

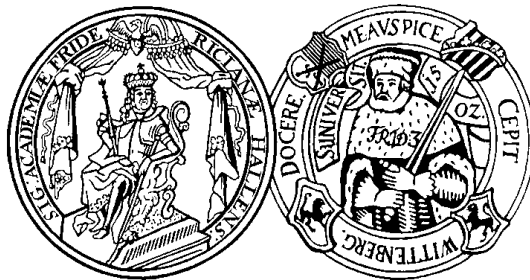
**„Untersuchungen zur Signaltransduktion
des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM)“**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt dem

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von Diplom-Trophologin Juliane Pollscheit
geboren am 19.01.1984 in Magdeburg

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte
2. Prof. Dr. Gabriele Stangl
3. PD Dr. Kerstin Danker

Verteidigung: 14. Januar 2013

Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungen.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 Zelladhäsion	1
1.2 Zelladhäsionsmoleküle.....	2
1.3 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie.....	3
1.4 Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM	3
1.4.1 Molekulare Struktur und Spleißvarianten	4
1.4.2 Funktion und Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression der drei Hauptisoformen von NCAM	6
1.4.3 Posttranslationale Proteinmodifikationen	7
1.4.3.1 Phosphorylierung als Modifikation	7
1.5 NCAM-vermittelte Signaltransduktion	9
1.5.1 Signaltransduktion und Neuritenwachstum.....	10
1.5.1.1 Die Rolle des Rezeptors für den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-Rezeptor) in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion	11
1.5.1.2 Die Rolle der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Fyn und FAK in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion.....	13
1.5.2 NCAM-vermittelte Stimulation von Transkriptionsfaktoren	15
1.5.3 NCAM Mimetics.....	16
1.6 Endozytose NCAMs	17
1.7 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien und Zellkulturmaterialien	20
2.1.2 Organismen.....	20
2.1.2.1 Prokaryotische Organismen	20
2.1.2.2 Eukaryotische Organismen	20
2.1.3 Vektoren	20
2.1.4 Primer und PCR-Reagenzien.....	21
2.1.5 Antikörper	22
2.1.6 Enzyme, Peptide, Kits, Größenmarker, Inhibitoren	23

2.1.7	Medien.....	24
2.1.7.1	Medien für die Bakterienkultur.....	24
2.1.7.2	Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	24
2.1.8	Membranen	25
2.1.9	Lösungen und Puffer	25
2.1.10	Sonstige verwendete Chemikalien und Materialien	28
2.1.11	Geräte.....	28
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Behandlung von Lösungen und Geräten	30
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) [105] [106]	30
2.2.2.2	DNA-Veränderung mittels ortsgerichteter Mutagenese.....	31
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	33
2.2.2.4	Auftrennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese	34
2.2.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution	35
2.2.2.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen [107] [108].....	35
2.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten [109].....	36
2.2.2.8	Plasmidisolierung aus Bakterien	37
2.2.2.8.1	Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse [110]	37
2.2.2.8.2	Chromatographische Isolierung von Plasmid- DNA-Mini- Plasmidpräparation.....	38
2.2.2.9	DNA-Sequenzierung [111].....	39
2.2.3	Mikrobiologische Methoden.....	41
2.2.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i>	41
2.2.3.2	Konservierung von Bakterien	41
2.2.3.3	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA [112].....	42
2.2.4	Zellbiologische Methoden.....	42
2.2.4.1	Allgemeine zellbiologische Methoden für Säugerzellen	42
2.2.4.2	Kultivierung und Passagieren eukaryotischer Zellen	42
2.2.4.3	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	43
2.2.4.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Lipofektion	43
2.2.4.5	Zellzählung	44
2.2.4.6	Differenzierung von Peptid-stimulierten B35-Zelllinien.....	44
2.2.4.7	Differenzierung von B35-Zelllinien unter Zugabe des FGFR1-Inhibitors SU5402	44
2.2.4.8	Differenzierung von Peptid-stimulierten B35-Zelllinien unter Verwen- dung des xCELLigence RTCA Gerätes	45
2.2.4.9	Fokale Adhäsionen Assay.....	46
2.2.5	Biochemische Methoden	47
2.2.5.1	Solubilisierung von Säugerzellen	47

2.2.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford [114].....	47
2.2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [115].....	48
2.2.5.4	Western Blot [116]	48
2.2.5.5	Co-Immunpräzipitation über G-Sepharose- <i>beads</i>	50
2.2.5.6	Oberflächenbiotinylierung von Zellen	50
2.2.6	Statistische Auswertung	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Austausch der Aminosäure Serin gegen Alanin und Asparagin- säure mittels ortsgerechter Mutagenese	52
3.2	Bedeutung der Phosphorylierungsstelle 774 des neuronalen Zellad- häsionsmoleküles (NCAM) bei Signaltransduktionsprozessen	55
3.2.1	Transfektion der NCAM-Konstrukte in B35-Neuroblastomzellen.....	55
3.2.2	Western Blot-Analysen transfizierter B35-Zellen	55
3.2.3	Zelleigenes NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum in transfizierten B35- Zellen.....	57
3.2.4	NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum mit dem multivalenten Peptid C3	57
3.3	Untersuchungen des Neuritenwachstums im <i>xCELLIGENCE Real- Time-Cell-Analyser</i> Gerät	59
3.4	Analyse unterschiedlicher NCAM-induzierter Signalwege	62
3.4.1	Untersuchung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (<i>Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein</i>)	63
3.4.2	Untersuchung des ERK-Signalweges	64
3.4.3	Untersuchung des Fokalen Adhäsions-Kinase (FAK)-Signalweges.....	67
3.4.3.1	Fokale Adhäsionen Assay.....	67
3.4.3.2	Nachweis der FAK-Expression in B35-Zellen mittels Western Blot- Analyse	70
3.5	Untersuchungen zur Endozytose und zum Abbau der unterschied- lichen NCAM-Konstrukte.....	72
4	Diskussion	75
4.1	Untersuchungen zur Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Serin 774 von NCAM bei Signaltransduktionsprozessen	75
4.1.1	Erzeugung von NCAM-Mutanten mittels ortsgerechter Mutagenese.....	76
4.1.2	Stabile Expression der generierten NCAM-Konstrukte in B35-Zellen	77
4.1.3	Untersuchungen zum zelleigenen NCAM-vermittelten Neuritenwachstum in B35-Zellen	77

4.1.4	Untersuchung des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums nach Stimulation mit dem C3-Petid.....	79
4.1.5	Quantifizierung des Neuritenwachstums im <i>xCELLLigence Real-Time-Cell-Analyser</i> Gerät	81
4.2	Untersuchungen der NCAM-induzierten Signalwege	83
4.2.1	Untersuchung der CREB-Aktivierung.....	83
4.2.2	Untersuchungen zum ERK-Signalweg.....	85
4.2.3	Untersuchung des Signalweges über die Fokale Adhäsionskinase	86
4.3	Untersuchungen zur Endozytose und zum Abbau von NCAM	88
4.4	Neues Modell der möglichen Signalweiterleitung zum Transkriptionsfaktor CREB	90
5	Zusammenfassung	93
6	Summary	95
7	Literaturverzeichnis.....	97

Anhang

Veröffentlichungen

Lebenslauf

Danksagung

Eidesstattliche Erklärung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die drei Hauptisoformen NCAMs.	5
Abb. 2: Schematische Darstellung der intrazellulären Sequenz von NCAM 140 (schwarz) und 180 (blau).	9
Abb. 3: NCAM-aktivierte Signalwege, die im NCAM-vermittelten Auswachsen von Neuriten involviert sind.....	15
Abb. 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des C3-Peptides.....	17
Abb. 5: Aufbau des Vektors pRc-CMV-NCAM140	21
Abb. 6: Schematische Darstellung der Mutagenese	33
Abb. 7: Schematische Darstellung der Biotinylierung	51
Abb. 8: Aminosäuresequenzausschnitt aus der cytoplasmatischen Domäne von NCAM.	52
Abb. 9: Kontrolle der Mutagenese-PCR mittels Agarosegelelektrophorese.	53
Abb. 10: Sequenzausschnitt der NCAM-Konstrukte S774A.....	54
Abb. 11: Sequenzausschnitt der NCAM-Konstrukte S774D.....	54
Abb. 12: Nachweis der NCAM-Expression der transfizierten B35-Zellen durch Western Blot-Analyse.....	56
Abb. 13: Neuritenwachstum in B35-Zellen.....	57
Abb. 14: Stimulation des Neuritenwachstums der B35-Zellen mit dem C3-Peptid.	58
Abb. 15: NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum in B35-NCAM140 (WT)-Zellen.....	60
Abb. 16: Zelleigenes NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum in B35-Zelllinien.....	61
Abb. 17: NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum (C3-Peptid) in B35-Zelllinien.	62
Abb. 18: CREB- und Phospho-CREB-Expression transfizierter B35 Zellen.	64
Abb. 19: Vergleich der ERK-Expression transfizierter B35-Zelllinien unter Einfluss eines FGFR1-Inhibitors.	65
Abb. 20: Expression an P-ERK der jeweiligen NCAM-transfizierten B35-Zelllinien unter Einfluss des FGFR1-Inhibitors.	66
Abb. 21: Lokalisierung Fokaler Adhäsionen in den B35-Zelllinien.....	68
Abb. 22: Quantifizierung der Fokalen Adhäsionen in den jeweiligen B35-Zelllinien. ...	70
Abb. 23: Nachweis der FAK-Expression der jeweiligen B35-Zelllinien durch Western Blot-Analyse.....	71
Abb. 24: Abfall der NCAM140-spezifischen Biotinmarkierungen in B35 Zellen.	73
Abb. 25: Halblebenszeiten der einzelnen NCAM-Konstrukte.....	74
Abb. 26: Mögliches Modell der Signalweiterleitung zum Transkriptionsfaktor CREB ..	91

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	21
Tab. 2: Primer für die Sequenzierung.....	22
Tab. 3: Primäre Antikörper	22
Tab. 4: Sekundäre Antikörper.....	22
Tab. 5: Enzyme	23
Tab. 6: Peptide.....	23
Tab. 7: Kits.....	23
Tab. 8: Größenmarker.....	23
Tab. 9: Inhibitoren	23
Tab. 10: Primer für die Mutagenese-PCR.....	32
Tab. 11: Zielkonstrukte und in der ortsgerichteten Mutagenese eingesetzte Primer ...	54
Tab. 12: Anzahl an Fokalen Adhäsionen pro Zelle	69
Tab. 13: Halblebenszeiten der einzelnen NCAM-Konstrukte.	74

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AA	Arachidonsäure
Akt/PKB	Proteinkinase B: Akt
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
B35-Zellen	Neuroblastom-Zellen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
C	Cytosin
CAM	<i>Cell-Adhesion-Molecule</i>
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>Cluster-of-Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHO-Zellen	Chinesische Hamster-Ovarzellen
CEACAM	<i>Carcinoembryonic-Antigen-Related-Cell-Adhesion-Molecule</i>
CNBr	Cyanbromid
CNGs	<i>Rat cerebellar granule neurons</i>
CRE	<i>cAMP-Response-Element</i>
CREB	<i>cAMP-Response-Element-Binding Protein</i>
Cyt	cytosolische Domäne
DAB	<i>3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
DAG	Diacylglycerol
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-Regulated-Kinase</i>

et al.	et altera
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsionen (<i>Focal Adhesions</i>)
FAK	<i>Focal-Adhesion-Kinase</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FGF	<i>Fibroblast-Growth-Factor</i>
FGF-R	<i>Fibroblast-Growth-Factor-Receptor</i>
FN	Fibronektin
fwd	<i>forward</i>
G	Guanin
GAR	<i>Goat-anti-Mouse</i>
GAP-43	<i>Growth-Associated-Protein-43</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDNF	<i>Glia-Cell-Line-Derived-Neurotrophic-Factor</i>
GPI	<i>Glykosyl-Phosphatidylinositol</i>
Grb2	<i>Growth Factor-Receptort-Binding-Protein</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
H ₂ O bidest.	Bidestilliertes Wasser
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM	<i>Intercellular-Adhesion-Molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IgCAM	Immunglobulin-artige Zelladhäsionsmoleküle
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
IP3	Inositoltrisphosphat
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminal Kinase
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LANP	<i>Leucin-Rich-Acidic-Nuclear-Protein</i>
LTP	Langzeit-Potenzierung (<i>long-term potentiation</i>)
maK	Monoklonaler Antikörper
MAG	<i>Myelin-Associated-Glykoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated-Protein-Kinase</i>
MLC	<i>Myosin-Light-Chain</i>

MEK	<i>MAP-ERK-Kinase</i>
MHC	<i>Major-Histocompatibility-Complex</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MSK	<i>Mitogen-and-Stress-Activated-Protein-Kinase</i>
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül (<i>Neural-Cell-Adhesion-Molecule</i>)
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NgCAM	<i>Neuron-Glia-Cell-Adhesion-Molecule</i>
NMR	<i>Nuclear-Magnetic-Resonance</i>
NrCAM	<i>NgCAM-related Cell-Adhesion-Molecule</i>
NGF	Nerven-Wachstumsfaktor (<i>Nerve-Growth-Factor</i>)
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC12-Zellen	Pheochromocytoma-Zellen
PEST	Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S), Threonin (T)
PFA	Paraformaldehyd
PH	<i>Pleckstrin-Homology</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PND	<i>Post-Natal-Day</i>
PNS	Peripheres Nervensystem
PSA	<i>Polysialic acid</i>
PST	Polysialyltransferase
PYK2	<i>Proline-Rich-Tyrosine-Kinase</i>
RAM	<i>Rabbit-anti-Mouse</i>
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROK α	<i>RhoA-binding-Kinase α</i>

rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds-per-Minute)
RPTP α	<i>Receptor-Linked-Protein-Tyrosine-Phosphatase α</i>
RSK	Ribosomale Protein S6-Kinase
RT	Raumtemperatur
RTCA	<i>Real-Time-Cell-Analyser</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium-Dodecyl-Sulfate</i>)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH	<i>src-Homology</i>
SOS	<i>Son-of-Sevenless</i>
SRE	<i>Serum-Response-Element</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
<i>Taq</i>	<i>thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
TOAD-64	<i>Turned-On-After-Division-64</i>
ü. N.	über Nacht
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TRIC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
VASE	<i>Variable-Alternative-Spliced-Exon</i>
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abkürzungen der Aminosäuren

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

1 Einleitung

Das zentrale Nervensystem (ZNS) von Säugetieren besteht aus mehr als 10^{12} Neuronen, die untereinander eine Vielzahl synaptischer Verbindungen eingehen. Um ein komplexes und fein reguliertes Schaltnetz auszubilden, unterliegt die Entwicklung des Nervensystems einer genau aufeinander abgestimmten sowohl räumlichen als auch zeitlichen Kooperation und Koordination von Nervenzellen, die sich spezifisch mit anderen Zellen verbinden. Das Verständnis molekularer Mechanismen, die zielgerichtetes neuronales Wachstum und die Entwicklung spezifischer synaptischer Verbindungen im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS) ermöglichen, stellt eine der größten Herausforderungen in der Neurobiologie dar. Durch das Senden und Empfangen von Signalen und Informationen wird es den Zellen ermöglicht, über spezifische Zell-Zell-Interaktionen ihre korrekten Formen und Positionen innerhalb des Nervensystems einzunehmen. Neben Rezeptoren und Kanälen sind dafür vor allem Zelladhäsionsmoleküle zuständig. Diese ermöglichen Zellkontakte und können Informationen ins Innere der Zelle weiterleiten, empfangen und in Folge dessen entsprechende Reaktionen der Nervenzellen bewirken [1].

1.1 Zelladhäsion

Um die Ausbildung eines komplexen und fein regulierten Schaltnetzes durch die Verbindung von Einzelzellen zu zweckgerechten Verbindungen wie Geweben und Organen gewährleisten zu können, erfordert es einer Erstellung besonders enger und spezifischer Verknüpfungen zwischen den einzelnen Zellen. Der Erfüllung dieses Zweckes dienen spezifische Zell-Zell-Verbindungen. Als Zelladhäsion bezeichnet man den somit über Zelladhäsionsmoleküle bzw. Zell-Zell-Verbindungen vermittelten Kontakt zu einer Nachbarzelle (Zell-Zell-Adhäsion) oder zu Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (EZM) (Zell-Matrix-Adhäsion).

Zelladhäsionsvorgänge sind in vielzelligen Organismen für eine Reihe von Funktionen, z. B. für die Formierung und Erhaltung von Gewebestrukturen, unentbehrlich und waren bereits für die Entstehung der Metazoa notwendig. Die Zelladhäsion nimmt eine wichtige Rolle bei Prozessen, die für die Bildung funktionsfähiger Gewebe und Organe notwendig sind, ein. Zu diesen Prozessen zählen dabei z. B. Proliferation, Differenzierung, Migration und Zellaggregation. Im adulten Organismus sind Veränderungen im Bereich der Zelladhäsion sowohl für zahlreiche physiologische Vorgänge, wie Lymphozytenwanderung, Homöostase und Wundheilung, als auch bei pathologischen Prozessen, wie Tumorentstehung, Tumorwachstum und Metastasierung, essentiell [2].

