannter Aktivator von Mitgliedern der Proteinkinase C-Familie. Die Mitglieder dieser Familie von Serin/Threonin-Kinasen spielen eine große Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Prozessen. Dazu gehören zum Beispiel Zellproliferation, Apoptose, Sekretion und auch die Strukturierung der Actin- und Tubulin-Komponenten des Cytoskeletts (Toker, 1998). Dieser Einfluss auf das Cytoskelett wird den Mitgliedern der Familie möglich, da sie mit einer Vielzahl von Cytoskelett-Proteinen kolo-kalisieren, ihre Phosphorylierung beeinflussen und so deren Verhalten zum Cytoskelett kontrollieren. Proteine, die unter anderem von PKCs *in vitro* wie auch *in vivo* phosphoryliert werden, sind zum Beispiel das MARCKS Protein (Überall *et al.*, 1997), das Fascin (Adams *et al.*, 1999), Vinculin (Werth *et al.*, 1983), Talin (Litchfield und Ball, 1986) oder Coronin 1B (Cai *et al.*, 2005). Über die Kontrolle dieser Cytoskelettproteine kann die PKC Einfluß auf die Organisation des Cytoskeletts und damit auf die Motilität von Zellen nehmen. Die Proteinkinase C Familie ist somit ein wichtiger Faktor in der Signaltransduktion zur gerichteten Bewegung von Zellen oder motilen Zellfortsätzen, wie zum Beispiel auswachsenden Axone.

Ein Familienmitglied der PKCs, nämlich die PKC Epsilon ( $\epsilon$ ) zeigte bei ihrer Überexpression in PC-12 Zellen, dass sie die Verlängerung von Neuriten induzieren kann (Hundle *et al.*, 1995). Dieser Befund zeigte sich auch in humanen Neuroblastomzellen (Fagerstrom *et al.*, 1996). Außerdem wurde die PKC  $\epsilon$  auch angereichert in Wachstumskegeln von auswachsenden Neuriten humaner Neuroblastomzellen gefunden (Parrow *et al.*, 1995). Allerdings ist die PKC nicht nur an

Prozessen beteiligt, die das Axonwachstum fördern. Es wurde auch gezeigt, dass Isoformen von konventionellen PKCs (cPKCs) auch einen inhibitorischen oder repulsiven Effekt auf das Auswachsen von Axonen haben können. Myelin-assoziierte Proteine, wie zum Beispiel das „Myelin-assoziierte-Glycoprotein“ (MAG) oder das „NOGO“-Protein und Chondroitinsulfat-Proteoglycane, sind Schlüsselmoleküle, die einen inhibitorischen Effekt auf das erneute Auswachsen von Axonen nach einer Verletzung des zentralen Nervensystems haben. Für diese Moleküle ist gezeigt worden, dass sie einen aktivierenden Effekt auf cPKCs ausüben, der mitentscheidend für eine Hemmung des Wachstumsprozesses bei verletzten Axonen ist (*Sivasankaran et al., 2004*). Durch Inhibition von PKC konnte eine verbesserte Regeneration von verletzten Axonen erzielt werden. Dies sind alles Hinweise darauf, dass die Mitglieder der PKC-Familie stark an der axonalen Wegfindung beteiligt sind. Wir haben das CRMP-4 als ein actinbindendes und actinstrukturierendes Protein in dieser Arbeit charakterisiert. Daher besteht auch die Möglichkeit, dass es in einer „Kinase-Substrat-Beziehung“ zu einem Familienmitglied der Proteinkinase C Familie steht. Für die PKC  $\epsilon$  ist bekannt, dass sie über die Lipidprodukte Phosphatidylinositol-3-4-bisphosphat [PI(3,4)P<sub>2</sub>] und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>] der PI3-Kinase aktiviert werden kann (*Toker et al., 1994*) und dass sie auch im NGF-Signalweg eine Rolle spielt (*Ohmichi et al., 1993*). Dies sind zwei Schlüsselmoleküle, die in unserem hypothetischen Signaltransduktionsweg vom extrazellulären Leitsignal zum CRMP-4 führen (siehe unten). Das CRMP-4 ist allerdings noch nicht als ein Substrat einer PKC nachgewiesen worden, obwohl seine Aminosäuresequenz Konsensus-Sequenzen für Phosphorylierungsstellen von PKCs aufweist (*Franken, Dissertation, 2000*). Ein nächster Arbeitsschritt könnte die Identifizierung des CRMP-4 als ein Substrat einer PKC-Isoform sein. Unsere Beobachtungen der Zellen, die mit PMA inkubiert wurden, lassen sich folgendermaßen erklären: Phorbolster aktivieren einen Großteil der Familienmitglieder der PKCs und regen somit deren Phosphorylierungsaktivität an. Eine aktivierte PKC würde bei einer Substrat-Beziehung zum CRMP-4 ein phosphoryliertes CRMP-4 zur Folge haben, was mutmaßlich zu einem Bindungsverlust zwischen CRMP-4 und dem F-Actin führt. Dieser Mechanismus, dass die Phosphorylierung eines Proteins sein Bindungsverhalten zu Actin bestimmt, ist zum Beispiel für das Actin-bindende und Actin-bündelnde Protein Fascin bekannt (*Yamakita et al., 1996*). Fascin findet sich innerhalb von Zellen in Stressfasern, Mikrospeikes und Membran-Ruffles. Es bindet dort an das Actin und bündelt Actinfasern zu größeren Actinsträngen, die zur Architektur des Actincytoskeletts beitragen. Seine Fähigkeit, an Actin zu binden und dieses zu bündeln, hängt allerdings von seinem Phosphorylierungsstatus ab. Mit einem zunehmenden Grad an Phosphorylierung nimmt seine Bindungs- und Bündelungsfähigkeit für Actin ab (*Yamakita et al., 1996*). Auch scheint diese Phosphorylierung abhängig von der Aktivität einer PKC zu sein

(*Yamakita et al., 1996*). Dies sind Befunde, die sehr ähnlich zu unseren Beobachtungen beim CRMP-4 sind.

Außerdem bedingte die Inhibition von Protein Serin- und Threonin-Phosphatasen mit Okada-Säure und die Inhibition von Tyrosin-Phosphatasen mit Phenylarsinoxid den Verlust der Kollokalisierung von CRMP-4 mit F-Actin (Tabelle 14; Abbildungen 28 und 29). Diese Umverteilung von CRMP-4 ging der Bildung von Retraktionsfasern, die Actinbündel enthalten, und dem nachfolgenden Kollaps des Actincytoskeletts voran (Abbildung 29). Basierend auf diesen Beobachtungen und der Tatsache, dass bakteriell exprimiertes, rekombinantes CRMP-4, welches an F-Actin gebunden wurde und Actin-Bündelung *in vitro* auslöste (Abbildung 21 und 22), vermutlich nicht phosphoryliert ist, ist in Betracht zu ziehen, dass die Proteinphosphorylierung in lebenden Zellen die Affinität des CRMP-4 zu den Actinfibrillen herabsetzt und dass dies eine Bündelung des Actins inhibiert. Dies spricht für die Existenz eines Mechanismus, der die Bündelungsaktivität von CRMP-4 in lebenden Zellen inhibiert.