Die Zell-Zell-Adhäsionsvorgänge spielen in der Histogenese eine entscheidende Rolle für die Ablösung ganzer Zellgruppen, einzelner Zellen aus einem Zellverband (Segregation und Dispersion) und für die Aggregation von Zellen, wohingegen Zell-Matrix-Interaktionen bei der Migration von Zellen überwiegen. In der Differenzierung von Neuronen, beim Auswachsen wie auch bei deren zielgerichteter Lenkung sind beide Zelladhäsionsformen von großer Bedeutung. Entscheidend für einen richtigen Ablauf morphogenetischer Vorgänge sind die zeitliche und räumliche Regulation der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle. Zelladhäsionsmoleküle dienen nicht nur als mechanisch-dynamische Kontaktelemente, sondern können außerdem als Signalvermittler fungieren. Dabei sind sie in der Lage, Signale aus der unmittelbaren Umgebung aufzunehmen und ins Innere der Zelle weiterzuleiten und somit als Adhäsionsrezeptoren zu dienen. Durch eine Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen kann es intrazellulär sowohl zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts als auch zur Initiation von Signaltransduktionsprozessen kommen, welche demnach z. B. auch eine Veränderung der Genexpression bewirken können [3]. Eine Reihe von Adhäsionsmolekülen assoziieren mit Elementen des Zytoskeletts und/oder mit intrazellulären Signalmolekülen, wie Proteinkinasen, Phosphatasen oder mit Adapterproteinen. Sie können jedoch auch selber Kinase- oder Phosphatasedomänen besitzen oder lateral mit anderen Rezeptorproteinen, wie z. B. Rezeptoryrosinkinasen, assoziiert sein [3].

1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind komplex aufgebaute Glykoproteine, die sich durch ihre Größe und Zusammensetzung der Strukturelemente unterscheiden. In der Regel bestehen sie aus einer großen extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer kürzeren cytoplasmatischen Domäne. Neben diesen treten jedoch auch einige andere, u. a. bestimmte Isoformen, auf, welche keine cytoplasmatische Domäne besitzen und über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Rest in der Membran verankert sind. Aufgrund bestimmter Strukturmerkmale lassen sie sich in Gruppen zusammenfassen und in vier große Proteinfamilien einteilen [3]:

1. Cadherine [4]
2. Selektine [5]
3. Integrine [6]
4. Immunglobulin-Superfamilie [7].

Im Rahmen dieser Arbeit soll speziell auf die Immunglobulin-Superfamilie eingegangen werden und dabei insbesondere auf das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM und die NCAM-vermittelte Signaltransduktion.

1.3 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie

Als Immunglobulin-Superfamilie bezeichnet man die größte Familie strukturverwandter Proteine, die über 100 Mitglieder umfasst [7]. Ihr Vorkommen reicht von Vertebraten bis hin zu Invertebraten wie z. B. *Drosophila*. Alle Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie besitzen als typisches Strukturelement mindestens eine Immunglobulin-ähnliche Domäne (Ig) im extrazellulären Proteinbereich. Solche Domänen, die auch für Antikörper kennzeichnend sind, bestehen aus 70 bis 110 Aminosäuren, deren zwei antiparallel bildende β -Faltblätter über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (2 Cysteinreste pro Ig-Domäne) [8]. Die Anzahl der Ig-ähnlichen Domänen kann innerhalb der Ig-Superfamilie stark variieren. Es kommen vier verschiedene Typen von Ig-ähnlichen Domänen vor, Typ C1, C2 und V, die dem konstanten (C) Teil bzw. dem variablen (V) Teil von Immunglobulinen ähneln, sowie der I-Typ (intermediär) [9]. Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie weisen die unterschiedlichsten Funktionen auf. Eine Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie stellen die Zelladhäsionsmoleküle dar. Sie liegen als glykosylierte transmembranäre Proteine vor, welche Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Im Nervensystem spielen sie eine wichtige Rolle beim Auswachsen von Neuriten¹ und der Entstehung und Aufrechterhaltung neuronaler Verbindungen [10]. Viele Vertreter dieser Familie besitzen neben den Wiederholungen von Ig-Domänen ein oder mehrere Fibronectin-Typ-III-Domänen. Bei diesen Domänen handelt es sich um eine 90 Aminosäuren-lange Struktur, die man als erstes in dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin gefunden hat [11]. In diese Gruppe lässt sich das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM einordnen.

Viele Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie vermitteln hauptsächlich homophile Zell-Zell-Adhäsion. Sie sind jedoch auch in der Lage, heterophile Bindungen einzugehen. Diese können sowohl in *cis*- (innerhalb einer Zellmembran) als auch in *trans*-Konstellation (Zell-Zell-Kontakt) erfolgen.

1.4 Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist ein Zelloberflächenglykoprotein, welches der Superfamilie der Immunglobuline angehört und zu den am besten untersuchten

¹ In dieser Arbeit wird Neurit als Oberbegriff für Axone und Dendriten verwendet, da in der Zellkultur in der Regel zwischen ihnen nicht unterschieden werden kann.

und charakterisierten Zelladhäsionsmolekülen gehört. 1977 hat man es erstmals im Nervensystem embryonaler Hühner entdeckt [12] [13]. Kurze Zeit später indentifizierte man auch Spezies-homologe Proteine in der Ratte [14], der Maus [15], dem Rind [16], dem Menschen [17], dem Huhn [18] und im Frosch [19]. Zu den NCAM-ähnlichen Proteinen zählt man das apCAM, ein neurales Zelladhäsionsmolekül im Nervensystem der Meeresschnecke *Aplysia* [20], das Fascilin, ein Zelladhäsionsmolekül im Nervensystem von *Drosophila* [21] und das im Nervensystem des Blutegels exprimierte Zelladhäsionsmolekül [22].

NCAM spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung, wo es bereits im Blastoderm und anschließend in Ektoderm- und Mesodermderivaten, wie der Neuralplatte, dem Neuralrohr und dem Endothel exprimiert wird. Daneben ist es, zusammen mit anderen Zelladhäsionsmolekülen, außerordentlich wichtig in der Formierung von Zellgruppen sowie bei Prozessen der neuronalen Entwicklung, wie z. B. der Migration von Neuroblasten und dem regulierten Auswachsen von Neuriten (siehe Kapitel 1.5.1; [23]). Des Weiteren ist NCAM in verschiedenen Prozessen, wie der Synaptogenese, der synaptischen Verformbarkeit, bei Lern- und Gedächtnisprozessen, sowie Vorgängen der Axonregeneration involviert [24] [25]. Während die NCAM-Expression in den meisten Geweben und Organen im weiteren Entwicklungsverlauf zurückgeht, bleibt NCAM im erwachsenen Organismus hauptsächlich im Nervensystem präsent. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird NCAM von Neuronen, Astrocyten und Gliazellen exprimiert und vermittelt Zelladhäsion zwischen Neuronen untereinander, zwischen Neuronen und Astrocyten und zwischen Astrocyten untereinander [26]. Im peripheren Nervensystem wird NCAM von Neuronen und Schwannzellen synthetisiert.

In den letzten 30 Jahren seit der Entdeckung NCAMs konnte gezeigt werden, dass es nicht mehr als korrekt angesehen werden kann, NCAM lediglich als Zelladhäsionsmolekül zu bezeichnen. NCAM vermittelt nicht nur Zelladhäsion, sondern nebenher noch eine Vielzahl weiterer biologischer Phänomene. Es ist z. B. in vielen *cis*- und *trans*-Interaktionen mit sich selbst und weiteren heterophilen *counter receptors* involviert, wodurch es zur Entstehung von Zell-Zell-Kontakten und Zell-Substrat-Interaktionen kommen kann und daraufhin intrazelluläre Signalwege aktiviert werden können [27].

1.4.1 Molekulare Struktur und Spleißvarianten

NCAM wird von einem singulären aus mindestens 25 Exons zusammengesetzten Gen kodiert, welches bei der Maus auf Chromosom 9 [28] und beim Huhn und dem Menschen auf Chromosom 11, q23 lokalisiert ist [29] [30]. Auf Proteinebene existieren für NCAM im Hirn drei Hauptisoformen, die man aufgrund ihrer apparenten Molekularge-

wichte von 120, 140 und 180 kDa in der SDS-Gelelektrophorese als NCAM 120, NCAM 140 und NCAM 180 bezeichnet [31]. Diese NCAM-Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen [32] [33]. Die beiden großen Isoformen NCAM 180 und NCAM 140 sind transmembranäre Glykoproteine, die sich nur in ihrer Länge der cytoplasmatischen Domäne unterscheiden. NCAM 180 weist ein zusätzliches Insert von 261 - 267 Aminosäuren (~speziesabhängig) auf. NCAM 120 dagegen ist über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran verankert [34]. Allen NCAM-Molekülen gleich ist der extrazelluläre Bereich, der aus fünf Ig-artigen Domänen [35] und zwei membrannahen Fibronektin-Typ-III-homologen Domänen besteht [31] (siehe Abb. 1). In diesem Bereich verfügt NCAM über sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen. Eine einzigartige posttranslationale Modifikation von NCAM stellt die Polysialylierung der N-Glykane der drei Glykosylierungsstellen der 5. Ig-artigen Domäne dar [36]. In der Abb. 1 sind die drei Hauptisoformen NCAMs schematisch dargestellt.

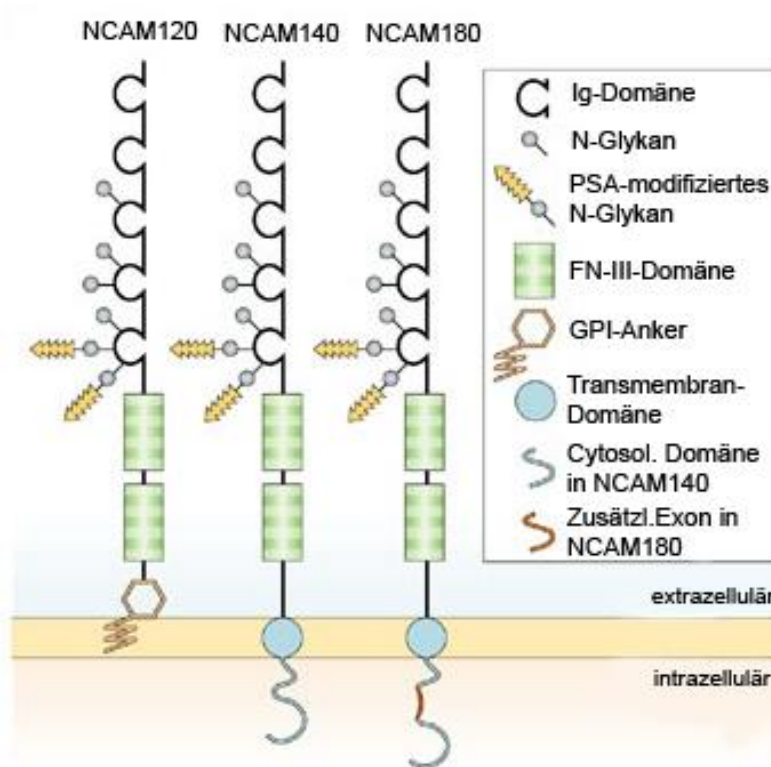


Abb. 1: Die drei Hauptisoformen NCAMs

Allen drei NCAM-Isoformen gleich ist der extrazelluläre Bereich. Die Moleküle NCAM 180 und NCAM 140 unterscheiden sich einzig durch eine in der intrazellulären Domäne lokalisierte Aminosäureabfolge, die vom Exon 18 kodiert wird. NCAM 120 dagegen ist durch einen GPI-Rest in der Membran verankert [37].

Mit Hilfe des alternativen Spleißens ist es möglich, weitere 20 - 30 Isoformen zu generieren, die Varianten der drei Hauptisoformen darstellen [38]. Viele dieser Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der extrazellulären Domäne, manche von ihnen sind Gewebe- oder Entwicklungsstadium-spezifisch [39]. In den NCAM-Transkripten des Hirns befinden sich im kodierenden Bereich für die extrazelluläre Domäne zwei Spleißstellen, die als α und π bezeichnet werden. Das π -Exon, das auch als VASE (*V*ariable-*A*lternative-*S*pliced-*E*xon) bekannt ist, besitzt eine besondere Eigenschaft. Es weist die Kodierung eines zusätzlich zehn Aminosäuren-langen Inserts innerhalb der 4. Ig-artigen Domäne von NCAM auf und ist deswegen interessant, weil es die Funktion von NCAM entscheidend modulieren kann (siehe Kapitel 1.5.1). Die Expression des VASE-Exons wird entwicklungsabhängig reguliert [39] [40]. An der Spleißstelle α zwischen Exon zwölf und Exon 13 können alternativ 15, 48 oder 42 Nukleotide und/oder das Trinukleotid AAG inseriert werden, eine Region die stromabwärts der für die fünfte Ig-artige Domäne-kodierenden DNA liegt [41].

Weiterhin existieren auch lösliche Formen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM, die im Hirn, in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Blut identifiziert werden konnten. Dabei handelt es sich um in den Extrazellularraum entlassene NCAM 120-Moleküle oder durch extrazelluläre Spaltung der transmembranären Isoformen entstehende Moleküle. Neben diesen konnten aber auch intakte transmembranäre Formen identifiziert werden, was auf eine Sekretion dieser Formen hindeutet [42] [43]. Möglicherweise können diese löslichen Formen durch Bindung an zelluläres NCAM die NCAM-vermittelte Zell-Zelladhäsion modulieren [44].

1.4.2 Funktion und Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression der drei Hauptisoformen von NCAM

Die drei NCAM-Isoformen sind nicht homogen auf allen NCAM-exprimierenden Zellen verteilt, sondern können sowohl von verschiedenen Zell-Typen exprimiert werden als auch innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert sein. So erfolgt die Expression von NCAM 140 vor allem im Bereich der Wachstumskegel von auswachsenden Neuriten, wogegen man NCAM 180 an Zell-Zell-Kontakt-Stellen (Soma, Neuriten, Wachstumskegel) akkumuliert vorliegend findet. Aufgrund seiner Assoziation mit dem Zytoskelett wird dem NCAM 180 eine Rolle in der Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte zugeschrieben [45]. Versuche mit *Latex-Beads* lieferten Hinweise dafür, dass Moleküle der EZM direkt oder indirekt die Akkumulation von NCAM 180 in die Zellkontaktbereiche stimulieren [46]. NCAM 140 konnte man auf prä- und postsynaptischen Membranen identifi-

zieren, während NCAM 180 nur auf der postsynaptischen Seite vorkommt. Jedoch exprimieren nicht alle postsynaptischen Membranen NCAM 180 [47].

NCAM 180 ist exklusiv in neuronalen Geweben anzutreffen (im ZNS: Neuronen, Oligodendrocyten, Astrocyten) und wird vermutlich erst exprimiert, wenn die Zellen bereits differenziert sind [45]. NCAM 140 wird dagegen sowohl von Neuronen als auch von Muskelzellen synthetisiert. Das NCAM 120 findet man hauptsächlich auf Gliazellen. Es wird außerdem auch von einigen Neuronen und Muskelzellen exprimiert und tritt in der Entwicklung später in Erscheinung als die beiden anderen Isoformen. Allen Isoformen ist es überein, in bestimmten Membranbereichen, den sogenannten *lipid rafts*, anwesend zu sein. In diesen Membranbereichen, die detergentenresistente Mikrodomänen darstellen, herrscht ein hoher Cholesterin- und Sphingolipid-Gehalt. Während sich das NCAM 120 häufig in *lipid rafts* befindet, lässt sich der größte Anteil der transmembranären Isoformen außerhalb der *lipid rafts* und ein geringer Anteil (2% der NCAM-140-Moleküle) in *lipid rafts* antreffen [48]. Für die Präsenz der transmembranären NCAM-Isoformen in *lipid rafts* sind die vier Palmitoylierungsstellen von Bedeutung [48].

1.4.3 Posttranslationale Proteinmodifikationen

Als posttranslationale Proteinmodifikationen bezeichnet man Veränderungen von Proteinen, die nach der Translation stattfinden. Alle drei NCAM-Isoformen können posttranslational modifiziert werden. Bei Modifikationen im extrazellulären Bereich handelt es sich um Glykosylierungen der Asparaginreste (N-Glykane) sowie um Sulfatierungen der Asparagin-gebundenen Oligosaccharide [49]. Als einzige NCAM-Isoform weist das GPI-verankerte NCAM 120 eine O-Glykosylierung auf, dessen Funktionen auf eine Stabilisierung des NCAMs hinweisen oder aber einen NCAM *turnover* in der Plasmamembran regulieren könnten [50]. Einzigartig für das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist die Polysialylierung der 5. Ig-artigen Domäne. Innerhalb ihrer cytoplasmatischen Domänen können die beiden großen NCAM-Isoformen an Serin- und Threoninresten phosphoryliert werden. Drei der vier möglichen Cysteinreste der cytoplasmatischen Domäne können palmitoyliert werden [51].