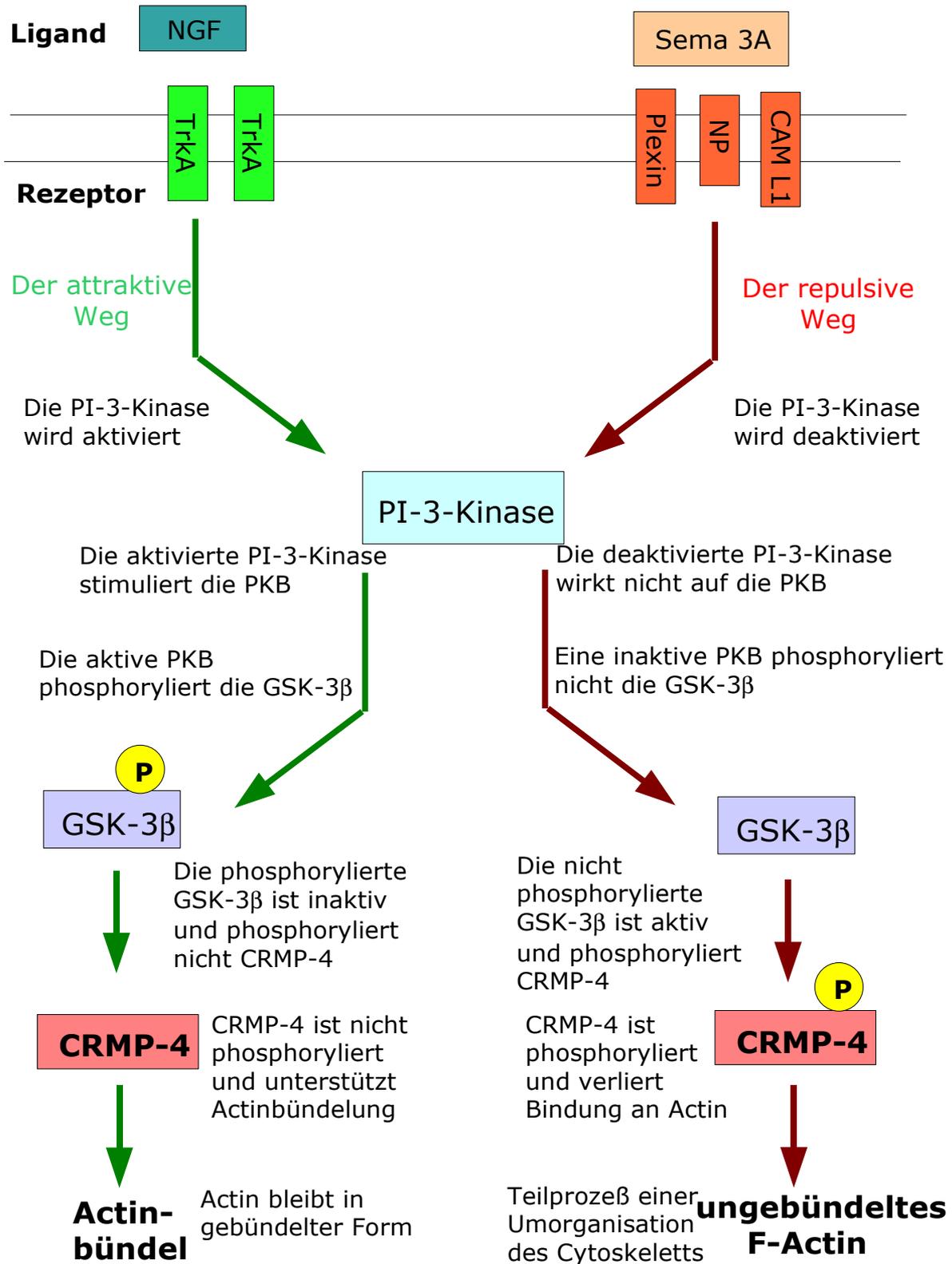
### **5.3. Signaltransduktion und CRMP-4**

Unsere Ergebnisse über die actinbündelnde Funktion von CRMP-4 lassen sich gut in das immer detailliertere Bild der Semaphorin 3A-Signalübertragungskette einfügen. So beschrieben Eickholt *et al.* (2002) die Entdeckung eines inaktiven Pools von Glycogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  am Leitsaum von aktiven Wachstumskegeln dorsaler Wurzelganglienzellen, der mit F-Actin kollokalisiert (*Eickholt et al., 2002*). Auf eine externe Zugabe von Semaphorin 3A ging die inaktive Form der GSK-3 $\beta$  in eine aktive Form über. Kontrolliert wird die GSK-3 $\beta$  durch eine andere Kinase, die Phosphatidylinositol-3-Kinase. Sie inaktiviert die GSK-3 $\beta$  über eine Stimulation der PKB/Akt, die wiederum für eine Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  sorgt (*Cross et al., 1995*). Bei der PI-3-Kinase ist bekannt, dass sie an der morphologischen Differenzierung von neuronalen Zellen beteiligt ist und auch bei der Axonverlängerung eine Rolle spielt (*Hadari et al., 2001; Ong et al., 2001; Huang und Reichard, 2001*). Außerdem wurde für sie eine Lokalisation an Lipid Rafts nachgewiesen (*Inoue et al., 2002*). Eine alleinige Hemmung der PI3-Kinase führte allerdings nicht zu einem Wachstumskegelkollaps, sondern reduzierte nur den Radius von behandelten Wachstumskegeln und veränderte das Erscheinungsbild des F-Actin im Wachstumskegel (*Eickholt et al., 2002*). Somit muß es weitere Signaltransduktionsvorgänge geben, die am Wachstumskegelkollaps beteiligt sind (*Gallo und Letourneau, 2004*). Der PI-3-Kinase wurde hier eine Verbindung zum Transduktionsweg des Semaphorin 3A zugeschrieben (*Eickholt et al., 2002*). Es wurde gezeigt, dass CRMP-4 und auch CRMP-2 Substrate der GSK-3 $\beta$  sind (*Cole et al., 2004*). CRMP-4 wird

sowohl in vivo als auch in vitro an drei Phosphorylierungsstellen von der GSK-3 $\beta$  phosphoryliert. Damit sind bis dato vier Stationen in einem hypothetischen Signalweg vom Semaphorin 3A bis hin zum CRMP-4 bekannt: (i) der membranständige Rezeptorkomplex, bestehend aus Neuropilin/Plexin/CAM-L1, (ii) die PI-3-Kinase, (iii) die Glycogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  und (iv) das CRMP-4 selbst. Es existiert also ein Signaltransduktionsweg, der nach der Stimulation mit Semaphorin 3A zur Phosphorylierung von CRMP-4 führen könnte. Die Abbildung 35 gibt einen Überblick über diesen Weg.