1.4.3.1 Phosphorylierung als Modifikation

Als Phosphorylierung bezeichnet man im Allgemeinen eine reversible, enzymatisch katalysierte Einführung einer oder mehrerer Phosphat-Gruppen in organische Moleküle oder Makromoleküle, insbesondere z. B. in Proteine. Die dafür benötigten Enzyme werden als Kinasen bezeichnet. Die Phosphorylierungsreaktionen nehmen eine wichti-

ge Rolle bei der Regulation von biologischen Prozessen in der Zelle ein, wie z. B. bei der Regulation von Proteinaktivitäten oder Signaltransduktionsketten. Aufgrund der Phosphatgruppe kommt es nach der Phosphorylierung folglich oft zu einer Konformationsänderung des Proteins. Das führt dann dazu, dass es zwei verschiedene Formen des Proteins gibt, die je nach Einzelfall aktivierte oder inaktivierte Formen des Proteins darstellen. Neben der Phosphorylierung von Aminosäuren können auch viele Transkriptionsfaktoren, wie z. B. das CREB, auf diesem Wege über spezielle Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden. Es werden hauptsächlich Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert, da sie die dafür notwendige OH-Gruppe in ihrer Seitenkette besitzen. Das Verhältnis der Phosphorylierung von Ser, Thr und Tyr liegt bei 1800 : 200 : 1.

Die intrazelluläre Domäne der NCAM-Isoformen 140 und 180 besitzt laut durchgeführter Analyse mit dem Computerprogramm NetPhos 2.0 mehrere verschiedene Phosphorylierungsstellen. Im NCAM 140 handelt es sich dabei um 5 an Serin und 6 an Threonin, wogegen es im NCAM 180, 28 an Serin und 21 an Threonin sind (siehe Abb. 2).

In früheren Studien ließ sich im Hühner NCAM eine mögliche Phosphorylierung an den in der cytoplasmatischen Domäne befindlichen Serin- und Threoninresten nachweisen [49]. Man vermutete eine Vermittlung über die Casein-Kinase-1 und die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) [52]. In verschiedenen Differenzierungsassays mit PC12-Zellen ließ sich zeigen, dass die Phosphorylierung von NCAM spezifisch für Differenzierungsvorgänge, wie z. B. für das Neuritenwachstum, ist [53]. Eine im Neuritenwachstum bedeutsam involvierte Kinase ist die Protein-Kinase-C [54]. Des Weiteren wird spekuliert, ob mögliche Phosphorylierungen spezifischer Aminosäuren im Bereich der cytoplasmatischen Domäne gleichzeitig die Funktion von NCAM modulieren können. Es wird vermutet, dass die Phosphorylierung von NCAM seine Interaktion mit dem Zytoskelett beeinflussen könnte und dadurch das Neuritenwachstum gefördert werden könnte. Diese Aussage würde das gezeigte Modell von Büttner et al. unterstützen. Dieses besagt, dass das NCAM 180 als Stabilisator von Zell-Zell-Kontakten betrachtet werden kann, da es die Plasmamembran mit dem Zytoskelett verbindet und NCAM 140 das Neuritenwachstum fördert [55]. Diestel et al. haben herausgefunden, dass der einzige cytoplasmatische Tyrosinrest von NCAM, der sich sehr nah der transmembranösen Domäne befindet, im NCAM 180 durch eine bis jetzt noch unbekannt Kinase phosphoryliert werden kann. Das an Tyrosin phosphorylierte NCAM 180 wurde als Stabilisator von Zell-Zell-Kontakten gehandelt und somit wird vermutet, dass diese Form anstelle der Interaktion mit dem Zytoskelett eher eine Funktion im neuronalen Bereich übernimmt [56]. Mit Hilfe spezieller Phosphatasen besteht neben der Phospho-

rylierung von NCAM auch noch die Möglichkeit der Dephosphorylierung. Büttner et al. zeigten, dass NCAM 140 und 180 mit den Proteinphosphatasen 1 und 2A assoziieren [57]. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Proteinphosphatase 1 eine Rolle in der Dephosphorylierung spielt, wohingegen die Funktion der Proteinphosphatase 2A noch ungeklärt bleibt [53].

Ein phosphoryliertes Serin an Position 774 in der intrazellulären Domäne von NCAM wurde neben der NetPhos 2.0 Analyse in mehreren Massenproteomanalysen gefunden [58] [59] [60].

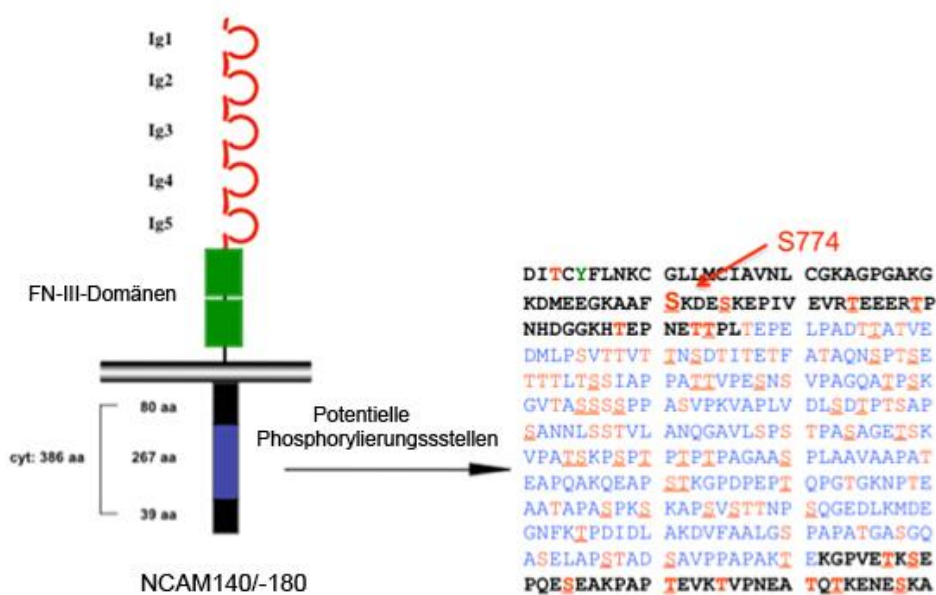


Abb. 2: Schematische Darstellung der intrazellulären Sequenz von NCAM 140 (schwarz) und 180 (blau)

Alle Serin- oder Threoninreste sind rot markiert. Durch NetPhos 2.0 analysierte potenzielle Phosphorylierungsstellen sind dick und unterstrichen dargestellt. Der einzige Thyrosinrest ist grün dargestellt [53].

1.5 NCAM-vermittelte Signaltransduktion

Durch die Beteiligung von NCAM an den unterschiedlichsten Prozessen, wie der Zellwanderung, axonalem Wachstum und synaptischer Plastizität, lassen sich Vermutungen darüber aufstellen, dass NCAM intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert. Ende der 80er-, Anfang der 90er Jahre lieferten erste Studien mit primären Neuronen und PC12-Zellen Hinweise für eine Beteiligung von NCAM an Signaltransduktionsprozessen. In diesen Studien wurde gezeigt, dass eine homophile NCAM-Bindung oder eine Stimulation der NCAM-Moleküle durch NCAM-spezifische Antikörper die Konzentration bestimmter Signalmoleküle in der Zelle ändert. So zeigten Schuch et al., dass eine Zugabe von NCAM- oder L1-Antikörpern zu PC12-Zellen einen

Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, eine Reduktion der intrazellulären Inositolphosphat-Konzentration (IP_2 , IP_3) sowie auch eine Abnahme des intrazellulären pH-Wertes zur Folge hat [61]. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration konnte durch Pertussis-Toxin inhibiert werden, was auf eine Beteiligung von Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteinen an diesem Prozess hindeutet. Gleiche Ergebnisse konnte man bei PC12-Zellen und primären Neuronen beobachten, die man mit löslichem NCAM oder L1 behandelt hat [61].

Entgegen früherer Vorstellungen weiß man heute, dass das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM in vielfältiger Weise an molekularen Wechselwirkungen und Signaltransduktionskaskaden beteiligt ist. Diese Interaktionen, in die NCAM involviert ist, können dabei sowohl homo- als auch heterophiler Natur sein. Bei der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden kommt es zum Weiterleiten NCAM-vermittelter Signale in die Zelle, die daraufhin entsprechend reagieren kann. Das Neuritenwachstum zählt dabei zu den am besten untersuchten Reaktionen von Nervenzellen auf NCAM-vermittelte Signale [27].

1.5.1 Signaltransduktion und Neuritenwachstum

PC12-Zellen oder primäre Neurone wurden auf Monolayern von NCAM/CAM-transfizierten 3T3-Fibroblasten kultiviert. Das daraus resultierende Neuritenwachstum wurde anschließend mit dem Neuritenwachstum von Zellen verglichen, die auf nicht-transfizierten Fibroblasten kultiviert wurden [62]. Mit diesem System wurde demonstriert, dass alle drei Haupt-Isoformen von NCAM als Liganden fungieren können und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum stimulieren.

Die Fähigkeit von Neuronen, Axone auszubilden, ist von ihrem Polysialinsäuregehalt sowie von der An- oder Abwesenheit des alternativ gespleißten VASE-Exons im extrazellulären Bereich von NCAM abhängig [63]. Die Anwesenheit des 10-Aminosäurenkodierenden VASE-Exons, welches sich innerhalb der 4. Ig-Domäne des NCAM-Moleküls befindet, hat ebenfalls einen modulatorischen Einfluss auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum [64] [65] [40]. Trifft man dieses VASE-Exon in NCAM-transfizierten Fibroblasten oder in den Neuronen an, so wird das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum inhibiert. Das VASE-Exon ist in den Hirnregionen, die weiterhin morphologische und synaptische Plastizität zeigen, nicht anwesend und seine Expression ist räumlich beschränkt [66].

In Versuchen, in denen NCAM 120 oder NCAM 140 mit entfernter cytoplasmatischer Domäne in PC12-Zellen überexprimiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die cytoplasmatische Domäne von NCAM für die Initiation der Signaltransduktion und für

die Stimulierung des Neuritenwachstums essentiell ist. Anschließend konnte man diese Zellen nicht mehr durch NCAM zum Neuritenwachstum stimulieren [67].

Durch homophile Wechselwirkungen sind NCAM und andere Zelladhäsionsmoleküle, wie das L1 oder N-Cadherin, in der Lage das Neuritenwachstum zu stimulieren. Im Jahr 1991 konnte gezeigt werden, dass alle drei CAMs über das G-Protein-abhängige Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen des L- und N-Typs in PC12-Zellen Neuritenwachstum stimulieren [68]. Pertussistoxin (hemmt G-Proteine) als auch eine Kombination von L- und N-Typ Ca^{2+} -Kanal-Blockern inhibieren dieses CAM-stimulierte Neuritenwachstum vollständig. Bei allen drei CAMs spielt Ca^{2+} als *second messenger* eine entscheidende Rolle in der Stimulation der Neuritenbildung.

Zwei durch NCAM-vermittelte Signaltransduktionswege, die eine Rolle beim Neuritenwachstum spielen, wurden bisher intensiv untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um den durch NCAM-Stimulation aktivierten FGF-Rezeptor-Signalweg, zum anderen um den Weg, der mit der Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinassen startet. Es wird vermutet, dass beide Signalwege über bestimmte Signalmoleküle miteinander gekoppelt sind. Beide führen zum Ras-MAP-Kinase-Weg und können somit eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB bewirken.

1.5.1.1 Die Rolle des Rezeptors für den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-Rezeptor) in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion

Obwohl NCAM selbst keine intrazelluläre Kinaseaktivität besitzt, ist es dennoch möglich, das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum mit Hilfe eines Tyrosinkinase-Inhibitors zu hemmen. Dieser Tyrosinkinase-Inhibitor hemmt neben der Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinassen das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum, nicht aber das Integrin-vermittelte Neuritenwachstum [69]. Anhand dieser Aussage konnten erste Hinweise dafür geliefert werden, dass es eine Beteiligung einer Rezeptortyrosinkinase in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion gibt und dass verschiedene Rezeptortypen (CAM oder Integrine) unterschiedliche Signalwege nutzen, die Neuritenwachstum induzieren.

Kiselyov et al. gelang es, eine direkte Interaktion von NCAM mit dem FGF-Rezeptor, durch Vermittlung der Fibronectin-Domänen von NCAM und der zweiten und dritten Ig-artigen Domäne des FGF-Rezeptors, nachzuweisen [70]. Die Bindung eines Liganden an NCAM, speziell eine homophile NCAM-NCAM-*trans*-Interaktion, bewirkt eine direkte Interaktion von NCAM mit dem FGF-Rezeptor [70] [71]. Da NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum mit Hilfe verschiedenster Inhibitoren von Rezeptortyrosin-Kinasen zu unterdrücken ist, veranlasste Williams et al. zu der Hypothese, dass NCAM-

vermitteltes Neuritenwachstum allein über den FGF-Rezeptor vermittelt wird [69] [72]. FGF ist alleine dazu befähigt, über die Aktivierung des FGF-Rezeptors Neuritenwachstum zu induzieren und mit Hilfe von Inhibitoren ist es möglich, dieses auch wieder zu hemmen [73]. NCAM verursacht in dieser Theorie die Dimerisierung des Rezeptors und durch die darauf folgende Autophosphorylierung seiner Tyrosinreste die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade, die mit der Stimulierung der Phospholipase $C\gamma$ ($PLC\gamma$) beginnt. Der FGF-Rezeptor interagiert dabei mit einer für seine eigene Funktionalität entbehrlichen Domäne mit NCAM [74].

Die $PLC\gamma$ wird phosphoryliert und hydrolysiert daraufhin das in der Membran verankerte Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) [73]. IP_3 diffundiert durch das Cytosol, bindet an intrazelluläre Ca^{2+} -Kanäle und bewirkt eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Das in der Plasmamembran verbleibende DAG kann entweder die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C (PKC), die sich an der Plasmamembran angelagert hat, aktivieren oder durch die DAG-Lipase in 2-Arachidonglycerol und Arachidonsäure, welche viele *Downstream*-Signalwege induzieren kann, gespalten werden. Arachidonsäure kann wiederum einen Ca^{2+} -Einstrom durch L- und N-Typ Ca^{2+} -Kanäle bewirken [75]. Des Weiteren können die Ca^{2+} -Ionen mit der von DAG-aktivierten PKC interagieren, welche daraufhin eine Reihe von Proteinen phosphorylieren kann. Auf diesem Weg wird z. B. das membranassoziierte, in den Wachstumskegeln und Axonen angereicherte GAP-43 (*Growth-Associated-Protein*) von der PKC phosphoryliert. In unphosphorylierter Form findet man GAP-43 im Komplex gebunden mit Calmodulin vor. Durch die Phosphorylierung von GAP-43 oder der Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin wird eine Dissoziation beider Moleküle bewirkt. GAP-43/Calmodulin-Komplexe führen zu einer Inhibierung der Actinpolymerisierung, wohingegen phosphoryliertes GAP-43 die Actinfilamente stabilisiert [76]. Dies kann als direkte Auswirkung der NCAM-vermittelten Signaltransduktion auf zytoskelettale Umstrukturierungen angesehen werden. Die Wichtigkeit des GAP-43-Proteins im CAM-vermittelten Neuritenwachstum konnten Versuche mit Kleinhirneuronen der GAP-43-Knock-out-Maus zeigen.

Zusammen mit dem Membran-Zytoskelett Linker-Protein Spektrin gehen sowohl NCAM 140 als auch NCAM 180 einen Komplex mit der PKC Isoform $PKC\beta_2$ ein, der in der Lage ist, in lipidhaltige Mikrodomänen, den sogenannten *lipid rafts*, zu wandern [77]. In den *lipid rafts* kann PKC die Aktivierung von Raf bewirken, wodurch eine Verbindung zum MAP-Kinase Signalweg hergestellt wird.

1.5.1.2 Die Rolle der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen Fyn und FAK in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion

Neben der NCAM-vermittelten Signalwirkung über den FGF-Rezeptor vermittelt das neurale Zelladhäsionsmolekül auch FGF-Rezeptor-unabhängig Signalwirkung über Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Dieser Weg, der die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p59^{Fyn} und die Fokale Adhäsionskinase (FAK) einschließt, kann wie der zuvor beschriebene FGF-Rezeptor-abhängige Weg den MAPK (*Mitogen-Activated-Protein-Kinase*)-Signalweg aktivieren und daraufhin das NCAM-induzierte Neuritenwachstum fördern [78].