Die Einwirkung anderer extrazellulärer Liganden könnte bei der Betrachtung dieses Modells für die Signalübertragung auf das CRMP-4 und den damit verbundenen Auswirkungen auf das Cytoskelett eine Rolle spielen. Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) wurde im Zusammenhang mit der Entwicklung des Nervensystems bisher immer wie alle anderen Neurotrophine mit der Axonverlängerung und dem Überleben von Neuronen in Zusammenhang gebracht. Das durch Neurotrophine stimulierte Axonwachstum verläuft zum einen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die eine Proteinsynthese zur Folge haben (*Markus et al., 2002*). Zusätzlich aktivieren Neurotrophine einen Signalweg, der den Zusammenbau von Cytoskelettproteinen in Axone hinein kontrolliert (*Campanot et al., 1982*). Zhou et al. (2004) stellten die Frage, wie NGF die axonalen Mikrotubuli bei der Axonverlängerung reguliert, und zeigten, dass es zu einer Aktivierung der PI-3-Kinase nach einem extrazellulären NGF Signal kommt, die im Wachstumskegel lokalisiert ist. Parallel kommt es im Wachstumskegel auch zu einer Inaktivierung der Glycogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$ , worauf das Axonwachstum in den Zellen zunimmt. Zhou schlägt vor, dass NGF über diesen PI-3-Kinase/GSK-3-Kinase-Weg schnelles Axonwachstum induziert. Er behauptet auch, dass dieser Signalweg die Mikrotubulidynamik relativ unabhängig von einer Actin Modifikation beeinflussen würde (*Zhou et al., 2004*). Wenn man die bisher bekannten Stationen der beiden Wege von Semaphorin 3A und NGF im Bereich des Axonwachstum vergleicht und auch die Erkenntnisse unserer Arbeit hinzunimmt, so läßt sich ein Schema entwerfen, in dem CRMP-4 von beiden extrazellulären Signalmolekülen beeinflusst wird, was sich wiederum in einer Modifikation seiner Affinität zum Actincytoskelett auswirkt. Auf diese Weise könnte die Regulation der Phosphorylierung von CRMP-4 zur dynamischen Organisation des F-Actins im Wachstumskegel so auch zur Steuerung der Wachstumskegelmotilität beitragen (Abbildung 35). Hierbei sind wahrscheinlich die GSK-3 $\beta$  und weitere Kinasen beteiligt, wie zum Beispiel die Proteinkinase C und die Tyrosinkinase Fes. So wurde beschrieben, dass die cytosolische Tyrosinkinase Fes einen Einfluss auf die PI-3-Kinase ausübt, wenn sie über den NGF-Signalweg stimuliert wird (*Shibata et al., 2003*). Fes wird ebenfalls durch den Semaphorin 3A Rezeptorkomplex stimuliert, und alle CRMPs sind mögliche Substrate von Fes (*Mitsui et al., 2002*).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass CRMPs einen wichtigen Einfluß auf Mikrotubuli ausüben können, da sie an Tubulin-Heterodimere binden. Darüber hinaus fördert CRMP-2 die Entstehung von Mikrotubuli (*Fukata et al., 2002*). Diese Interaktionen der CRMPs machen sie zu interessanten Kandidaten, die strukturelle Interaktionen zwischen dem Actin- und Tubulincytoskelett in neuronalen Zellen vermitteln könnten. Die Koordination dieser beiden Cytoskelettsysteme untereinander ist sehr wichtig für die Lenkung gerichteter Bewegungen von Zellen und Wachstumskegeln (*Zhou und Cohan, 2004*). Rodriguez und Kollegen haben ein theoretisches Gerüst für das Verständnis von Mikrotubuli-Actin Interaktionen vorgeschlagen, das drei konservierte „Mechanochemische Aktivitätsmodule“ postuliert. Für die axonale Wegfindung ist das sogenannte Actinbündel/Mikrotubuli Führungsmodul von besonderem Interesse. Dies bedeutet, dass die in einer Gitterstruktur befindlichen Mikrotubuli entlang von Actinfilamenten binden, wachsen oder sich an ihnen entlang bewegen. Die räumliche Verteilung von Filopodien lenkt das Wachstum von Mikrotubuli, welche dadurch wiederum die Richtung des Wachstumskegels steuern. Basierend auf unseren Experimenten und den vorgestellten Literaturdaten stellen wir die Hypothese auf, dass CRMPs als Adapter zwischen Mikrotubuli und F-Actin Bündeln fungieren könnten. Ihre Fähigkeit Hetero- sowie auch Homooligomere zu formen und die unterschiedlichen Actin Bindungsmöglichkeiten der CRMPs könnten die Komposition von CRMP-Komplexen erlauben, die eine hohe Zahl von möglichen Bindungsstellen für F-Actin und Tubulin aufweisen könnten. So könnten exakt dem jeweiligen Zelltyp und dem jeweiligen Entwicklungszustand der Zelle angepasste Formen solcher Adapter bereitgestellt werden. Die Kompartimentierung von CRMPs in Lipid Rafts (*Roßlenbroich et al., 2003*) könnte aufgrund von externen Stimuli solche CRMP-Komplexe gerichtet an definierte Ziele bringen (*Song und Poo, 2001*). Zusammengefasst stellen CRMPs potente Regulatoren des Tubulin- und Actincytoskeletts dar, welche die Zellmotilität beeinflussen. Ihre Orte der Expression in Neuronen deuten darauf hin, dass die Aktivitäten von CRMPs an der koordinierten Umbildung des Cytoskeletts in Antwort auf extrazelluläre Führungsfaktoren teilnehmen.



**Abb. 35:** Schematische Darstellung des hypothetischen Transduktionsprozesses, an dem CRMP-4 beteiligt ist.

#### **5.4. Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur subzellulären Lokalisation von CRMP-4 und zu seiner Interaktion mit F-Actin lassen einen Ausblick auf zukünftige Frage- und Problemstellungen zu. Die Beteiligung von mindestens zwei Mitgliedern der CRMP-Proteinfamilie, des CRMP-2 und des CRMP-4, an der axonalen Wegfindung scheint wahrscheinlich zu sein. Dadurch zeigt sich eine wichtige Funktion dieser Proteine während der Entwicklung des Nervensystems von Wirbeltieren. Weiterführende Arbeiten könnten sich mit der näheren Regulation der Interaktion des CRMP-4 mit dem F-Actin befassen, die unter Einfluß von zellexternen Botenmolekülen steht, welche die Phosphorylierung dieses Moleküls, und damit wahrscheinlich seine Affinität zum Actin bestimmen. Interessant wäre es hier, die Bindungsdomäne des CRMP-4 zu bestimmen, die mit dem Actin in Wechselwirkung tritt und mit welchem Mechanismus die Bindungskinetik zwischen den beiden Molekülen reguliert wird. Außerdem wären durch siRNA vermittelte „Knockdown“ Experimente von großem Interesse zur Untersuchung der zellulären Funktion von CRMP-4 in Neuronen. Dies wären wichtige Erkenntnisse auf dem Weg, auch solch komplexe Abläufe zu verstehen, wie zum Beispiel das Migrationsverhalten von Zellen und Wachstumskegeln. Diese Studien werden dazu beitragen, die Rolle von CRMP-4 als ein neues Actin-bindendes und -bündelndes Protein im komplizierten Geflecht der Signaltransduktion extrazellulärer Leitmoleküle zu verstehen.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CRMP-1, -3, -4 und -5 in Lipid Rafts vorkommen. Diese detergentenresistenten Mikrodomänen der Plasmamembran sind essentielle Komponenten von Wachstumskegeln. Nach der Beseitigung von Lipid Rafts durch Extraktion des zellulären Cholesterols kommt es zum Wachstumskegelkollaps.

CRMP-4 kolokalisiert in Neuronen mit F-Actin und  $\beta$ -Tubulin. Die Behandlung der Neuronen mit dem Actin depolymerisierenden Agens Latrunculin A führt spezifisch zur drastischen Reduktion des Kolokalisationsgrades von CRMP-4 mit F-Actin.

Außerdem wurde eine direkte Interaktion von CRMP-4 mit F-Actin durch Bindungsstudien in vitro gezeigt. Dabei führte CRMP-4 zur Bündelung von Actinfasern. Die scheinbare Gleichgewichtskonstante dieser Bindung beträgt  $0,730 \cdot 10^6 \mu\text{M}^{-1}$ .

Die Bindung von CRMP-4 an F-Actin in der Zelle ist vom Phosphorylierungszustand abhängig. Die Aktivierung der Proteinkinase C und der Proteinkinase A bewirkten eine Reduktion der Kolokalisation von CRMP-4 mit F-Actin. Eine ähnliche Wirkung hatte die Hemmung von Proteinphosphatasen.

Die Beobachtung lebender Zellen zeigte eine dynamische Verteilung eines GFP-CRMP-4 Fusionsproteins am Leitsaum migrierender Zellen. Funktionell führte die Überexpression von CRMP-4 zu einer Hemmung der Migration von B35-Neuroblastomzellen.

Diese Befunde führen zu folgendem Erklärungsmodell: Ist CRMP-4 nicht phosphoryliert, bindet es an das F-Actin und unterstützt dadurch die neuronale Navigation. Eine Steigerung der Proteinphosphorylierung bedingt einen Verlust der Bindung an das Actin, und die Organisation des Cytoskeletts wird dadurch verändert. Eine Ursache hierfür kann die durch Semaphorin 3A/Collapsin-1 initiierte Signaltransduktionskette sein, die über den Neuropilin-Plexin-L1 Rezeptorkomplex, die PI3-Kinase und die Glycogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  verläuft.



## 7. Literaturverzeichnis

- Adams J.C., Clelland J.D., Collet G.D., Matsumura F., Yamashiro S., Zhang L. (1999) Cell-matrix adhesions differentially regulate fascin phosphorylation. *Mol Biol Cell* 10: 4177-90
- Aizawa H., Wakatsuki S., Ishii A., Moriyama K., Sasaki Y., Ohashi K., Sekine-Aizawa Y., Sehara-Fujisawa A., Mizuno K., Goshima Y., and Yahara I. (2001). Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat Neurosci* 4: 367-73.
- Alberts B., Bray D., Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- Amann, K. J. and T. D. Pollard (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat Cell Biol* 3: 306-10.
- Anton E.S., Kreidberg J.A., Rakic P. (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22: 277-89.
- Arimura N., Inagaki N., Chihara K., Menager C., Nakamura N., Amano M., Iwamatsu A., Goshima Y., Kaibuchi K. (2000). Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem* 275: 23973-80.
- Bagnard D., Lohrum M., Uziel D., Püschel A.W., Bolz J. (1998). Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125: 5043-53.
- Bartles J. R., Wierda A., Zheng L. (1996). Identification and characterization of espin, an actin-binding protein localized to the F-actin-rich junctional plaques of Sertoli cell ectoplasmic specializations. *J Cell Sci* 109: 1229-39.
- Bartles J. R., Zheng L., Li A., Wierda A., Chen B. (1998). Small espin: a third actin-bundling protein and potential forked protein ortholog in brush border microvilli. *J Cell Biol* 143: 107-19.
- Bretscher, A. and K. Weber (1979). Villin: the major microfilament-associated protein of the intestinal microvillus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 2321-5.
- Brown M., Jacobs T., Eickholt B., Ferrari G., Teo M., Monfries C., Qi R. Z., Leung T., Lim L., and Hall C. (2004). Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci* 24: 8994-9004.

- Büttner B., Kannicht C., Reutter W., Horstkorte R. (2003). The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 967-71
- Büttner B., Kannicht C., Reutter W., Horstkorte R. (2005). Novel cytosolic binding partners of the neural cell adhesion molecule: mapping the binding domains of PLC gamma, LANP, TOAD-64, syndapin, PP1 and PP2A. *Biochemistry* 44: 6938- 47
- Burgess D. R., Broschat K. O., Hayden J.M. (1987). Tropomyosin distinguishes between the two actin-binding sites of villin and affects actin-binding properties of other brush border proteins. *J Cell Biol* 104: 29-40.
- Byk T., Dobransky T., Cifuentes-Diaz C., Sobel A. (1996). Identification and molecular characterization of Unc-33-like phosphoprotein (Ulip), a putative mammalian homolog of the axonal guidance-associated unc-33 gene product. *J Neurosci* 16: 688-701.
- Byk T., Ozon S., Sobel A. (1998). The Ulip family phosphoproteins--common and specific properties. *Eur J Biochem* 254: 14-24.
- Cai L., Holoweckyj N., Schaller M.D., Bear J.E. (2005) Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility. *J Biol Chem* 280: 31913-23
- Cajal S. R. *Histology of the nervous system Vol.1* (1995) (Transl. Swanson, N. & Swanson, L. W.) 532-537 (Oxford University Press, New York, 1995)
- Callahan C. A., Ofstad T., Horng L., Wang J.K., Zhen H.H., Coulombe P.A., Oro A.E. (2004). MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription. *Genes Dev* 18: 2724-9.
- Campenot R. B. (1982).  
Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II. Local control of neurite survival by nerve growth factor. *Dev Biol* 93:13-21.
- Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., and Rougon, G. (2000).  
Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between  
Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27: 237-49.
- Chedotal A., Del Rio J.A., Ruiz M., He Z., Borrell V., de Castro F., Ezan F., Goodman C.S., Tessier-Lavigne M., Sotelo C., Soriano E. (1998)  
Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors.  
*Development* 125: 4313-23.
- Chen, B., A. Li, Wang D., Wang M., Zheng L., Bartles J.R. (1999). Espin contains an additional actin-binding site in its N terminus and is a major actin-bundling protein of the Sertoli cell-spermatid ectoplasmic specialization junctional plaque. *Mol Biol Cell* 10: 4327-39.
- Cheng H.J., Bagri A., Yaron A., Stein E., Pleasure S.J., Tessier-Lavigne M. (2001).  
Plexin-A3 mediates semaphorin signaling and regulates the development of hippocampal axonal projections. *Neuron* 32:249-63.
- Cohen P., Cohen P.T. (1989) Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264: 21435-8.

- Cole, A. R., Knebel A., Morrice N.A., Robertson L.A., Irving A.J., Connolly C.N., Sutherland C. (2004). GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *J Biol Chem* 279: 50176-80.
- Comeau M.R., Johnson R., DuBose R.F., Petersen M., Gearing P., VandenBos T., Park L., Farrah T., Buller R.M., Cohen J.I., Strockbine L.D., Rauch C., Spriggs M.K. (1998). A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* 8: 473-82.
- Cross D.A., Alessi D.R., Cohen P., Andjelkovich M., Hemmings B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-9
- Dai, L. (2005). Steuerung der Zellmigration durch Kollaps-Faktoren und Collapsin Response Mediator Protein-4., Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
- de Castro F., Hu L., Drabkin H., Sotelo C., Chedotal A. (1999). Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J Neurosci* 19: 4428-36.
- De Wit J., De Winter F., Klooster J., Verhaagen J. (2005). Semaphorin 3A displays a punctate distribution on the surface of neuronal cells and interacts with proteoglycans in the extracellular matrix. *Mol Cell Neurosci* 29: 40-55.
- Deo, R. C., Schmidt E.F., Elhabazi A., Togashi H., Burley S.K., Strittmatter S.M. (2004). Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *Embo J* 23: 9-22.
- Drescher B., Spiess E., Schachner M., Probstmeier R. (1996) Structural analysis of the murine cell adhesion molecule L1 by electron microscopy and computer-assisted modelling. *Eur J Neurosci* 8: 2467-78.
- Eickholt B.J., Mackenzie S.L., Graham A., Walsh F.S., Doherty P.(1999). Evidence for collapsin-1 functioning in the control of neural crest migration in both trunk and hindbrain regions. *Development* 126: 2181-9.
- Eickholt, B. J., Walsh, F. S., and Doherty, P. (2002). An inactive pool of GSK-3 at the leading edge of growth cones is implicated in Semaphorin 3A signaling. *J Cell Biol* 157: 211-7.
- Fagerstrom S., Pahlman S., Gestblom C., Nanberg E. (1996) Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell growth Differ* 7: 775-85
- Fan J., Mansfield S.G., Redmond T., Gordon-Weeks P.R., Raper J.A. (1993) The organization of F-actin and microtubules in growth cones exposed to a brain-derived collapsing factor. *J Cell Biol* 121: 867-78.
- Fan J., Raper J.A. (1995). Localized collapsing cues can steer growth cones without inducing their full collapse. *Neuron* 14: 263-74.

- Fiore R., and Püschel A.W. (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Front Biosci* 8: 484-99.
- Franken S. (2000) Charakterisierung von Rezeptoren neurotropher Glykosaminoglykane im Rattenhirn. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
- Franken S., Junghans U., Rosslenbroich V., Baader S. L., Hoffmann R., Gieselmann V., Viebahn C., and Kappler J. (2003). Collapsin response mediator proteins of neonatal rat brain interact with chondroitin sulfate. *J Biol Chem* 278: 3241-50.
- Fukada M., Watakabe I., Yuasa-Kawada J., Kawachi H., Kuroiwa A., Matsuda Y., Noda M. (2000) Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family. *J Biol Chem* 275: 37957-65.
- Fukata, Y., Itoh T.J., Kimura T., Menager C., Nishimura T., Shiromizu T., Watanabe H., Inagaki N., Iwamatsu A., Hotani H., Kaibuchi K. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4: 583-91.
- Funatsu N., Kumanogoh H., Sokawa Y., Maekawa S. (2000). Identification of gelsolin as an actin regulatory component in a triton insoluble low density fraction (raft) of newborn bovine brain. *Neurosci Res* 36:311-7.
- Gallo G., Letourneau P.C. (2004). Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol* 58: 92-102.
- Gomez-Mouton C., Lacalle R.A., Mira E., Jimenez-Baranda S., Barber D.F., Carrera A.C., Martinez-A.C., Manes S. (2004). Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* 164: 759-68.
- Gonzalez-Quevedo, R., Shoffer M., Horng L., Oro A.E. (2005). Receptor tyrosine phosphatase-dependent cytoskeletal remodeling by the hedgehog-responsive gene MIM/BEG4. *J Cell Biol* 168: 453-63.
- Gordon-Weeks P.R. (2004). Actin dynamics: re-drawing the map. *Nat. Cell Biol* 6: 390-1
- Goshima Y., Nakamura F., Strittmatter P., and Strittmatter S. M. (1995). Collapsin induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* 376: 509-14.
- Gu Y., Hamajima N., and Ihara Y. (2000). Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522. *Biochemistry* 39: 4267-75.
- Guirland C., Suzuki S., Kojima M., Lu B., Zheng J.Q. (2004). Lipid rafts mediate chemotropic guidance of nerve growth cones. *Neuron* 42: 51-62.
- Hadari Y.R., Gotoh N., Kouhara H., Lax I., Schlessinger J. (2001). Critical role for the docking-protein FRS2 alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 8578-83.