Als eine wichtige Komponente des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums wurde die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p59^{Fyn} identifiziert. Bei primären Neuronen von Fyn-Knock-out-Mäusen konnte eine komplette Inhibierung des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums gezeigt werden [79]. 1997 konnte erstmals eine Assoziation der Fyn-Kinase mit der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140, aber nicht mit der von NCAM 180 nachgewiesen werden [80]. Nur ein kleiner Teil der von der Zelle exprimierten NCAM 140-Moleküle (3%) ist konstitutiv mit der Fyn-Kinase innerhalb der *lipid rafts* assoziiert. Bodrikov et al. fanden heraus, dass die Interaktion von NCAM mit Fyn über einen dritten Bindungspartner, der Rezeptorprotein-Tyrosin-Phosphatase α (RPTP α) vermittelt wird. RPTP α wird in hohem Maße, wie auch NCAM und Fyn, in Neuronen und an Wachstumskegeln exprimiert und ist weiterhin für die Aktivierung der Kinasen der Src-Familie bekannt [81]. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum sowohl in RPTP α -defizienten Hippocampus-Zellen als auch in Neuronen des Hippocampus, die dominant negative Mutanten von RPTP α exprimieren, reduziert ist.

Die Assoziation einer weiteren Tyrosinkinase, der fokalen Adhäsionskinase (FAK), mit dem NCAM 140-Fyn-Komplex und die Phosphorylierung beider Kinasen wird durch homophile NCAM-Bindung oder durch NCAM-Antikörper ausgelöstes Verbinden von NCAM-Molekülen induziert [80].

Die FAK wird durch Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste Tyr 397 und Tyr 925 aktiviert, wodurch eine Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2 (*Growth-Factor-Receptor-Bound Protein 2*) entsteht [82]. Grb2 kann mit dem Guaninnukleotid-Austausch-Faktor SOS (*Son-of-Sevenless*) interagieren und dadurch eine Aktivierung von Ras induzieren [83]. Die fokale Adhäsionskinase FAK liegt zusammen mit Integrinen lokalisiert in fokalen Komplexen vor und man weiß von ihr, dass sie Integrin-vermittelte Signale mit dem Ras-MAPK-Signalweg verbindet [82] [84]. Es ist bekannt, dass NCAM über die kleine GTPase Ras den MAPK-Signalweg aktiviert, und es wird postuliert, dass dieser durch

NCAM mittels FAK aktivierte Ras-MAPK-Signalweg für die maximal mögliche Stimulation des Neuritenwachstums durch NCAM notwendig ist [27]. Eine mögliche Phosphorylierung und Aktivierung von MEK1 und MEK2 ist die über Raf, welche gleichzeitig ein *Downstream*-Ziel von Ras ist. Schmid et al. konnten zeigen, dass das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in Neuronen, die mit spezifischen Inhibitoren gegen MEK1 und MEK2 behandelt worden sind, gehemmt ist [78]. MEK1/MEK2 sind ihrerseits in der Lage, die MAPK ERK1 (*Extracellular-Signal-Regulated-Kinase*) und ERK2 zu aktivieren. Für PC12-Zellen und primäre Neuronen des Hippocampus konnte eine Aktivierung der MAPK ERK1 und 2 nach physiologischer NCAM-NCAM-Bindung oder nach Stimulation mit einem synthetischen NCAM-Peptid-Liganden erzielt werden [85]. In Versuchen mit Neuroblastomzellen, die eine dominant negative Form von FAK oder Ras exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die NCAM-stimulierte ERK-Aktivierung von der Aktivierung von FAK und Ras abhängig ist. In diesen Zellen konnte nach erfolgreichem NCAM-Clustering eine um 70 % reduzierte Aktivierung der ERK-Kinasen nachgewiesen werden. In Versuchen mit MEK-Inhibitoren oder dominant negativen Formen von FAK oder Ras ließ sich letzten Endes zeigen, dass der FAK-Ras-Raf-MEK-MAPK-Signalweg eine Rolle im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum spielt. Bei einer Inhibierung des MAPK-Signalweges kommt es in primären Kleinhirnneuronen zu einer 60%igen Reduzierung des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums [78] [85].

Da die Inhibition des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums mittels MEK-Inhibitor in den Kleinhirnneuronen unvollständig ist, lässt sich schlussfolgern, dass NCAM auch in der Lage ist, unabhängig vom MAPK-Weg das Neuritenwachstum zu stimulieren, beispielsweise über den FGF-Rezeptor-Signalweg (siehe Kapitel 1.5.1.1).

Der Ras-MAPK-Signalweg ist generell für die Vermittlung des Überlebens von Zellen, des Zellwachstums und der Differenzierung von Bedeutung. Dabei scheint es so, dass die homophile *trans*-Interaktion von NCAM 140 über die Aktivierung des Ras-MAPK-Weges das Überleben der Neurone als auch deren Differenzierung stimuliert.

Zum aktuellen Zeitpunkt der Forschung scheint es zwei Möglichkeiten der Signalweiterleitung von NCAM hin zum Ras-MAP-Kinase-Weg zu geben. Ein Weg führt über die Nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn und der andere über den FGF-Rezeptor. Beide Transduktionswege sind in die NCAM-Signalweiterleitung involviert und bewirken letztendlich eine Phosphorylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB, welcher für das Neuritenwachstum essentiell ist [78] [85] [86]. Weiterhin scheinen sie auch räumlich voneinander getrennt zu sein, da es bisher nicht gelang den FGF-Rezeptor in den *lipid rafts* nachzuweisen [87] [48], wogegen für Fyn und andere Mitglieder der Src-Proteinfamilie eine *raft*-Lokalisation nachgewiesen werden konnte [88].

In Abb. 3 sind die beiden NCAM-vermittelten Signalwege, die in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB enden, schematisch dargestellt.

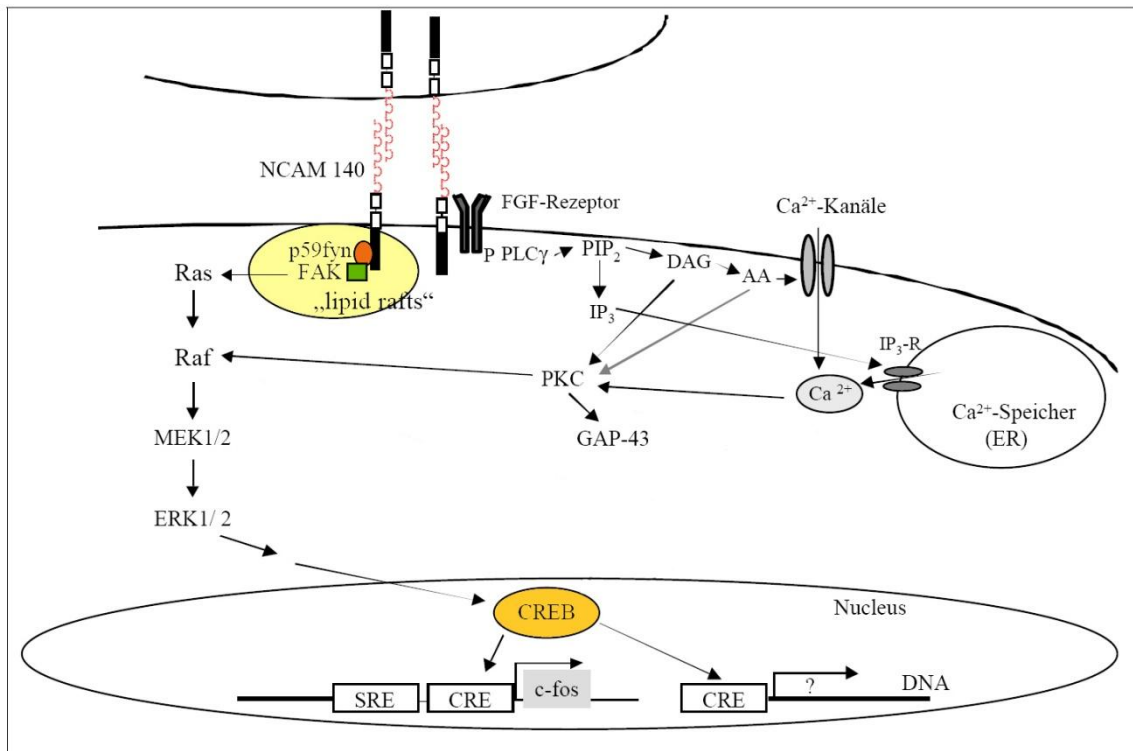


Abb. 3: NCAM-aktivierte Signalwege, die im NCAM-vermittelten Auswachsen von Neuriten involviert sind

1.5.2 NCAM-vermittelte Stimulation von Transkriptionsfaktoren

Mittels NCAM können verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden. Die drei Transkriptionsfaktoren CREB, c-Fos und NFκB spielen dabei im NCAM-stimulierten Neuritenwachstum eine zentrale Rolle. Über eine Aktivierung der Ras-Kinase *downstream* von ERK1/2 [78], die auch als CREB-Kinase bekannt ist, oder durch die MSK1 (*Mitogen and Stress-activated protein Kinase*) [89] ist NCAM vermutlich in der Lage, die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB zu induzieren. Dieser wird dadurch an Serin 133 phosphoryliert und das somit aktivierte CREB fungiert dabei als Transkriptionsfaktor für Gene, welche das cAMP-Response Element (CRE) in der Promotorregion enthalten. Dass dieses phosphorylierte CREB wichtig für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum ist, konnten Jessen et al. zeigen [86]. Neben der Notwendigkeit von CREB in der NCAM-vermittelten Neuritenbildung, ist es weiterhin notwendig für Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung (LTP-Bildung). CREB-Knock-out-Mäuse und NCAM-Knock-out-Mäuse weisen beide Defizite im räumlichen Lernen und Fehler in der Langzeit-Potenzierung (LTP) auf [90].

Das c-fos-Gen ist ein cAMP-Response Element (CRE) enthaltendes Gen, welches für

den Transkriptionsfaktor c-Fos kodiert. Jessen et al zeigten, dass auch aktives c-Fos für das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum notwendig ist [86]. Elk-1 ist ein anderer Transkriptionsfaktor, der direkt durch ERK phosphoryliert wird. Er aktiviert die Transkription des c-fos-Gens über die Bindung an das Serum Response-Element (SRE) im c-fos-Promotor [91].

Neben den genannten Transkriptionsfaktoren scheint NFκB ebenfalls eine Rolle in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion zu spielen [92].

1.5.3 NCAM Mimetics

Aufgrund der Rolle NCAMs während der neuronalen Differenzierung, Entwicklung und Regeneration sowie bei der Gedächtnisbildung und –aufrechterhaltung ist es auf lange Sicht absehbar gewesen, die Funktionen von NCAM zu modulieren, um auf diesem Wege neurodegenerativen Erkrankungen entgegenzuwirken und deren klinische Symptome zu reduzieren. Ein dabei möglicher Weg, die NCAM-Funktionen zu modulieren, ist es, die extrazellulären Interaktionen zwischen NCAM und seinen verschiedenen Liganden und Rezeptoren abzuschaffen oder nachzuahmen. Mit Hilfe synthetischer oder rekombinanter Peptide, welche als NCAM Agonisten oder Antagonisten wirken, konnte dieses Vorhaben umgesetzt werden.

In der Forschung werden diese Peptide einerseits eingesetzt, um neue Erkenntnisse über die NCAM involvierten homophilen Interaktionen und auch intra- und extrazellulären Interaktionen zu erhalten und andererseits, um das Neuritenwachstum und Überleben von Zellen genauer zu charakterisieren. Zu erwähnen wäre hierbei das in dieser Arbeit genutzte C3-Peptid. Dieses C3-Peptid bindet, wie in der Abb. 4 zu erkennen ist, an die erste Ig-Domäne von NCAM mit einer Kd von 10µM und imitiert die homophilen NCAM-NCAM Interaktionen. In vielen Berichten konnte gezeigt werden, dass es Signalwege aktiviert, die ebenfalls durch homophile NCAM-Bindung aktiviert werden können [93] [94] [95] [96]. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, der Phosphorylierung von ERK1/2, PKB/Akt, des Transkriptionsfaktor CREB und auch der Expression von c-Fos bewirkt [27]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es die Differenzierung und Neurogenese induziert, das Überleben von Zellen erhöht, die Synaptogenese fördert und die Proliferation und NCAM-vermittelte Adhäsion hemmt. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass es unter anderem vor teratogenen Effekten schützen kann [27].

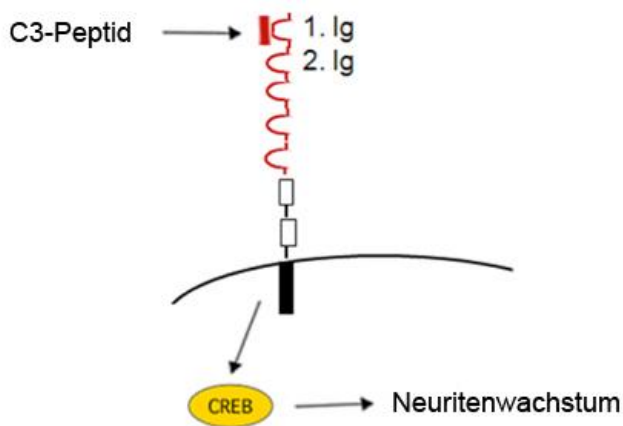


Abb. 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des C3-Peptides

In dieser Abbildung wird die Bindung des C3-Peptides an die erste Ig-ähnliche Domäne des NCAM-Moleküles dargestellt. Diese Bindung initiiert die homophile NCAM-NCAM Interaktion und kann infolge einer Aktivierung des Transduktionsfaktors CREB zu einer Steigerung des Neuritenwachstums führen.

1.6 Endozytose NCAMs

Als Endozytose NCAMs wird ein Mechanismus bezeichnet, welcher dynamisch die Menge der Expression NCAMs an der Zelloberfläche beeinflusst und viele rapide Veränderungen der Expression NCAMs unter verschiedenen physiologischen oder pathologischen Bedingungen zur Folge haben kann. Dieser Mechanismus ist generell entscheidend in der *down*-Regulation von Zelloberflächenmolekülen und für Signaltransduktionsprozesse. Der am besten charakterisierte Endozytosesignalweg ist der Clathrin-abhängige. Neben diesem gibt es auch Clathrin-unabhängige Wege, wie die Caveolae- oder *lipid raft*-abhängige Endozytose, die gut beschrieben sind [97]. In Neuronen ist die Endozytose entscheidend für die korrekten Funktionen von Synapsen. Die Stabilität und Plastizität synaptischer Kontakte zum Beispiel scheint durch die Endozytose von mit dem Zytoskelett assoziierten Proteinen reguliert zu werden. Minana et al. konnten zeigen, dass NCAM in Astrocyten und B35-Zellen Clathrin-abhängig endozytiert wird [98]. Dieser Mechanismus konnte zuvor bereits für die Zelladhäsionsmoleküle L1 [99] und apCAM [100] gezeigt werden. Über die Endozytose von NCAM in Neuronen ist bisher nicht viel bekannt. Diestel et al. zeigten, dass NCAM in Neuronen und Rattenneuroblastomzellen (B35) nach erfolgter Induktion mit einem NCAM-spezifischen Antikörper sowohl Clathrin- als auch Caveolae-abhängig endozytiert werden kann und der größte Teil des internalisierten NCAMs dabei recyclet wird. Weiterhin konnten sie zeigen, dass nach erfolgter Überexpression an Ubiquitin die Endozytose von NCAM erhöht war. Dies führte zur Annahme, dass eine Mono-Ubiquitierung von NCAM an der Plasmamembran ein Endozytose-Signal für

NCAM darstellt [101]. Ob jedoch eine Phosphorylierung innerhalb der PEST-Sequenz neben der Ubiquitinierung ebenfalls eine Voraussetzung für die Endozytose NCAMs ist, konnte man bislang nicht nachweisen. PEST-Sequenzen sind Polypeptidsequenzen, die reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) sind und häufig in Proteinen mit kurzen Halblebenszeiten vorkommen. Sie sollen Signale für eine rapide, intrazelluläre Proteolyse darstellen [102]. In der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140 befindet sich eine PEST-Sequenz, im NCAM 180 dagegen zwei. Das einzige bekannte Motiv mit destabilisierender Wirkung im cytoplasmatischen Bereich von NCAM ist die PEST-Sequenz [101].