- Hall C., Brown M., Jacobs T., Ferrari G., (2001). Collapsin response mediator protein switches RhoA and Rac1 morphology in N1E-115 neuroblastoma cells and is regulated by Rho kinase. *J Biol Chem* 276: 43482-6.
- Hamajima N., Matsuda K., Sakata S., Tamaki N., Makoto S., Nonaka M. (1996). A novel gene family defined by human dihydropyrimidinase and three related proteins with differential tissue distribution. *Gene* 180: 157-163
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
- Harder T., Scheiffele P., Verkade P., Simons K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141: 929-42.
- Harlow E., Lane D. (1988). *Antibodies-A laboratory manual* Cold Spring Harbour Laboratory,
- Harrison R. G. (1914). The reaction of embryonic cells to solid structures. *Journal of Experimental Zoology* 17: 521-544
- Hatten M.E. (1999). Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22: 511-39.
- He Z., Tessier-Lavigne M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90: 739-51.
- Hedgecock E.M., Culotti J.G., Thomson J.N., Perkins L.A. (1985). Axonal guidance mutants of *Caenorhabditis elegans* identified by filling sensory neurons with fluorescein dyes. *Dev Biol* 111: 158-70.
- Holtfreter J. (1944). Neural differentiation of ectoderm through exposure to saline solution. *Journal of Experimental Zoology* 95: 307-343
- Honda K., Yamada T., Hayashida Y., Idogawa M., Sato S., Hasegawa F., Ino Y., Ono M., Hirohashi S. (2005). Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology* 128: 51-62.
- Hong K., Hinck L., Nishiyama M., Poo M.M., Tessier-Lavigne M., Stein E. (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97: 927-41.
- Horiuchi M., El Far O., Betz H. (2000). Ulip6, a novel unc-33 and dihydropyrimidinase related protein highly expressed in developing rat brain. *FEBS Lett.* 480: 283-6.
- Hotta A., Inatome R., Yuasa-Kawada J., Qin Q., Yamamura H., Yanagi S. (2005). Critical role of collapsin response mediator protein-associated molecule CRAM for filopodia and growth cone development in neurons. *Mol Biol Cell* 16: 32-9.
- Huang E.J., Reichardt L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677-736.
- Huber K. (2005) *Ursprung, Entwicklung und Differenzierung von Oligodendrozyten.* Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Tierärztliche Fakultät.

- Hundle B., McMahon T., Dadgar J., Messing R.O. (1995) Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 270: 30134-40
- Inatome R., Tsujimura T., Hitomi T., Mitsui N., Hermann P., Kuroda S., Yamamura H., Yanagi S. (2000). Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain. *J Biol Chem* 275: 27291-302.
- Inoue H., Miyaji M., Kosugi A., Nagafuku M., Okazaki T., Mimori T., Amakawa R., Fukuhara S., Domae N., Bloom E.T., Umehara H. (2002). Lipid rafts as the signaling scaffold for NK cell activation: tyrosine phosphorylation and association of LAT with phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C-gamma following CD2 stimulation. *Eur J Immunol* 32: 2188-98.
- Jin Z., and Strittmatter S. M. (1997). Rac1 mediates collapsin-1-induced growth cone collapse. *J Neurosci* 17: 6256-63.
- Kandel E., Schwartz J., Jessell T. (2000). *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Companies 4. Auflage
- Kappler J., Franken S., Junghans U., Hoffmann R., Linke T., Muller H.W., Koch K.W. (2000). Glycosaminoglycan-binding properties and secondary structure of the C-terminus of netrin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 287-91.
- Kilsdonk E. P., Yancey P.G., Stoudt G.W., Bangerter F.W., Johnson W.J., Phillips M.C., Rothblat G.H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270: 17250-6.
- Klostermann A., Lohrum M., Adams R.H., Püschel A.W. (1998). The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J Biol Chem* 273: 7326-31.
- Kolodkin A.L., Matthes D.J., Goodman C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75: 1389-99.
- Koppel A.M., Feiner L., Kobayashi H., Raper J.A. (1997). A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron* 19: 531-7.
- Koppel A.M., Raper J.A. (1998). Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J Biol Chem* 273: 15708-13.
- Kumanogoh H., Miyata S., Sokawa Y., Maekawa S. (2001). Biochemical and morphological analysis on the localization of Rac1 in neurons. *Neurosci Res* 39: 189-96.
- Lallier T., Deutzmann R., Perris R., Bronner-Fraser M. (1994). Neural crest cell interactions with laminin: structural requirements and localization of the binding site for alpha 1 beta 1 integrin. *Dev Biol* 162: 451-64.
- Lallier T.E., DeSimone D.W. (2000). Separation of neural induction and neurulation in *Xenopus*. *Dev Biol* 225: 135-50.

- Lee S., Kim J.H., Lee C.S., Kim J.H., Kim Y., Heo K., Ihara Y., Goshima Y., Suh P.G., Ryu S.H. (2002). Collapsin response mediator protein-2 inhibits neuronal phospholipase D(2) activity by direct interaction. *J Biol Chem* 277: 6542-9.
- Lee, Y. G., Macoska J.A., Korenchuk S., Pienta K.J. (2002b). MIM, a potential metastasis suppressor gene in bladder cancer. *Neoplasia* 4: 291-4.
- Leung, T., Ng Y., Cheong A., Ng C.H., Tan I., Hall C., Lim L. (2002). p80 ROKalpha binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology. *FEBS Lett* 532: 445-9.
- Litchfield D.W. and Ball E.H. (1986). Phosphorylation of the cytoskeletal protein talin by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 134: 1276-83
- Liu B.P., Strittmatter S.M. (2001). Semaphorin-mediated axonal guidance via Rho-related G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13: 619-26
- Luo Y., Raible D., Raper J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75: 217-27.
- Machesky L. M., Reeves E., Wientjes F., Mattheyse F.J., Grogan A., Totty N.F., Burlingame A.L., Hsuan J.J., Segal A.W. (1997). Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J* 328: 105-12.
- Maekawa S., Kumanogoh H., Funatsu N., Takei N., Inoue K., Endo Y., Hamada K., Sokawa Y. (1997). Identification of NAP-22 and GAP-43 (neuromodulin) as major protein components in a Triton insoluble low density fraction of rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1323: 1-5
- Manders E.M., Stap J., Brakenhoff G.J., van Driel R., Aten J.A. (1992). Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy. *J Cell Sci* 103: 857-62.
- Markus A., Patel T.D., Snider W.D. (2002). Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12: 523-31.
- Matsudaira P. T. and D. R. Burgess (1979). Identification and organization of the components in the isolated microvillus cytoskeleton. *J Cell Biol* 83: 667-73.
- Mikule K., Gatlin J.C., de la Houssaye B.A., Pfenninger K.H. (2002). Growth cone collapse induced by semaphorin 3A requires 12/15-lipoxygenase. *J Neurosci* 22: 4932-41.
- Ming G.L., Song H.J., Berninger B., Holt C.E., Tessier-Lavigne M., Poo M.M. (1997). cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19: 1225-35
- Minturn J. E., Fryer H.J., Geschwind D.H., Hockfield S. (1995). TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a *C. elegans* gene involved in axon outgrowth. *J Neurosci* 15: 6757-66.