Itoh et al. konnten zeigen, dass die Aktivität zahlreicher Proteine, die eine Beteiligung an der Clathrin-abhängigen Endozytose zeigen, über Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert wird und dass reversible Phosphorylierung ein Mechanismus zur Kontrolle der Clathrin-abhängigen Endozytose darstellt [103].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Signaltransduktionswege des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM genauer zu analysieren. Die cytoplasmatische Domäne von NCAM spielt eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung und dem von NCAM-induzierten Neuritenwachstum. Da es beim NCAM-induzierten Neuritenwachstum zu einer verstärkten Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von NCAM kommt, sollte der Einfluss der Phosphorylierung auf die Signaltransduktion von NCAM näher charakterisiert werden. Die als höchste potentiell identifizierte Phosphorylierungsstelle in der cytoplasmatischen Domäne des NCAM 140-Moleküles ist Serin an Position 774. In dieser Arbeit sollte einerseits mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese das Serin an Position 774 gegen Alanin (S774A) ausgetauscht werden, um die Phosphorylierung zu verhindern und andererseits gegen Asparaginsäure ersetzt werden, um eine negative Ladung an die potentielle Phosphorylierungsstelle zu addieren und dadurch eine dauerhafte Phosphorylierung zu imitieren. Anschließend sollten die mutierten NCAM-Varianten in B35-Neuroblastomzellen stabil exprimiert werden, um den Einfluss der Mutation auf das NCAM-induzierte Neuritenwachstum und die Signaltransduktion von NCAM zu untersuchen.

Insbesondere sollten die beiden bekannten Signalwege, die in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB enden, welcher für das Neuritenwachstum essentiell ist, untersucht werden. Dabei handelt es sich zum einen um den durch NCAM-Stimulation aktivierten FGF-Rezeptor-Signalweg und zum anderen um den FGF-Rezeptor-

unabhängigen Weg, welcher mit der Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinase startet [78] [85] [86].

Es ist bekannt, dass die Endozytose und Signaltransduktion von NCAM korrelieren [104]. Aus diesem Grund sollten die Halblebenszeiten von NCAM und den NCAM-Mutanten in B35-Zellen bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Zellkulturmaterialien

Für die durchgeführten Laborarbeiten wurden Chemikalien höchster Qualitätsstufe der Firmen Merck (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), Biochrom (Berlin), Gibco (Detroit, USA) und Sigma (München) verwendet.

Weitere hier nicht aufgeführte Chemikalien und Reagenzien anderer Hersteller sind entsprechend der für sie angewandten Methoden aufgeführt worden.

Des Weiteren wurden Materialien für die Versuche in der Zellkultur von den Firmen Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Corning (New York, USA) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Bei diesen handelte es sich um sterile Einmal-Artikel.

2.1.2 Organismen

2.1.2.1 Prokaryotische Organismen

Escherichia coli

NEB 5-alpha kompetente Zellen mit hoher Effizienz (New England BioLabs®_{Inc.}, USA).

Genotyp: fhuA2 Δ (argF-lacZ)U169 phoA glnV44 ϕ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

NEB 10-beta kompetente Zellen mit hoher Effizienz (New England BioLabs®_{Inc.}, USA).

Genotyp: araD139 Δ (ara-leu)7697 fhuA lacX74 galK (Φ 80 Δ (lacZ)M15) mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)

2.1.2.2 Eukaryotische Organismen

B35

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine Neuroblastom-Tumorzelllinie der Ratte.

Zur Verfügung gestellt wurden sie von der AG Horstkorte (Halle/Saale).

2.1.3 Vektoren

pRc-CMV-NCAM140 und 180

Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese diente der eukaryotische Expressionsvektor pRc/CMV, in den die cDNA für NCAM 140 bzw. NCAM 180 inseriert wurde. In Abb. 5

dargestellt ist der Vektor pRc-CMV-NCAM140. Der Vektor pRc-CMV-NCAM180 unterscheidet sich vom Vektor pRc-CMV-NCAM140 nur durch ein zusätzliches Insert von 801 Basenpaaren, die für die zusätzlichen 267 Aminosäuren von NCAM 180 in der cytoplasmatischen Domäne kodieren.

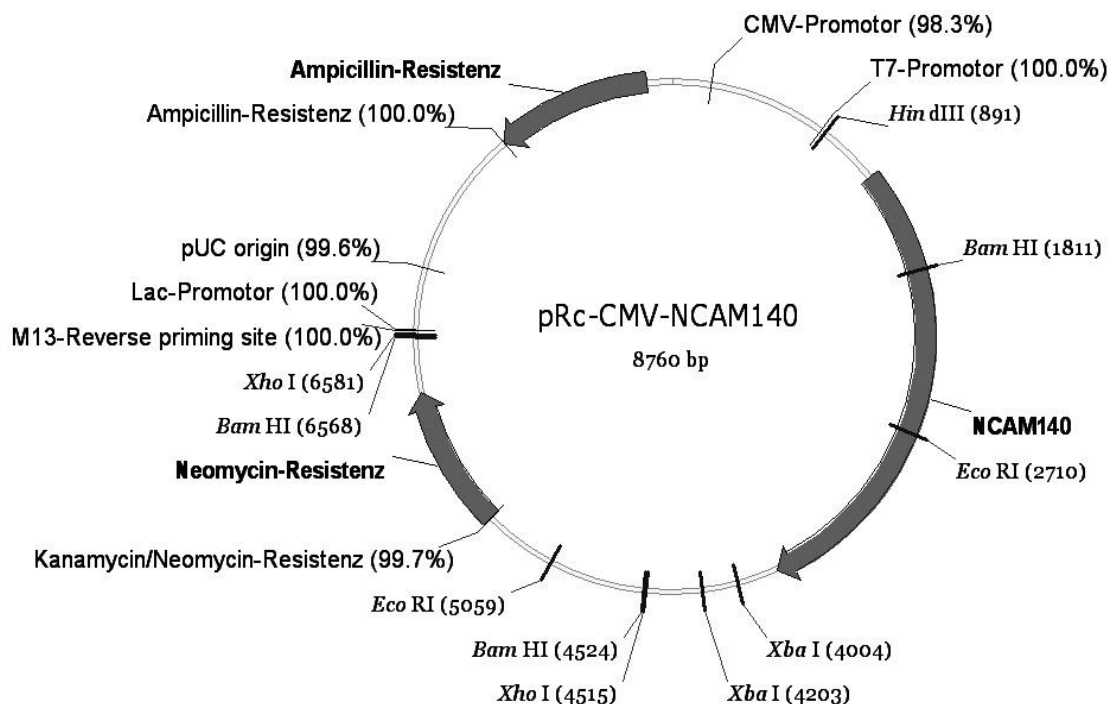


Abb. 5: Aufbau des Vektors pRc-CMV-NCAM140

2.1.4 Primer und PCR-Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der MWG Biotech (München) bezogen.

Tab. 1: Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion

Primer	Sequenz
neuPhos774-rev	5`-GGT TCT TTT GCC TCA TCT TTC G-3`
neuPhos774-for	5`-CAT TGT GGA GGT CCG AAC-3`
test774-rev	5`-CCT CCA CAA TGG GTT CTT TTG A-3`
test774-mitM-rev	5`-CCT CCA CAA TGG GTT CTT TTG C-3`
Phos774-rev	5`-CAG CCT TGC CCT CCT CCA TGT CTT TGC-3`
Phos774-for	5`-CTT TCT CGA AAG ATG AGG CAA AAG AAC CCA TTG-3`
NCAM774D-rev	5`-GGT TCT TTA TCC TCA TCT TTC GAG-3`

Tab. 2: Primer für die Sequenzierung

Primer	Sequenz
Seq-NCAM2400-for	5`-AGG CCT GAG CAC AGG CGG-3`
T7	5`-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3`
Seq 1-ncam	5`-ATG CTG CGA ACT AAG GAT CTC ATC-3`
Seq 2-ncam	5`-ATG CTG TGA TTG TCT GTG ATG TGG-3`
Seq 3-ncam	5`-TGA TGA CAG CTC CGA GCT GAC C-3`
Seq 4-ncam	5`-CTC GAA GTT CAA TAT GCT CCC AAG-3`
Seq 5-ncam	5`-ACA AGG CTG AGT GGA AGT CGC T-3`
Seq 6-ncam	5`-CGC AGA GTA TGA AGT CTA TGT GGT A-3`

2.1.5 Antikörper

Tab. 3: Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-NCAM 5B8 (monoklonal)	1:750	AG Horstkorte, Halle/Saale
Purified mouse anti-Actin Ab-5 mAb	1:5000	BD Biosciences Pharmingen, USA
Anti-β-Tubulin (9F3)	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-GAPDH	1:10000	Millipore, USA
Anti-CREB (48H2) Rabbit mAb	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-CREB	1:1000	Abcam, UK
Anti-Phospho-CREB (Ser133)	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-FGF-Rezeptor 1	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Purified Mouse-Anti-FAK	1:1000	BD Biosciences Pharmingen, USA
Anti-ERK1+ERK2	1:1000	Abcam, UK
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	1:1000	Cell Signaling Technology, USA
Anti-Paxillin	1:750	Millipore, USA

Tab. 4: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-Konjugat)	1:5000	Dianova, Hamburg
Kaninchen-anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat)	1:5000	Dianova, Hamburg
Alexa 488 Ziege-anti-Maus	1:250	Invitrogen™ Carlsbad, USA

2.1.6 Enzyme, Peptide, Kits, Größenmarker, Inhibitoren

Tab. 5: Enzyme

Enzyme	Hersteller
Phusion Master Mix	FINNZYMES, Finnland
Bio-Mix-Red	Bioline, UK
Accu Prime Supermix Pfx	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Benzonase Nuclease	Novagen, Darmstadt
Trypsin	Viralex, PAA Laboratories

Tab. 6: Peptide

Peptide	Hersteller
Peptid#1 (ASKKPKRNIKA)	ICS International Clinical GMBH, München

Tab. 7: Kits

Kits	Hersteller
QIAprep® Spin Miniprep-Kit (250)	Quiagen, Hilden
Plasmid Midi-Kit (100)	Quiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraktions Kit (250)	Quiagen, Hilden
Quick Ligation™ Kit	New England BioLabs, USA
Protein Assay	BIO-RAD, USA
Roti®-Lumin (Chemilumineszenz-Substrat)	Roth, Karlsruhe
BigDye-™ Terminator-Cycle-Sequencing-Kit	Applied Bisystems, UK

Tab. 8: Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
Protein Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (10-250 kDa)	Fermentas, USA
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas, USA
Precision Plus Protein™ Standards (10-250 kDa)	BIO-RAD, USA
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (10-250 kDa)	BIO-RAD, USA

Tab. 9: Inhibitoren

Inhibitoren	Hersteller
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma, München
Phenylmethylsulfonyl Fluorid	Sigma, München
Halt Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, USA
FGFR1-Inhibitor SU5402	EMD Chemicals, USA

2.1.7 Medien

2.1.7.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium

Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH-Wert	7,0 ± 0,2
Herstellung:	25 g Trockenmedium (ROTH) in 1 l H ₂ O bidest.

LB-Agar

LB- Medium + 15 g Agar	
Herstellung:	40 g Trockenmedium (ROTH) in 1 l H ₂ O bidest.

S.O.C. Medium

Das Medium wurde in Form einer Fertiglösung aus einem Kit der Firma Invitrogen™ verwendet.

2.1.7.2 Medien für die Kultivierung eukaryotischer Zellen

<u>DMEM</u>	GIBCO® Detroit, USA
(Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	

Medium für B35 Zellen

10 %	FCS
100 U/mL	Penicillin
0,1 mg/mL	Streptomycin
0,292 mg	L-Glutamin
mit DMEM auffüllen auf 500 mL	

Medium zur Transfizierung von Zellen

OPTI-MEM®	GIBCO® Detroit, USA
Lipofectamine™ 2000 Reagent	Invitrogen™ Carlsbad, USA

Medienzusätze

Antibiotika

Penicillin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Streptomycin	Invitrogen™ Carlsbad, USA

Kanamycin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Ampicillin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
G- 418 Sulphate	PAA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen™ Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Invitrogen™ Carlsbad, USA

Seren

FCS (Fötales Kälberserum)	Viralex, PAA Laboratories
---------------------------	---------------------------

2.1.8 Membranen

Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman®
Whatmanpapier	Whatman®

2.1.9 Lösungen und Puffer**Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**TAE-Puffer :

0,04 M	Tris / HCl, pH 8,5
0,1 %	Eisessig
2 mM	EDTA

Agarosegele:

1 % Agarose in TAE-Puffer

10 x Probenpuffer :

50 %	Glycerin
50 mM	EDTA
0,05 %	Bromphenolblau
0,05 %	Xylencyanol

Auffüllen auf 50 mL mit H₂O bidest.

Lösungen für die SDS-PolyacrylamidgelelektrophoreseGellösungen:

Lösung 1:

1,5 M Tris	36,3 g
0,2 % SDS	4 mL
auffüllen auf 200 mL	pH 8,8

Lösung 2:

0,5 M Tris	12,1 g
0,2 % SDS	4 mL
auffüllen auf 200 mL	pH 6,8

7%ige Trenngellösung

5,25	mL	Acrylamid
5,6	mL	Lösung 1
11,6	mL	H ₂ O bidest.
125	µL	APS (10%)
12,5	µL	TEMED

10%ige Trenngellösung

7,5	mL	Acrylamid
5,6	mL	Lösung 1
9,4	mL	H ₂ O bidest.
125	µL	APS (10%)
12,5	µL	TEMED

4%ige Sammelgellösung

1,6	mL	Acrylamid
3	mL	Lösung 2
7,4	mL	H ₂ O bidest.
48	µL	APS (10%)
12	µL	TEMED

5 x reduzierender Probenpuffer

12,5	%	SDS (w/v)
0,3	M	Tris/HCl, pH 6,8
50	%	Glycerin (v/v)
25	%	DTT
0,015	%	Bromphenolblau (w/v)

10 x Laufpuffer

0,25	M	Tris / HCl, pH 8,8
1,92	M	Glycin
1	%	SDS (w/v) in H ₂ O bidest.

Lösungen für den WesternblotTransfer-Puffer

150	mM	Glycin
20	mM	Tris/HCl, pH 8,3
10 %		Ethanol (v/v)

Ponceaurot-Färbelösung

2 %		Ponceaurot (w/v)
30 %		Trichloressigsäure (v/v)
30 %		Sulfosalicylsäure (w/v)
vor Gebrauch 1:10 in H ₂ O bidest. verdünnen		

Waschpuffer:TBS-Puffer

730	mM	NaCl
27	mM	KCl
4M		TRIS
pH		7,5

TBS-Tween

TBS-Puffer + 0,1 % Tween 20 (v/v)

Blockierungslösung

- 5 % Milchpulver (ROTH)
 5 % BSA (Rinderserum-Albumin)

Lösung für die ImmunpräzipitationImmunpräzipitationspuffer für Zellen

- 10 mM Tris / HCl pH 7,5
 150 mM NaCl
 1 mM CaCl₂
 1 mM MgCl₂
 0,5 mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail
 1 % Triton X-100

Lösungen für die Aufarbeitung von ProteinenSolubilisationspuffer für Zellen

- 1 mM EDTA
 1 mM EGTA
 150 mM NaCl
 20 mM Hepes
 3 mM MgCl₂
 1 mM PMSF
 20 mM β-Glycerolphosphat
 1 mM Natriumfluorid
 1 mM Natriumorthovanadat
 0,5 mM Proteaseinhibitorcocktail
 1 % NP40 (Nonylphenylpolyethylenglycol)
 0,5 % Natriumcholat
 1 % SDS
 pH auf 7,4 einstellen

Lösung zum Fixieren und Anfärben von ZellenFixierungslösung

- 4 % PFA (ROTH) + 0,015 % Saponin
 (ROTH) in PBS

Kristallviolett-Färbelösung

- 0,1 % Kristallviolett
 in H₂O bidest., filtrieren

Puffer für die ZellkulturPBS

150 mM NaCl
 3 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄
 1 mM KH₂PO₄

PBS/EDTA

0,5 g EDTA (=1,34 mM)
 in 1 l PBS lösen

mit H₂O bidest. auf 1 l auffüllen, pH 7,2
 mit NaCl Osmolarität auf 300 mosm
 einstellen

10 x Trypsin-EDTA (Invitrogen™ Carlsbad, USA)

5,0 g Trypsin (1:250)
 2,0 g EDTA-4Na
 8,5 g NaCl/L

2.1.10 Sonstige verwendete Chemikalien und Materialien

EDTA	Sigma, München
<i>E-Plates</i> 16	Roche
Hoechst-Kernfarbstoff	Calbiochem
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Protein G-Sepharose	Sigma
Streptavidin	Thermo Scientific
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Scientific
Triton-X-100	ROTH
Trypanblau	Invitrogen™ Carlsbad, USA
<i>VECTASHIELD</i>	Vector Laboratories, USA

2.1.11 Geräte

Brutschrank (Bakterien)	B 6200 Heraeus
Brutschrank (Zellkultur)	Heracell, Heraeus
Digitalkamera	Coolpix 4500; Nikon
Elisa-Reader	Multiskan Ex, Thermo Electron Corporation
Feinwaage	Satorius
Fluoreszenzmikroskop	Leica

Gelelektrophoresesystem	C.B.S. SCIENTIFIC CO.
Heizblock	Thermomixer 5436, Eppendorf Thermomixer, UNIVERSAL Labortechnik
Imager	Chem Doc XRS System, Molecular Imager Model, BIO RAD
Kühlzentrifuge	Biofuge Fresco, Heraeus
Magnetrührer	FB 1500, Fisher Scientific
Mikroskop	Axiovert 100, Zeiss Telaval 31, Zeiss TSC SP5 II, Leica
Mikrowelle	KOR-6305, Daewoo
PCR-Thermo-Cycler	Mastercycler gradient, eppendorf iQ5 icycler, BIORAD
Pipetten	Transferpette, BRAND
Power Supply	Blue Power 500, SERVA
Schüttelinkubator	innova 4300, New Brunswick Scientific
Spektralphotometer	SPECTRONIC GENESYS 10 BIO
Sterilbank	aura 2000 M.A.C, BIO AIR instruments
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus
Ultrazentrifuge	ZK 300, HERMLE
Vortex	MS2 Minishaker, IKA®
Waage	Denver Instrument
Wasserbad	GFL
<i>xCELLLigence</i> RTCA System	Roche

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung von Lösungen und Geräten

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden durch Autoklavieren (20 Minuten bei 120 °C) oder Erhitzen bei 180 °C sterilisiert und gleichzeitig von DNase-Aktivität befreit. Verwendete Geräte, die nicht hitzestabil waren, sowie Arbeitsflächen wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt. Nicht autoklavierbare Lösungen sind mit den entsprechenden Filtern steril filtriert worden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) [105] [106]

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die exponentielle Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente *in vitro*. Dazu werden Oligonukleotide benötigt, die in gegenläufiger Orientierung flankierend zur amplifizierenden Region an den entgegengesetzten DNA-Strängen hybridisieren. Diese Oligonukleotide dienen demnach als Primer für die DNA-Synthesereaktion und begrenzen den Abschnitt der vervielfältigt werden soll. Sie sollten zwischen 18-22 Nukleotiden lang sein, einen GC-Anteil von ca. 50% und unter 60% aufweisen und in ihren Schmelztemperaturen möglichst nicht stark voneinander abweichen. Der 5' gelegene Primer muss in Sense-Orientierung, der 3' gelegene Primer muss in Antisense-Orientierung vorliegen, d. h. revers komplementär zu der kodierenden Sequenz. Die DNA-Polymerase synthetisiert vom jeweiligen Primer aus in 5'3'-Richtung den komplementären Strang, so dass Sense- und Antisense-Strang synthetisiert werden. Die neu entstandenen Doppelstränge müssen durch Erhitzen zu Einzelsträngen denaturiert werden, damit sie nach einem erneuten Hybridisieren der Primer für die folgende Synthesereaktion als Matrize für die Polymerase dienen können.

Der Reaktionszyklus der PCR, der aus DNA-Denaturierung, der Anlagerung der Primer an die Einzelstränge bei einer spezifischen Hybridisierungstemperatur und der Synthesereaktion besteht, liefert nach jeder Wiederholung eine Verdopplung der vorhandenen Matrizen-DNA und damit eine exponentielle Anreicherung der gewünschten Sequenz.

Auf diese Art und Weise erhält man demzufolge nach einer Anzahl von n Zyklen 2^n Moleküle des zu amplifizierten DNA-Abschnittes.

Für die PCR werden hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien verwendet, welche die Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelstrang-DNA ohne große Aktivitätsverluste wiederholte Male überstehen. Beispiele hierfür wären die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und die Pfu-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*, welche es alle ermöglichen, dass die Kettenre-

aktion in einem Gefäß ohne erneute Zugabe von Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt durchgeführt werden kann. Die meisten Polymerasen machen während der Synthese Fehler, so dass ab und zu ein falsches Nukleotid eingebaut wird. In diesen Fällen setzt die Korrekturlesefunktion der Polymerasen ein, die von der 3'->5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abhängt.

Die Phusion® *High-Fidelity* Polymerase ist eine biotechnisch hergestellte Polymerase, bei der eine neuartige Technologie eingesetzt wird. Bei dieser Polymerase wird ein *Pyrococcus*-ähnliches Enzym mit einer Prozessivitäts-verbesserten Domäne genutzt. Sie schafft es, selbst sehr schwierige und lange *Templates* sehr genau und fehlerfrei zu generieren. Aufgrund dieser extremen Genauigkeit wurde sie in dieser Arbeit für die ortsgerichtete Mutagenese ausgewählt.

2.2.2.2 DNA-Veränderung mittels ortsgerichteter Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese ermöglicht es, mit Hilfe der rekombinanten Gentechnik eine gezielte Veränderung der DNA vorzunehmen. Diese Methode macht es realisierbar, gezielt einzelne Nukleinbasen eines Gens auszutauschen oder sogar ganze Gene zu entfernen. Inzwischen stellt dieses Verfahren eine weit verbreitete Methode in der Molekularbiologie dar, die von der Veränderung eines Gens auf einem Plasmid bis hin zur Knockout-Maus reicht.

Für die Untersuchungen zur Signaltransduktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM) sollten zunächst Mutationen in NCAM 140 und 180-cDNA Konstrukte der Maus eingefügt werden. Das Ziel dabei war es, die im cytoplasmatischen Teil von NCAM befindliche, als höchste potentielle Phosphorylierungsstelle identifizierte Aminosäure Serin 774 zum einen gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin und zum anderen gegen die Aminosäure Asparaginsäure zu ersetzen, die es ermöglicht eine Phosphorylierung vorzutauschen. Um diesen Austausch zu erreichen, wurde das Kodon der cDNA durch gerichtete Mutagenese so verändert, dass es für die Aminosäure Alanin bzw. Asparaginsäure kodiert. Dazu wurde das für Serin 774 kodierende Triplet TCA durch Austausch einer Base in das für Alanin kodierende Triplet GCA bzw. durch Austausch des ganzen Triplets in das für Asparaginsäure kodierende Triplet GAT umgewandelt.

Zur Mutagenese des Ausgangsplasmids pRc/CMV-NCAM140 und 180 wurde das Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Finnzymes verwendet. Mit Hilfe dieser Methode wird es ermöglicht, in ein ungeschnittenes Plasmid mit zwei Oligonukleotidprimern durch Amplifikation mittels PCR eine Mutation einzuführen. Diese beiden Primer wurden so konstruiert, dass sie in ihrer Zusammenstellung die ge-

wünschte Mutation enthalten. Damit wurde erreicht, dass jede in der PCR erzeugte Kopie des Plasmids sie ebenfalls trägt. Die gewonnenen Plasmide sind ungeschlossene DNA-Ringe, sogenannte *nicked circles*, die nach der Transformation von der Bakterienzelle ligiert werden.

Primer Design

Die zur Einführung der Mutationen verwendeten Oligonukleotidprimer sollen hier noch einmal dargestellt werden. Das jeweils rot markierte Basentriplett kodiert die jeweils zu ersetzende Aminosäure Alanin oder Asparaginsäure.

Tab. 10: Primer für die Mutagenese-PCR

Primer	Sequenz
neuPhos774-rev	5`-GGT TCT TTT GCC TCA TCT TTC G-3`
neuPhos774-for	5`-CAT TGT GGA GGT CCG AAC -3`
NCAMS774D-rev	5`-GGT TCT TTA TCC TCA TCT TTC GAG-3

Laut Protokoll des Herstellers sollten sie folgenden Anforderungen entsprechen:

1. Die Primer müssen am 5`-Ende phosphoryliert sein.
2. Ihre Länge sollte zwischen 24 und 30 Nukleotiden liegen und ihre Schmelztemperatur sollte bei 72 °C liegen.
3. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte des Primers liegen, wobei sich optimalerweise 10-15 Basen zwischen dem Ende des Primers und der Mutation befinden sollten.

Ansatz der Mutagenese-PCR

Für die PCR wurden folgende 50 µL-Ansätze mit Reagentien vorbereitet:

- | | | |
|----|----|----------------------------|
| 1 | µL | Template-cDNA (350 pg) |
| 1 | µL | sense Primer (20 pmol) |
| 1 | µL | antisense Primer (20 pmol) |
| 25 | µL | Phusion Mastermix |
| 20 | µL | H ₂ O bidest. |

Der Reaktionsansatz wurde in den PCR-Cycler gegeben und anschließend wie beschrieben durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.2.1).

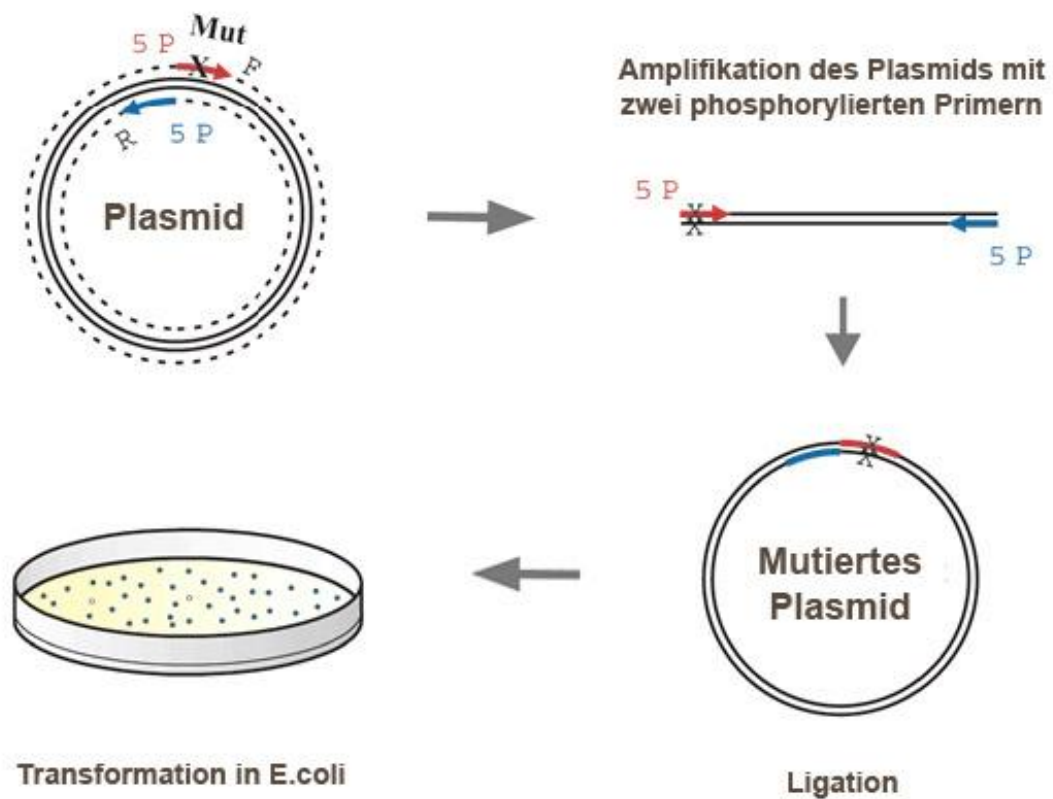


Abb. 6: Schematische Darstellung der Mutagenese

Anlagerung der zwei phosphorylierten Primer mit der gewünschten Mutation.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie wird es ermöglicht, die DNA-Konzentrationen zu bestimmen. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist mit ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Absorption einer DNA-haltigen Lösung wird bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/mL.

Das Absorptionsmaximum für DNA/RNA liegt bei 260 nm, wogegen sich das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm befindet. Aus dem Quotienten OD260/OD280 lässt sich ebenfalls ein Rückschluss auf die Reinheit der DNA/RNA ziehen. Werte unter 1,8 weisen darauf hin, dass die Probe zu viele Proteine enthält, wogegen Werte über 2,0 erfahrungsgemäß darauf hindeuten, dass die Probe wahrscheinlich mit viel RNA bzw. DNA verunreinigt ist. Eine weitere Möglichkeit, die Reinheit und Menge einer DNA-Probe abzuschätzen, ist das Auftrennen der DNA-Moleküle mittels Agarosegel-

elektrophorese (siehe Kapitel 2.2.2.4). Das Auftragen bekannter DNA-Mengen als Standard ermöglicht die Quantifizierung der Probe und somit eine gute Zuordnung von RNA und genomischer DNA im Agarosegel.

2.2.2.4 Auftrennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese

DNA-Moleküle können größenabhängig in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit linearer Moleküle umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist (lineare Moleküle).

Die negative elektrische Ladung der DNA ermöglicht es, in einem elektrischen Feld DNA-Moleküle in Richtung des Pluspols wandern zu lassen und sie somit aufzutrennen. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller bewegt es sich durch die Poren des Gels. Die Zusammensetzung des Gels bestimmt die Größe der DNA-Moleküle, die sich damit auftrennen lassen. Zur Auftrennung kleiner DNA-Moleküle verwendet man höher prozentige Agarosegele, wogegen zur Auftrennung großer Moleküle niedriger prozentige Agarosegele genutzt werden. Um einzelne Banden im Gel sichtbar zu machen, verwendet man Ethidiumbromid (EtBr), welches in die DNA interkaliert und unter UV-Strahlung fluoresziert.

Die Gelelektrophorese wurde zur Größenbestimmung nach Restriktionsverdau, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Qualitätskontrolle von DNA-Proben benutzt. Anhand des Vergleichs mit Standard-Größenmarkern besteht die Möglichkeit, die Größe zu bestimmen. Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgt hauptsächlich in 1%igen Agarosegelen (w/v). Hierzu wurde die Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA) gelöst, nach Abkühlen auf 50 °C in entsprechende Gelschlitten gegossen und mit 1 µL 0,1%igem Ethidiumbromid versetzt. In die noch flüssige Agarose wurde ein Kamm eingesetzt, der nach Erstarren der Agarose und Herausziehen die Taschen für die Proben bildet. Anschließend wurde das Gel in die mit 1xTAE-Puffer, welcher auch mit 1 µL 0,1%igem Ethidiumbromid versetzt wurde, gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Taschen hineinpipettiert. Bei analytischen Gelen betrug das Auftragsvolumen 5-20 µL, bei präparativen Gelen 100 - 200 µL. Als Größenstandard diente die 1 kb-Leiter, von welcher 6 µL (3µg) aufgetragen wurden. Die Elektrophorese wurde bei 70 - 80 V (5 V/cm) durchgeführt, bis die gewünschte Laufstrecke, welche anhand des Bromphenolblaus sichtbar wurde, zurückgelegt war.

2.2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektion

Es besteht die Möglichkeit, DNA-haltige Banden aus Agarose-Gelen auszuschneiden, mit Hilfe von Spezialpuffern zu lösen und anschließend durch QIAgen-Säulchen zu reinigen. Entsprechend des hierfür verwendeten QIAquick® Gel Extraktions Kits (Qiagen, Hilden) wurden die Agarose-Gel-Stücke, nach Ausschneiden aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel unter UV-Licht (366 nm), in drei Gel-Volumen Puffer QG aufgenommen und innerhalb von zehn Minuten bei 50 °C geschmolzen. Puffer QG enthält Salze, welche die Struktur von Nukleinsäuren modifizieren. Anschließend erfolgten die Zugabe von einem Gel-Volumen Isopropanol und das Auftragen der Mischung auf Säulen, welche Silicagel-Membranen enthalten, an die die DNA bindet. Dabei werden Verunreinigungen, wie Primer, Salze, nicht inkorporierte Nukleotide, Enzyme, Agarose, Ethidiumbromid, Detergenzien und Öle, nicht gebunden bzw. mit dem Ethanol-enthaltenen Puffer PE quantitativ entfernt. Die Elution erfolgte anschließend unter basischen Bedingungen mit Hilfe des Puffers EB, der wenig Salz enthält oder mit sterilem H₂O bidest.

2.2.2.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen [107] [108]

Bakterien, Phagen, Archaeobakterien und Viren eukaryotischer Algen besitzen als Schutzmechanismus gegen Eindringlinge ein Markierungs- und Restriktionssystem, das die eigene DNA durch Methylierung schützt und fremde DNA, die ein anderes Methylierungsmuster trägt, erkennt und schneidet. Die Enzyme Methylase und Restriktionsendonuklease sind vielfältig und werden standardmäßig als Werkzeuge in der Molekularbiologie eingesetzt. Die am meisten verwendeten Restriktionsendonukleasen der Klasse II sind gewöhnlich Homodimere, die spezifische Sequenzen, innerhalb derer sie schneiden, erkennen. Die Erkennungssequenzen sind meist palindromische Nucleotide von 4 bis 8 bp Länge, unterbrochene Palindrome oder auch mehrdeutige Palindrome. Endonukleasen können Phosphodiesterbindungen im Inneren eines DNA-Moleküls spalten, wobei ein 5'-Phosphat- und ein 3'-Hydroxyl-Ende entstehen. Die meisten DNA-Sequenzen werden von mehreren Enzymen erkannt und geschnitten. Eine Reihe von Restriktionsenzymen spalten beide DNA-Stränge in der Mitte der Erkennungssequenz, so dass glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Zahlreiche andere Endonukleasen schneiden die DNA aber nicht genau an derselben Stelle. Die Schnitte sind in der Regel um zwei bis vier Nukleotide versetzt, so dass an den DNA-Fragmenten kurze überstehende Einzelstrangabschnitte entstehen. Diese Stücke nennt man auch klebrige, überhängende oder kohäsive Enden (*sticky ends*), weil durch Basenpaarung die Molekülfragmente wieder zusammenkleben.