- Mitsui N., Inatome R., Takahashi S., Goshima Y., Yamamura H., Yanagi S. (2002). Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *Embo J* 21: 3274-85.
- Mueller B.K. (1999). Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Annu Rev Neurosci* 22: 351-88.
- Murakami Y., Suto F., Shimizu M., Shinoda T., Kameyama T., Fujisawa H. (2001). Differential expression of plexin-A subfamily members in the mouse nervous system. *Dev Dyn* 220: 246-58.
- Nakai Y., Kamiguchi H. (2002). Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *J Cell Biol* 159: 1097-108.
- Nakamura F., Tanaka M., Takahashi T., Kalb R.G., Strittmatter S.M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 21: 1093-100.
- Nakamura F., Kalb R.G., Strittmatter S.M. (2000). Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44: 219-29.
- Ohsawa K., Imai Y., Sasaki Y., Kohsaka S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88: 844-56.
- Ohmichi M., Zhu G., Saltiel A.R. (1993) Nerve growth factor activates calcium-insensitive protein kinase C-epsilon in PC-12 rat pheochromocytoma cells. *Biochem J* 295: 767-72
- Ong S.H., Hadari Y.R., Gotoh N., Guy G.R., Schlessinger J., Lax I. (2001). Stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase by fibroblast growth factor receptors is mediated by coordinated recruitment of multiple docking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6074-9.
- Otey C.A., Boukhelifa M., Maness P. (2003) B35 neuroblastoma cells: an easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons. *Methods Cell Biol* 71: 287-304
- Otey C.A. and O. Carpen (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* 58: 104-11.
- Pantaloni D., Le Clainche C., Carlier M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292: 1502-06
- Parrow V., Fagerstrom S., Meyerson G., Nanberg E., Pahlman S. (1995). Protein kinase C-alpha and -epsilon are enriched in growth cones of differentiating SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 41: 782-91
- Pasterkamp R.J. and Kolodkin A.L. (2003). Semaphorin junction: making tracks toward neural connectivity. *Curr Opin Neurobiol* 13: 79-89
- Pollard T.D. and Borisy G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-65

- Polleux F., Giger, R. J., Ginty, D. D., Kolodkin, A. L., and Ghosh, A. (1998). Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 282: 1904-6.
- Polleux F., Morrow, T., and Ghosh, A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404: 567-73.
- Prag S., Lepekhn E.A., Kolkova K., Hartmann-Petersen R., Kawa A., Walmod P.S., Belman V., Gallagher H.C., Berezin V, Bock E, Pedersen N. (2002). NCAM regulates cell motility. *J Cell Sci* 115: 283-92.
- Quinn C.C., Gray G.E., Hockfield S. (1999). A family of proteins implicated in axon guidance and outgrowth. *J Neurobiol* 41: 158-64.
- Quinn C.C., Chen E., Kinjo T.G., Kelly G., Bell A.W., Elliot R.C., Mc Pherson P.S., Hockfield S. (2003). TUC-4b, a novel TUC family variant, regulates neurite outgrowth and associates with vesicles in the growth cone. *J Neurosci* 23: 2815-23.
- Rakic P. (1998). Images in neuroscience. Brain development, VI: radial migration and cortical evolution. *Am J Psychiatry* 155: 1150-1.
- Ridley A. J. and A. Hall (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70: 389-99.
- Robine S., Huet C., Moll R., Sahuquillo-Merino C., Coudrier E., Zweibaum A., Louvard D. (1985). Can villin be used to identify malignant and undifferentiated normal digestive epithelial cells? *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8488-92.
- Rosslénbroich V. (2000). Überexpression von Mitgliedern der CRMP-Proteinfamilie der Ratte zur Charakterisierung der Proteinspezifität eines monoklonalen Antikörpers., Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
- Rosslénbroich V., Dai L., Franken S., Gehrke M., Junghans U., Gieselmann V. and Kappler J. (2003). Subcellular localization of collapsin response mediator proteins to lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 392-9.
- Rosslénbroich V., Dai L., Baader S.L., Noegel A.A., Gieselmann V. und Kappler J. (2005). Collapsin response mediator protein-4 regulates F-actin bundling. *Exp cell Res* 310: 434-44
- Sasaki Y., Cheng C., Uchida Y., Nakajima O., Ohshima T., Yagi T., Taniguchi M., Nakayama T., Kishida R., Kudo Y., Ohno S., Nakamura F., Goshima Y. (2002). Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron* 35: 907-20.
- Sawada Y., Sheetz M.P. (2002). Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol* 156: 609-15.
- Semaphorin Nomenclature Committee (1999). Unified nomenclature for the semaphorins / collapsins. *Cell* 97: 551-552
- Shibata A., Laurent C.E., Smithgall T.E. (2003). The c-Fes protein-tyrosine kinase accelerates NGF-induced differentiation of PC12 cells through a PI3K-dependent mechanism. *Cell Signal* 15: 279-88.

- Shih J. Y., Yang S. C., Hong T. M., Yuan A., Chen J. J., Yu C. J., Chang Y. L., Lee Y. C., Peck K., Wu C. W., Yang P. C. (2001). Collapsin response mediator protein-1 and the invasion and metastasis of cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 93: 1392-400.
- Simons K., Ikonen E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-72.
- Simons K., Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-9.
- Singh S., Aggarwal B.B. (1995). Protein-tyrosine phosphatase inhibitors block tumor necrosis factor-dependent activation of the nuclear transcription factor NF-kappa B. *J Biol Chem* 270: 10631-9.
- Sivasankaran R., Pei J., Wang K.C., Zhang Y.P., Shields C.B., Xu X.M., He Z. (2004). PKC mediates inhibitory effects of myelin and chondroitin sulfate proteoglycans on axonal regeneration. *Nat Neurosci* 7: 261-8
- Smith S.J. (1988). Neuronal cytomotility: the actin-based motility of growth cones. *Science* 242: 708-15.
- Song H.J., Ming G.L., Poo M.M. (1997). cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388: 275-9.
- Song H.J., Poo M.M. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol* 9: 355-63.
- Song, H., and Poo, M. (2001). The cell biology of neuronal navigation. *Nat Cell Biol* 3: 81-8.
- Sperry, R. W. (1963). Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 50: 703-710
- Spoerl Z., Stumpf M., Noegel A.A., Hasse A. (2002). Oligomerization, F-actin interaction, and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus. *J Biol Chem* 277: 48858-67.
- Takahashi T., Fournier A., Nakamura F., Wang L. H., Murakami Y., Kalb R. G., Fujisawa, H., and Strittmatter, S. M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99: 59-69.
- Takahashi S., Inatome R., Yamamura H., Yanagi S. (2003). Isolation and expression of a novel mitochondrial septin that interacts with CRMP/CRAM in the developing neurons. *Genes Cells* 8: 81-93
- Tamagnone L., Artigiani S., Chen H., He Z., Ming G.I., Song H., Chedotal A., Winberg M.L., Goodman C.S., Poo M., Tessier-Lavigne M., Comoglio P.M. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99: 71-80.
- Tamagnone L., Comoglio P.M. (2000). Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond. *Trends Cell Biol* 10: 377-83.

- Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274: 1123-33.
- Toker A., Meyer M., Reddy K.K., Falck J.R., Aneja R., Aneja S., Parra A., Burns D.J., Ballas L.M., Cantley L.C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem* 269: 32358-67
- Toker A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front in Biosci* 3: 1134-1147
- Überall F., Giselbrecht S., Hellbert K., Fresser F., Bauer B., Gschwendt M., Grunicke H.H., Baier G. (1997). Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 272: 4072-8
- van Steensel B., van Binnendijk E.P., Hornsby C.D., van der Voort H.T., Krozowski Z.S., de Kloet E.R., van Driel R. (1996). Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J Cell Sci* 109: 787-92.
- Varela-Echavarria A., Tucker A., Püschel A.W., Guthrie S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18: 193-207.
- Wachsstock, D.H., Schwartz W.H., Pollard T.D. (1993). Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophys J* 65: 205-14.
- Walsh F.S., Doherty P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13: 425-56.
- Wang L.H., Strittmatter S.M. (1996). A family of rat CRMP genes is differentially expressed in the nervous system. *J Neurosci* 16: 6197-207.
- Wang, L. H., and Strittmatter, S. M. (1997). Brain CRMP forms heterotetramers similar to liver dihydropyrimidinase. *J Neurochem* 69: 2261-9.
- Weiner O.H., Murphy J., Griffiths G., Schleicher M., Noegel A.A. (1993). The actin-binding protein comitin (p24) is a component of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 123: 23-34.
- Weiss, P. A. (1934). In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *Journal of experimental Zoology* 68: 393-448
- Werth D.K., Niedel J.E., Pastan I. (1983). Vinculin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C. *J Biol Chem* 258: 11423-6
- Winberg M.L., Noordermeer J.N., Tamagnone L., Comoglio P.M., Spriggs M.K., Tessier-Lavigne M., Goodman C.S. (1998). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95: 903-16.
- Wittmann T., Waterman-Storer C.M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* 114: 3795-803

- Woodings, J. A., Sharp S.J., Machesky L.M. (2003). MIM-B, a putative metastasis suppressor protein, binds to actin and to protein tyrosine phosphatase delta. *Biochem J* 371: 463-71.
- Yamakita Y., Ono S., Matsumura F., and Yamashiro S. (1996). Phosphorylation of human fascin inhibits its actin binding and bundling activities. *J Biol Chem* 271: 12632-8.
- Yuasa-Kawada J., Suzuki R., Kano F., Ohkawara T., Murata M., Noda M. (2003). Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *Eur J Neurosci* 17: 2329-43.
- Zhou F.Q., and Cohan C.S. (2001). Growth cone collapse through coincident loss of actin bundles and leading edge actin without actin depolymerization. *J Cell Biol* 153: 1071-84.
- Zhou F.Q. and Cohan C.S. (2004). How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. *J Neurobiol* 58: 84-91.
- Zhou F.Q., Zhou J., Dedhar S., Wu Y.H., Snider W.D. (2004). NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42: 897-912.

## 8. Anhang

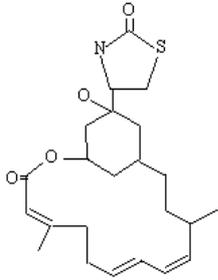
### 8.1. Abkürzungsverzeichnis

|                   |  |
|-------------------|--|
| <b>ADF</b>        | Actin depolymerisierender Faktor                           |
| <b>ATP</b>        | Adenosintriphosphat  |
| <b>BSA</b>        | Bovines Serumalbumin                                       |
| <b>CAM</b>        | Zelladhäsionsmolekül                                       |
| <b>Cdk</b>        | Cyclin abhängige Kinase                                    |
| <b>C. elegans</b> | Caenorhabditis elegans                                     |
| <b>CRAM</b>       | CRMP-3 assoziiertes Molekül                                |
| <b>CRMP</b>       | Collapsin Response Mediator Protein                        |
| <b>Dapi</b>       | 4', 6-Diamidino-2-phenylindol                              |
| <b>db-cAMP</b>    | Dibutyryl cyclisches Adenosinmonophosphat                  |
| <b>DHPase</b>     | Dihydropyriminidase  |
| <b>DMEM</b>       | Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium                       |
| <b>DMSO</b>       | Dimethylsulfoxid   |
| <b>DTT</b>        | Dithiotreitol  |
| <b>E. coli</b>    | Escherichia coli   |
| <b>EDTA</b>       | Ethylendiamintetraacetat                                   |
| <b>EGTA</b>       | Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| <b>FCS</b>        | Fötale Kälber Serum  |
| <b>GFP</b>        | Grün fluoreszierendes Protein                              |
| <b>GSK-3</b>      | Glykogen-Synthase-Kinase 3                                 |
| <b>HEK</b>        | Humane embryonale Nierenzellen                             |
| <b>h</b>          | Stunde   |
| <b>hPa</b>        | Hekto Pascal   |
| <b>IPTG</b>       | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid                 |
| <b>kD</b>         | Kilo Dalton  |
| <b>Lat A</b>      | Latrunculin A  |
| <b>LFA</b>        | Lymphocyten-Funktions-assoziiertes Protein                 |
| <b>MAG</b>        | Myelin assoziiertes Glykoprotein                           |
| <b>min</b>        | Minuten  |
| <b>mm</b>         | Millimeter   |

|                    |   |
|--------------------|---|
| <b>mRNA</b>        | Boten-Ribonucleinsäure                                |
| <b>µm</b>          | Mikrometer  |
| <b>N-CAM</b>       | Neuronales Zelladhäsionsmolekül                       |
| <b>NGF</b>         | Nervenwachstumsfaktor                                 |
| <b>NP</b>          | Neuropilin  |
| <b>OA</b>          | Okada-Säure   |
| <b>PAA</b>         | Polyacrylamid   |
| <b>PAGE</b>        | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                       |
| <b>PAO</b>         | Phenylarsenoxid                                       |
| <b>PBS</b>         | Phosphat gepufferte Salzlösung                        |
| <b>PI-3-Kinase</b> | Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase                        |
| <b>PKA</b>         | Proteinkinase A                                       |
| <b>PKB</b>         | Proteinkinase B                                       |
| <b>PKC</b>         | Proteinkinase C                                       |
| <b>PMA</b>         | Phorbol-12-myristat-13-acetat                         |
| <b>PMSF</b>        | Phenylmethylsulfonyl Fluorid                          |
| <b>ROCK</b>        | Rho-Kinase  |
| <b>SDS</b>         | Natriumdodecylsulfat                                  |
| <b>sec</b>         | Sekunde   |
| <b>Sema 3A</b>     | Semaphorin 3A   |
| <b>t</b>           | Zeit  |
| <b>TEMED</b>       | N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin                   |
| <b>TRITC</b>       | Tetramethylrhodamin Isothiocyanat                     |
| <b>TrkA</b>        | Rezeptor Tyrosin Kinase A                             |
| <b>unc</b>         | Gen für unkoordinierte Bewegung ( <i>C. elegans</i> ) |
| <b>(v/v)</b>       | Volumenverhältnis                                     |
| <b>(w/v)</b>       | Verhältnis Gewicht zu Volumen                         |

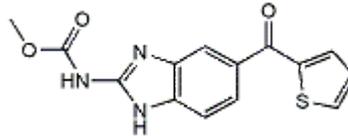
## 8.2. Formeln verwendeter Substanzen

### Strukturformeln von Reagenzien die das Cytoskelett beeinflussen.



Latrunculin A

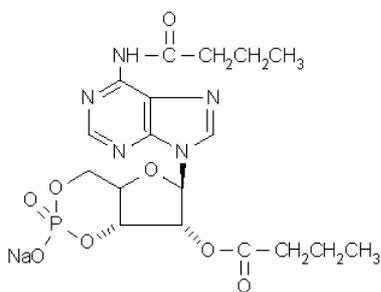
Inhibiert die Polymerisation von Actinmonomeren zu polymeren Actinfasern.



Nocodazol

Inhibiert die Polymerisation Tubulin zu Mikrotubuli.

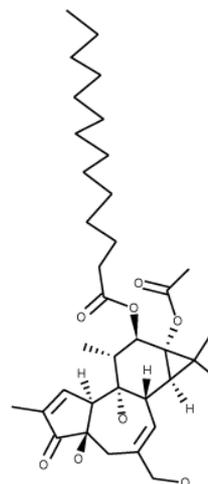
### Strukturformeln von Reagenzien die Proteinkinasen stimulieren.



Dibutyl-cAMP

Wirkt stimulierend auf die Proteinkinase A und regt diese zur Phosphorylierung von Zielproteinen an.