Jedes einzelne Enzym hat seine bevorzugten Reaktionsbedingungen. Daher ist es nicht möglich, allgemeine Reaktionspuffer für die Spaltreaktion einzusetzen. Die meisten in der Gentechnik verwendeten Restriktionsenzyme arbeiten bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH von 7,4 sehr gut und benötigen dazu noch Mg^{2+} und spezifische Ionenstärken. Die Herstellerfirmen liefern deshalb meist zusätzlich zu den Enzymen auch spezielle Puffer mit, die spezifisch für jedes Enzym sind, damit die Spaltung der DNA unter optimalen Bedingungen ablaufen kann. Herrschen für zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme die gleichen Bedingungen für die DNA-Spaltung, so besteht die Möglichkeit zur Durchführung eines Doppelverdaus. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die entstehenden Enden keine komplementären Enden sind, da dies sonst zu einer Religation der DNA führen würde.

Eine Einheit (1 U) des Enzyms wird als die Menge definiert, die 1 μ g DNA des Phagen λ in einer Stunde spaltet. Die Restriktionsspaltungen erfolgten immer entsprechend der vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

Beispiel eines Doppelverdaus (20 μ L Ansatz):

5	μ L	DNA-Probe
4	μ L	2fach Reaktionspuffer (Typ-abhängig vom verwendeten Enzym)
9	μ L	H ₂ O bidest.
1	μ L	Restriktionsenzym (z. B. BAMHI)
1	μ L	Restriktionsenzym (z. B. HINDIII)

Der Verdau wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Bei der Durchführung eines Verdau über Nacht wurde nur 0,1 U des Enzyms eingesetzt, um unspezifische DNA-Spaltung zu vermeiden. Die Reaktion sollte anschließend durch Hitze gestoppt werden, da die meisten Enzyme durch Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten inaktiviert werden. Das ist jedoch ebenfalls unterschiedlich, da einige Enzyme etwas höhere Temperaturen benötigen.

Der Restriktionsverdau wird anschließend durch DNA-Gelelektrophorese analysiert und die Fragmente werden durch Elution aus präparativen Gelen gereinigt.

Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wurde bei der Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten [109]

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mithilfe einer Ligase wird als Ligation bezeichnet. Die T4-DNA-Ligase stammt aus dem T4-

Bakteriophagen. Sie katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden in doppelsträngiger DNA oder RNA. Der Einsatz von Polyethylenglycol erhöht die Effizienz bei der Ligation von glatten Enden enorm (empfohlene Endkonzentration 5 % w/v). Die Inaktivierung der Ligase, bei 65 °C für zehn Minuten nach erfolgter Reaktion vor der Transformation der Zellen, wird als Standardmethode empfohlen und erhöht die Transformationseffizienz beträchtlich. Für die Ligation von kleinen DNA-Fragmenten in größere linearisierte Plasmide setzt man das kleinere Fragment in mindestens 3-fachem molarem Überschuss zum Plasmid ein. Erfolgt die Linearisierung des Plasmids mit nur einem Restriktionsenzym, müssen die entstandenen Enden vor der Ligation dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Ligationen erfolgten unter Anwendung der Quick T4-DNA-Ligase des Quick Ligations™ Kits (New England BioLabs, England) bei vorzugsweise 25 °C für 15 Minuten.

Der Ansatz hierzu bestand gewöhnlich aus 1 µl Quick T4-DNA-Ligase (10 U), 2 µl 10x Quick Ligationspuffer, 50 ng Plasmid und dem 3-fachen molaren Überschuss an Insert, aufgefüllt auf 10 µl mit sterilem H₂O bidest.. Ein Teil des Ligationsansatzes wird für die Transformation von chemisch-kompetenten Zellen eingesetzt.

2.2.2.8 Plasmidisolierung aus Bakterien

2.2.2.8.1 Plasmidisolierung mittels alkalischer Lyse [110]

Die alkalische Lyse beruht darauf, dass in einem engen pH-Bereich, die nicht-überspiralisierte DNA (Bakterienchromosom) denaturiert wird, überspiralisierte Plasmide hingegen jedoch nicht. Bei pH-Werten von 12 bis 12,5 kommt es in nicht-überspiralisierten DNA-Molekülen zum Auflösen der Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch die Doppelhelix entwunden wird und sich die beiden DNA-Stränge trennen. Setzt man ihnen anschließend Säure zu, lagern sich die denaturierten Stränge der Bakterien-DNA zu einer verworrenen Masse zusammen, die unlöslich ist und sich durch Zentrifugieren leicht entfernen lässt. Im Überstand bleiben dann nur noch Plasmide zurück. Das Verfahren weist jedoch noch einen weiteren Vorteil auf. Wenn man die Zellen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert und die Reaktion anschließend mit Natriumacetat neutralisiert, werden auch Proteine und RNA zum größten Teil unlöslich, so dass man sie ebenfalls durch Zentrifugieren leicht beseitigen kann.

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die sogenannte Minipräparation durchgeführt. Von einer 4 mL Bakterien-Übernacht-Kultur wurden 1,5 mL in ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (13000 rpm, 3 Minuten, RT). Das Bakterienpellet wurde anschließend in 200 µL Lösung A aufgenommen. Das in Lösung A ent-

haltene EDTA entfernt die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhülle unentbehrlichen Mg^{2+} -Ionen und hemmt die DNA-abbauenden Enzyme. Anschließend werden 200 μ L Lösung B dazugegeben und vorsichtig durch sechs bis achtmaliges Schwenken des Eppendorfgefäßes gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In Lösung B befindet sich das Detergenz SDS, welches durch Entfernen von Lipidmolekülen aus der Zellmembran das Auflösen unterstützt. Dann wurden 200 μ L Lösung C zugegeben, durch erneutes Schwenken der Gefäße gemischt und etwa zehn Minuten auf Eis inkubiert. Das in Lösung C enthaltene NaAc dient zur Neutralisation der Lösung. Bei dem letzten durchgeführten Schritt kommt es zum Ausfallen von Bakterien-DNA, Proteinen und RNA. Danach erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 10 Minuten, RT), wobei die Plasmid-DNA im Überstand zurückblieb. Der Überstand wurde nun in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert (zwei bis fünf Minuten, RT). Anschließend wurde wieder zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten, 4 °C) und das DNA-Pellet mit 1 mL 70 %igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20 - 50 μ L sterilem H_2O bidest. aufgenommen. Mit dieser Methode wurden durchschnittlich 2 – 4 μ g Plasmid-DNA aus 1 mL Bakterienkultur isoliert.

Lösungen für die Plasmidpräparation

Lösung A	50 mM Tris- HCL, pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 μ g/ mL RNase A
Lösung B	200 mM NaOH
	1 % SDS (w/v)
Lösung C	3 M Natriumacetat
	mit Essigsäure auf einen pH 5 einstellen

2.2.2.8.2 Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA-Mini-Plasmidpräparation

Die Minipräparation ist vorschriftsmäßig laut Anweisung des QIAprep® Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt worden. Diese Methode basiert ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [110], wobei sich noch zusätzlich eine säulenchromatographische Aufreinigung der DNA anschließt. Dabei wird die DNA an eine Silicagel-Membran gebunden, wogegen jedoch Verunreinigungen wie Nukleotide, Enzy-

me, Salze, Öle und Detergenzien nicht gebunden bzw. mit ethanolhaltigem Puffer ausgewaschen werden. Am Ende der durchgeführten Präparation wird die DNA mit sterilem H₂O bidest. eluiert.

Midi- und Maxi-Plasmidpräparation

Für die Isolierung größerer Mengen (100 oder 500 µg) an Plasmid-DNA wurde eine Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparation mit Hilfe des Plasmid Midi-Kits durchgeführt. Die Plasmidisolierung erfolgte nach Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden) und der von ihm bereitgestellten Materialien. Diese Methode geht ebenfalls auf die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly zurück, dem sich eine zusätzliche säulenchromatographische Aufreinigung der DNA anschließt. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um ein Anionen-Austauscher-Harz, an welches die DNA bei geringen Salzkonzentrationen und niedrigem pH bindet. Durch Erhöhung des pH-Wertes und der Salzkonzentration kann die Plasmid-DNA eluiert werden.

Am Anfang wurden 30 bzw. 100 mL einer Übernachtskultur abzentrifugiert und das entstandene Pellet in 4 bzw. 10 mL Lösung P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 bzw. 10 mL Puffer P2 und vier- bis sechsmaligem Schwenken erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach darauf folgender Zugabe von 4 bzw. 10 mL Puffer P3 zur Lösung und erneutem Schwenken zur Durchmischung erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (7000 rpm, 15 Minuten, RT), bei dem gefällte Proteine und die genomische DNA sich als Pellet absetzen. Der Überstand wurde dann erneut zentrifugiert (11000 rpm, 15 Minuten, RT). In der Zwischenzeit wurden die Qiagen-Säulen mit 4 bzw. 10 mL QBT Puffer äquilibriert und der Plasmid-haltige Überstand anschließend auf die Säulen gegeben. Nach Passieren der Säule per Schwerkraft wird diese zweimal mit 10 bzw. 30 mL QC-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 bzw. 15 mL QF-Puffer. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 0,7 V Isopropanol (RT) gefällt und für 30 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellets durch erneutes Zentrifugieren, wurde es in 100 bzw. 300 µL H₂O aufgenommen.

2.2.2.9 DNA-Sequenzierung [111]

Alle Sequenzierungen wurden gemäß der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Bei dieser Methode findet zunächst eine Synthese des komplementären Stranges statt, der den DNA-Abschnitt enthält, der sequenziert werden soll. Wie bei einer gewöhnlichen

PCR werden hierfür ebenfalls Primer und Desoxynukleotide (dNTP) benötigt. In dem Reaktionsansatz befindet sich jedoch zusätzlich noch ein abgewandeltes Nukleotid, welches in den wachsenden Polynukleotidstrang ebenso wirksam eingebaut wird wie ein normales Nukleotid, jedoch die weitere Synthese des Stranges verhindert. Dieser Schritt erfolgt, weil dem Didesoxynukleotid (ddNTP, z. B. ddATP) die Hydroxylgruppe in der 3'-Position des Zuckeranteils fehlt und diese Gruppe für die Anheftung des folgenden Nukleotids benötigt wird. Demzufolge bricht die Kette also immer dann ab, wenn ein ddNTP eingebaut wird. Die Synthesereaktion läuft viermal parallel ab, in jedem Ansatz befindet sich ein anderes Didesoxynukleotid (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP). Da in jedem Ansatz jedoch auch die normalen dNTPs enthalten sind, entstehen z. B. in einem ddATP-Ansatz viele unterschiedlich lange Polynukleotidstränge, die alle auf ein ddATP enden. Die einzelnen Polynukleotidstränge werden anschließend in einem 6%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und analysiert. Mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen ist es möglich, die einzelnen Polynukleotidstränge und somit die Sequenz des amplifizierten DNA-Abschnittes in einer automatischen Sequenziervorrichtung zu analysieren. Bei dieser Methode bestehen jedoch zwei Möglichkeiten: Entweder benutzt man infrarotfluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer (IRD700 oder IRD800) oder man verwendet fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. In dieser Arbeit wurde die zweite Möglichkeit zur Sequenzierung genutzt.

Sequenzierung mittels markierter Didesoxynukleotide

Es wurden 20 - 400 ng Template-DNA eingesetzt und mit 10 pmol eines Primers, 1,5 µl 5-fach BigDye-Lösung und 1,5 µL BigDye-Sequenzierungspuffer des BigDye™ Terminator-Cycle-Sequencing-Kits (Applied Biosystems, UK) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Um längere (≥ 500 bp) Abschnitte sequenzieren zu können, war es notwendig mehrere Ansätze mit den entsprechenden Primern zu machen, da pro Ansatz nur ein Primer verwendet werden konnte und die maximale Sequenzierlänge bei 400 - 500 bp lag. Nach der Sequenzierungs-PCR (2 Minuten 94 °C, 25 Zyklen: 10 sec 94 °C/ 15 sec x °C (Temperatur richtet sich nach den eingesetzten Primern)/ 4 Minuten 60 °C) wurden die Proben durch Ethanolpräzipitation gereinigt. Die eluierte DNA wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in dem Eppendorfgefäß zum Sequenzieren an ein zuständiges Institut weitergegeben.

Aufreinigungsschritte bei der Ethanolpräzipitation

Die aus dem PCR-Cycler entnommenen Proben wurden im ersten Schritt zunächst mit

80 µL	H ₂ O bidest.
10 µL	3 M NaAc
250 µL	96%igem EtOh

versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie für 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun verworfen und es erfolgte im zweiten Schritt die Zugabe von

250 µL	70%igem EtOH
--------	--------------

mit folgender fünfminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur und anschließender zehnminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm. Der hier entstandene Überstand wurde ebenfalls wieder durch „Absaugen“ verworfen und das Pellet wurde nun, wie oben beschrieben, bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium, dem nach Bedarf Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt wurde. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich dabei nach dem integrierten Resistenzgen. Die Kulturen wurden bei 37 °C auf Festmedium (1,5 % Agar in LB) oder in Schüttelkulturen mit 220 rpm inkubiert. Bei den Flüssigkulturen sollte beachtet werden, dass die Bakterien in ihren Kultivierungsgefäßen mindestens 2/3 Gasraum über der Flüssigkeit haben sollten, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff während der Inkubationszeit gewährleisten zu können. Ausgangsmaterial zum sterilen Beimpfen von Kulturen waren Einzelkolonien einer Kulturplatte.

2.2.3.2 Konservierung von Bakterien

Bakterienkolonien können auf Agarplatten bei 4 °C für ca. 6 Wochen gelagert werden. Für eine längerfristige Konservierung der Bakterien eignet sich die Anfertigung von Glycerin-Stocks, in denen man die Bakterien für mehrere Monate bei –80 °C lagern kann. Dazu wurden Übernachtskulturen mit 20 % sterilem Glycerin (v/v) versetzt, gut gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend in Form von Aliquots bei –80 °C eingefroren. Das Glycerin dient hierbei als „Frostschutzmittel“. Die Glycerin-Stocks sollten nicht aufgetaut und ein erneutes Mal eingefroren werden. Es

besteht jedoch die Möglichkeit, mit einer Impföse aus den gefrorenen Glycerin-Stocks etwas abzukratzen und anschließend auf Agarplatten auszustreichen. Von den angewachsenen Kolonien auf der Platte kann man immer wieder neue Flüssigkulturen ziehen. Auch Flüssigkulturen sind einige Wochen bei 4 °C lagerfähig.

2.2.3.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA [112]

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Bakterien. Sie erfolgte nach der Hitzeschock-Methode von Sambrook et al.. Dafür wurden 50 µL chemisch-kompetenter Zellen langsam auf Eis aufgetaut und anschließend vorsichtig mit dem halben oder ganzen Ligationsansatz bzw. 0,1 - 0,5 µg Plasmid-DNA gemischt. Der Ansatz wurde nun für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Gefolgt von einem anschließenden Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C und einer Abkühlphase von ca. 5 Minuten, ebenfalls noch einmal auf Eis, ist der Ansatz nun mit 250 µL SOC-Medium versetzt und für eine Stunde im Thermomixer bei 37 °C geschüttelt (225 rpm) worden. 50 - 200 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf Selektionsplatten (LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und kopfüber bei 37 °C ü. N. inkubiert. Der restliche Ansatz kann bei 4 °C aufbewahrt und später noch ausplattiert werden.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Allgemeine zellbiologische Methoden für Säugerzellen

Alle durchgeführten Arbeiten mit Säugerzelllinien wurden in steriler Atmosphäre unter einer Zellkulturwerkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung. Alle mit ihnen durchgeführten Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1000 rpm für 3 Minuten.

2.2.4.2 Kultivierung und Passagieren eukaryotischer Zellen

B35-Zellen sind adhärent wachsende Zellen, die in Medium in unbeschichteten Kulturflaschen/Schalen kultiviert und je nach Zelldichte kurz vor der Konfluenz im Verhältnis von 1:3 bzw. 1:4 alle zwei bis drei Tage passagiert und verdünnt wurden. Hierzu wurden die Zellen, nachdem sie vorher mit PBS gewaschen und mit Medium abgelöst wurden, aus der Kulturflasche in Falconröhrchen überführt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, die Zellen mit einer Kanüle vereinzelt und anschließend wieder in ein mit frischem Medium versetztes Kulturgefäß überführt.