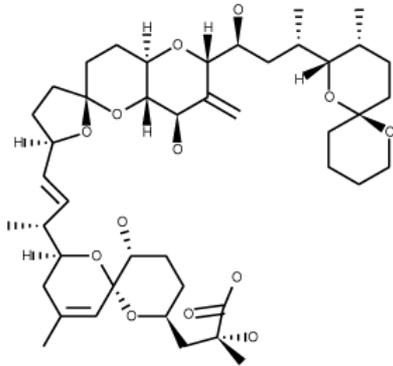
· H<sub>2</sub>O



Phorbol-12-myristat-13-acetat

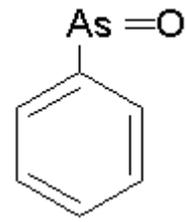
Wirkt stimulierend auf Isoformen der Proteinkinase C und regt diese zur Phosphorylierung von Zielproteinen an.

**Strukturformeln von Reagenzien die Phosphatasen hemmen.**



Okada-Säure

Inhibiert Serin- und Threonin-Protein-Phosphatasen (Protein-Phosphatase 1 und 2A).



Phenylarsenoxid

Inhibiert Tyrosin-Protein-Phosphatase (PTPase).

### 8.3. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

#### Tabellen

- Tabelle 1:** Familien der Zelladhäsionsmoleküle.
- Tabelle 2:** Zusammenstellung von Leitfaktoren des Axonwachstums.
- Tabelle 3:** Homologe und Bezeichnungen der CRMPs.
- Tabelle 4:** Identität zwischen den einzelnen CRMPs, CRAM und DHPase.
- Tabelle 5:** Bekannte Interaktionspartner der CRMPs.
- Tabelle 6:** Verwendete Vektoren.
- Tabelle 7:** Verwendete Antikörper und deren Arbeitsverdünnungen.
- Tabelle 8:** Verwendete Pharmaka und deren Arbeitskonzentrationen.
- Tabelle 9:** Parameter des Kapillaren-Pullers zum Ziehen von Injektionskapillaren.
- Tabelle 10:** Injektionsparameter der Mikroinjektion mit dem Femto-Jet 5247.
- Tabelle 11:** Zusammenstellung der ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson für die Kolokalisation von CRMP-4 und Actin und CRMP-4 und Tubulin.
- Tabelle 12:** Densitometriedaten eines Coomassie Gels zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Interaktion von CRMP-4 mit F-Actin.
- Tabelle 13:** Konzentrationen für CRMP-4, F-Actin und den CRMP-4-F-Actin-Komplex zur Berechnung der Gleichgewichtskonstanten.
- Tabelle 14:** Zusammenstellung der ermittelten Korrelationskoeffizienten nach Pearson bei der Inkubation von B35 Zellen mit Reagenzien, die die Proteinphosphorylierung beeinflussen.
- Tabelle 15:** Übersicht actinbündelnder Proteine.

#### Abbildungen

- Abb. 1:** Umorganisation des Cytoskeletts als Antwort auf ein zellexternes Signal.
- Abb. 2:** Die Klassen der Semaphorine.
- Abb. 3:** Vergleich der Aminosäuresequenzen der CRMPs und deren Übereinstimmung.
- Abb. 4:** Phylogenetischer Baum der CRMPs, CRAM und DHPase.
- Abb. 5:** Vektorkarten der verwendeten Vektoren.
- Abb. 6:** Westernblot Analyse der CRMP-Expression in neonatalem Rattenhirn.
- Abb. 7:** Quantitative Auswertung der Westernblot-Analysen über die Verteilung der CRMPs in Extraktionen aus neonatalem Rattenhirn.
- Abb. 8:** Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation von Triton X-100 extrahierten Membranen aus neonatalem Rattenhirn.

- Abb. 9:** Immuncytochemie von CRMP-4 in corticalen Neuronen der Ratte.
- Abb. 10:** Extraktion von Cholesterol mit Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin aus corticalen Neuronen.
- Abb. 11:** Auswirkung der Cholesterol-Extraktion auf die Wachstumskegel von Neuronen.
- Abb. 12:** Konfokale Bilder von corticalen Neuronen, in denen CRMP-4 und F-Actin angefärbt wurden.
- Abb. 13:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin in corticalen Neuronen.
- Abb. 14:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin nach Behandlung mit Latrunculin A.
- Abb. 15:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin in den Fortsätzen von corticalen Neuronen.
- Abb. 16:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und Tubulin in corticalen Neuronen.
- Abb. 17:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und Tubulin nach Behandlung mit Nocodazol.
- Abb. 18:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und Tubulin nach Behandlung mit Latrunculin A.
- Abb. 19:** Quantitative Bestimmung der Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin nach Behandlung mit Nocodazol.
- Abb. 20:** Mikroinjektion von rekombinantem CRMP-4 in lebenden Zellen.
- Abb. 21:** Analyse der Interaktion von rekombinantem CRMP-4 mit F-Actin in vitro.
- Abb. 22:** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von F-Actin in Abwesenheit und Anwesenheit von CRMP-4 in vitro.
- Abb. 23:** Coomassie-Gel zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Bindung von CRMP-4 an F-Actin.
- Abb. 24:** Diagramm zum Verhältnis von gebundenem und freien CRMP-4.
- Abb. 25:** Quantifizierung der Kolokalisation von F-Actin und CRMP-4 in B35-Neuroblastomzellen.
- Abb. 26:** Auswirkung von Dibutyryl-cAMP auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin.
- Abb. 27:** Auswirkung von Phorbol-12-myristat-13-acetat auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin.
- Abb. 28:** Auswirkung von Okada-Säure auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin.
- Abb. 29:** Auswirkung von Phenylarsenoxid auf die Kolokalisation von CRMP-4 und F-Actin.

- Abb. 30:** Westernblot-Analyse des GFP-CRMP-4-Fusionsproteins.
- Abb. 31:** Expression von GFP-CRMP-4 in corticalen Neuronen.
- Abb. 32:** Expression von GFP-CRMP-Fusionsproteinen in NTera2-Zellen.
- Abb. 33:** Dynamische Umverteilung des GFP-CRMP-4-Fusionsproteins in lebenden Zellen.
- Abb. 34:** Einzelzell-Migration von B35 Neuroblastomzellen nach Transfektion mit CRMP-cDNAs.
- Abb. 35:** Schematische Darstellung eines hypothetischen Transduktionsprozesses, an dem CRMP-4 beteiligt ist.







## Danksagung

Zum Schluss dieser Arbeit möchte ich einigen Menschen danken, die mir durch ihre Hilfe erst ermöglicht haben diese Arbeit zu verfassen.

Ich danke

**PD Dr. Joachim Kappler** für das interessante Thema, das zu bearbeiten war und sein ständig offenes Ohr für Fragen, Problemstellungen und Meinungen. Ebenso danke ich ihm für seine Antworten, Hilfestellungen und die kritische Beurteilung meiner Meinungen.

**Prof. Dr. Michael Hoch** für seine Bereitschaft, diese Arbeit als Co-Referent zu betreuen.

**PD Dr. Stephan Baader** für seine Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie.

**Prof. Dr. Volkmar Gieselmann** für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und konstruktive Ratschläge für diese Arbeit.

Bei **Norbert Rösel** bedanke ich mich für die erstklassige Unterstützung sowohl in technischer wie auch kollegialer Art.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Physiologischen Chemie für das nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken, was die Zeit im Labor sehr angenehm gemacht hat.

Und nicht zuletzt geht ein ganz besonderer Dank an meine Eltern, ohne deren Unterstützung und Vertrauen ich dieses Ziel niemals erreicht hätte.



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne jede unzulässige Hilfe angefertigt habe. Aus fremden Quellen entnommene Gedanken und Daten sind als solche kenntlich gemacht. Diese oder eine ähnliche Arbeit sind von mir noch an keiner anderen Stelle einer Prüfungsbehörde vorgelegt worden. Ich habe vormals noch keinen Promotionsversuch unternommen. Die Ergebnisse dieser Dissertation sind an den aufgeführten Stellen auszugsweise veröffentlicht worden.

**Bonn, den** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Volker Roßlenbroich**