2.2.4.3 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Auch Säugerzellen können über einen längeren Zeitraum konserviert werden. Dazu werden frisch gewaschene und pelletierte Zellen in Serum (FCS) mit 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen und die Zellsuspension in ein Einfrierröhrchen überführt und langsam bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für einige Stunden gefroren. Danach können sie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, die Einfrierröhrchen in einem Isopropanolbad sofort bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ einzufrieren und für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff zu lagern.

Eingefrorene Zellpellets können wieder in Kultur genommen werden, indem sie rasch bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und kurz vor dem vollständigen Auftauen langsam in vorgewärmtes Medium aufgenommen werden. Durch Zentrifugieren bei 1000 rpm für 3 Minuten wird das DMSO entfernt. Das Pellet wird in Medium resuspendiert und in Flaschen bzw. Schalen kultiviert.

2.2.4.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen mittels Lipofektion

Mit der Methode der Lipofektion ist es möglich, Plasmid-klonierte Gene in eine Vielzahl von eukaryotischen Zelltypen zu transfizieren und diese sowohl transient als auch stabil zu exprimieren. Für die Transfektion wurde das Lipofectamine™ 2000 Reagenz und das OPTI-MEM® I-Medium verwendet.

Am vorigen Tag bzw. sieben Stunden vor dem Beginn der Transfektion wurden 2×10^7 B35-Zellen auf eine 10^2 cm-Kulturschale ausgesät und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in DMEM/ 10 % FCS/ 1 % P/S/G kultiviert. Für die Transfektion wurden $4\text{ }\mu\text{g}$ DNA in $250\text{ }\mu\text{L}$ OPTI-MEM® I-Medium verdünnt. Ebenso erfolgte das Lösen von $10\text{ }\mu\text{L}$ Lipofectamine™ 2000 Reagenz in $250\text{ }\mu\text{L}$ OPTI-MEM® I-Medium, welche anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die DNA/OPTI-MEM® I-Lösung wurde hinterher in die Lipofectamine™ 2000/OPTI-MEM® I-Lösung überführt. Während der Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur kommt es in der Lösung zu einer Formierung des DNA-Lipofectamin-Komplexes. Zwischenzeitlich wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgesaugt und durch 2 mL frisches Medium (ohne Antibiotika) ersetzt. Die DNA-Lipofectamin-OPTI-MEM-Lösung wurde nun langsam unter leichtem Schwenken der Kulturschale zu den B35-Zellen getropft. Die Zellen wurden anschließend wieder bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Nach einer Inkubation von 16 - 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen verdünnt.

2.2.4.5 Zellzählung

Die Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.4.2 gelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde hinterher in 10 mL frischem Medium gut resuspendiert und aus diesem ein Volumen von 1 μL zusammen mit 9 μL Trypanblau auf eine Neubauer-Zählkammer gebracht. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung der jeweiligen Zelllinien. Durch manuelles Zählen der Zellen wurde die Zellzahl unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt.

2.2.4.6 Differenzierung von Peptid-stimulierten B35-Zelllinien

Die Differenzierung der Zellen erfolgte in Sechser-Well-Schalen, Zellkulturschalen oder -flaschen. Die jeweiligen B35-Zelllinien wurden in einer Dichte von $0,2 - 0,4 \times 10^4$ Zellen in Sechser-Well-Schalen ausgesät und mit oder ohne Zugabe von 33 $\mu\text{g/ml}$ Peptid für 24 - 72 h kultiviert. Die Zellen wurden mit 4 % PFA in PBS + 0,0015 % Saponin für 45 Minuten bei 37 °C fixiert, einmal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit gefiltertem 0,1%igem Kristallviolett gefärbt. Anschließend wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit H_2O bidest. gewaschen. Nach dem Trocknen der Wellschalen an der Luft erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera und 20-fachen Objektivs das Anfertigen von Bildern, welche anschließend der Analyse der Differenzierung und speziell des Neuritenwachstums dienten. Ein weiterer Versuch zur Analyse des NCAM-stimulierten Neuritenwachstums durch das C3-Peptid erfolgte mittels SDS-Page/Western Blot und dazugehörigen spezifischen Antikörpern. Hierzu wurden die Zellen in Sechser-Well-Schalen ausgesät und am folgenden Tag, nach dem Ablösen und Vereinzeln, je zwei Wells in eine 150er-Schale überführt. Anschließend erfolgte, nach ein bis zwei Tagen Kultivierung, die Zugabe von 33 $\mu\text{g/ml}$ Peptid für einen Zeitraum von 45 Minuten in eine Schale der jeweiligen B35-Zelllinie, eine zweite diente als Kontrolle ohne Stimulation. Die Zellen wurden dann mit Trypsin/EDTA in PBS und Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Das entstandene Pellet wurde in 1 mL PBS aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, um folglich für 3 Minuten bei 3000 rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert werden zu können. Das Pellet wurde darauf folgend, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, solubilisiert und anschließend zur Durchführung der SDS-Page/Western Blot genutzt.

2.2.4.7 Differenzierung von B35-Zelllinien unter Zugabe des FGFR1-Inhibitors SU5402

Um weitere Signaltransduktionswege zu untersuchen, die beim NCAM-stimulierten Neuritenwachstum eine Rolle spielen, wurde ein FGFR1 spezifischer Inhibitor,

SU5402, eingesetzt. Dieser Inhibitor hemmt neben FGFR1 auch die FGF-induzierte Phosphorylierung der Tyrosinkinase ERK1 und ERK2.

Dieser Versuch wurde, ähnlich wie in Kapitel 2.2.4.6 beschrieben, mit Hilfe des Western Blots und dazugehörigen spezifischen Antikörpern durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in Sechser-Well-Schalen ausgesät und am folgenden Tag, nach dem Ablösen und Vereinzeln, je zwei Wells in eine 150er-Schale überführt. Anschließend erfolgte, nach ein bis zwei Tagen Kultivierung, die Zugabe von zunächst 25 μM SU5402-Inhibitor für einen Zeitraum von 45 Minuten in eine Schale der jeweiligen B35-Zelllinie. Eine zweite Schale diente zur Kontrolle ohne Inhibierung. Hinterher wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach erneuter Zugabe von frischem Medium erfolgte die Zugabe von 33 $\mu\text{g/ml}$ Peptid für einen erneuten Zeitraum von 45 Minuten in jeweils beide Schalen (mit und ohne Inhibitor). Die Zellen wurden dann mit Trypsin/EDTA in PBS und mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 1 mL PBS aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt, um dann für drei Minuten bei 3000 rpm in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert werden zu können. Das Pellet wurde darauf folgend, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, solubilisiert und anschließend zur Durchführung der SDS-Page/Western Blot genutzt.

2.2.4.8 Differenzierung von Peptid-stimulierten B35-Zelllinien unter Verwendung des xCELLigence RTCA Gerätes

Das *Real-Time-Cell-Analyzer* (RTCA) Gerät ermöglicht es, mit Hilfe der elektrischen Impedanzmessung von Sensorelektroden bei verschiedenen Signalfrequenzen, Erkenntnisse über Zellen in Echtzeit zu erhalten. Das dabei genutzte Messprinzip beruht auf einer Wechselwirkung von Zellen mit elektronischen Biosensoren. Die in dem Gerät verwendeten Mikrotiterplatten, sogenannte *E-Plates*, sind am Boden mit Mikroelektroden (Goldfilm-Elektroden) versehen, mit denen daraufhin der Widerstand gemessen wird. Durch diese Methode ist es möglich, Veränderungen der Zell-Elektroden-Impedanz kontinuierlich in Echtzeit zu dokumentieren und Informationen über den Zellstatus kontinuierlich zu erfassen. Der dabei erhaltene Zellindex, welcher ein Maß für die relative Veränderung der elektrischen Impedanz ist, repräsentiert den Status einer Zelle. Er wird durch Faktoren wie Zelladhäsion, Zellmorphologie und Entwicklungsfähigkeit von Zellen beeinflusst [113]. Es konnte in durchgeführten Versuchen mit PC12 Zellen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Zellindex mit der Neuritenlänge korreliert und somit als ein Maß für das Neuritenwachstum verwendet werden kann [60].

Zur Durchführung der Experimente im *XCELLLigence* RTCA Gerät wurden die jeweiligen B35-Zelllinien mit einer Dichte von 175 Zellen/mm² routinemäßig auf den speziellen *E-Plates* des *XCELLLigence* Gerätes ausgesät. Die Zellen wurden für bis zu 48 Stunden mit oder ohne Zugabe von 6,7 µg/ml Peptid kultiviert und währenddessen wurde das Neuritenwachstum der Kulturen durchgängig mit dem *XCELLLigence* Gerät analysiert. Um die gewohnten Bedingungen der Zellen beizubehalten, befand sich das Gerät in einem Brutschrank, so dass das Kultivieren der Zellen unter normalen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung stattfand. Anschließend wurden die erhaltenen Daten mit Hilfe der RTCA Software analysiert und ausgewertet.

2.2.4.9 Fokale Adhäsionen Assay

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die verschiedenen B35-Zelllinien auf den *turnover* von Fokalen Adhäsionen haben, wurde ein Fokale Adhäsionen Assay optimiert und durchgeführt. Fokale Adhäsionen sind große, dynamische Proteinkomplexe, die das Zytoskelett einer Zelle mit der Extrazellulärmatrix verbinden. Das als Erstantikörper verwendete Paxillin ist ein Adapterprotein der Fokalen Adhäsionen. Es spielt eine zentrale Rolle beim Verbinden von Signalen der extrazellulären Umwelt, die einen Einfluss auf die Umgestaltung der Zelle haben.

Bei diesem Versuch wurden die B35-Zelllinien auf Acht-Well-Permanox-Objektträgern ausgesät und für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fixiert. Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, die Zellen zweimal in PBS gewaschen und zum Fixieren in jedes Well ca. 150 - 300 µL 4 % PFA (Paraformaldehyd) gegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei 37 °C wurde das PFA entfernt und die Wells zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Zum Aufschließen der Zellen wurden sie anschließend mit 1 % Triton X-100 in PBS für 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem erneuten zweimaligen Waschen mit PBS folgte ein Blockierschritt von 30 Minuten bei RT mit Medium + 10 % FCS. Anschließend wurden die Wells über Nacht bei 4 °C mit einem primären Antikörper inkubiert. Nach einem erneuten zweimaligen, vorsichtigen Waschvorgang mit PBS erfolgte für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Zweitantikörper. Nach Ablauf dieser Zeit, einem erneuten zweimaligen Waschvorgang mit PBS, erfolgte eine Färbung der Kerne. Dafür wurden die Zellen im Dunkeln mit einer 1:1000 verdünnten Hoechst (10 mg/mL)-Lösung für eine Minute inkubiert. Nach der Färbung wurde wiederum einmal mit PBS und einmal mit H₂O bidest. gründlich gewaschen und die 8-Well-Objektträger mit einer *VECTASHIELD*-Lösung eingedeckelt. Nun wurden die verschiedenen Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop angesehen, photographiert und

mit Hilfe der ImageJ Software bearbeitet und ausgezählt. Anhand der vorliegenden Bilder erfolgte die Analyse in Bezug auf die Paxillin-enhaltenen Fokalen Adäsionen der jeweiligen Zelllinien und anschließend eine statistische Analyse.

Verwendete primäre und dazugehörige sekundäre Antikörper

Erstantikörper	Verdünnung in PBS	Zweitantikörper	Verdünnung in PBS
Anti-Paxillin	1:750	Alexa 488 Ziege-anti-Maus	1:250

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Solubilisierung von Säugerzellen

Die zu solubilisierenden Zellen wurden abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die dabei entstandenen Zellpellets wurden mit Solubilisierungspuffer, Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500) und PMSF (0,5 mM) versetzt, durch Vortexen gemischt und für eine Stunde bei 4 °C kräftig geschüttelt. Das im Puffer enthaltene Detergenz ist für die Solubilisierung der Zellmembranen verantwortlich. Anschließend schloss sich ein dreiminütiger Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm in der Kühlzentrifuge an. Der dadurch entstandene Überstand stellt das Solubilisat dar, während sich im Pellet die Bestandteile des Zytoskeletts und der Zellkerne befinden. Die Solubilisierung der mit Peptid-behandelten Zellen erfolgte abweichend der zuvor beschriebenen Durchführung. Nachdem die Proben mit Solubilisierungspuffer, Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500) und PMSF (0,5 mM) versetzt und durch Vortexen gemischt wurden, denaturierte man sie für 10 Minuten bei 95 °C in einem Thermomixer. Nach anschließender kurzer einminütiger Inkubation auf Eis wurde 0,5 µL Benzonase dazu gefügt und die Proben anschließend für 3 Minuten bei 3000 rpm in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der erhaltene Überstand stellt das Solubilisat dar und wurde anschließend in ein frisches Eppendorfgefäß überführt.

2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford [114]

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen eignete sich die Methode nach Bradford sehr gut. Diese Methode, die durch Pufferchemikalien und reduzierende Stoffe kaum gestört wird, beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blue G250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn dieser in saurer Lösung an Proteine (hauptsächlich Arginin-Reste) bindet. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Der entstandene Farbkomplex ist über längere Zeit stabil. 10 µL Proteinlösung wurden mit

200 μ L Bradfordreagenz des BIO-RAD Protein Assay Kits in 96er-Well-Mikrotiterplatten für 2 Minuten inkubiert und die Absorption bei 595 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe mit BSA konnten die Konzentrationen bestimmt werden.

2.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [115]

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Dabei kann die Porengröße der Gele, je nach Größe der aufzutrennenden Moleküle, über den Acrylamidanteil variiert werden. Für die vertikale Elektrophorese wurde die Gelapparatur der Firma C.B.S. SCIENTIFIC CO. gebraucht. Als Trenngele wurden 6%-, 7%- und 10%ige Acrylamid-Gele genutzt. Die Lösungen für die Herstellung der Trenngele wurden zusammengemischt, bis ca. 3 Zentimeter unterhalb der oberen Glasplattenkante gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels schloss sich das Gießen des Sammelgels an. Die Proben wurden mit einem Fünftel Volumenanteil konzentrierten, reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel bei konstanter Spannung von 100 V und zur Auftrennung im Trenngel bei konstanter Spannung von 120 V. Als Größenmarker diente die *Protein Page Ruler™ Prestained* Proteinleiter der Firma Fermentas. In dieser Arbeit wurden ausschließlich SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt, in denen die Proben mit reduzierenden Probenpuffern versetzt wurden.

2.2.5.4 Western Blot [116]

Die Methode des Western Blots erlaubt es, die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren. Die somit übertragenen Proteine können dann immunologisch mit spezifischen Antikörpern und mit an diesen bindenden Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern detektiert werden. Das Blotting wurde nach dem Tank-Blot-Verfahren unter Verwendung der Blotapparatur von C.B.S. SCIENTIFIC CO. durchgeführt. Nach dem Äquilibrieren von Whatmanpapier und Nitrocellulosemembran in Transferpuffer wurde der Sandwichblot luftblasenfrei zusammengebaut, wobei die Nitrocellulosemembran dabei der Anode zugewandt war. Der Transfer erfolgte bei 4 °C mit einer konstanten Stromstärke von 330 mA für 71 Minuten in Transfer-Puffer. Anschließend wurden die transferierten Proteine auf der Membran mit Hilfe einer Ponceaurot-Färbelösung reversibel angefärbt. Dazu wurde die Membran ca. eine Minute in Ponceau-Lösung geschwenkt und an-

schließlich in H₂O bidest. solange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurde die Membran entfärbt und für eine Stunde mit 5%igem Magermilchpulver (w/v) bzw. mit 5%igem BSA (w/v), welches in TBS-Tween gelöst wurde, bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit TBS-Tween erfolgte die Inkubation mit dem im TBS-Tween verdünnten ersten Antikörper über Nacht bei 4 °C. Nach Entfernen des Antikörpers wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde danach gründlich mindestens für dreimal 10 Minuten gewaschen, wobei beim letzten Waschen TBS ohne Tween verwendet wurde.

Die mit primären und sekundären Antikörpern markierten Proteine auf der Membran können unter Anwendung des ECL-Systems (*Enhanced-Chemiluminescence*) nachgewiesen werden. Dabei katalysiert die am Antikörper gekoppelte Peroxidase eine Reaktion, die von einer Chemilumineszenz begleitet wird und somit detektiert werden kann. Nachdem die Membran abgetropft war, wurde sie auf eine zurechtgeschnittene Kopierfolie gelegt und anschließend mit einer Mischung aus gleichen Volumina Luminol-Lösung A und Luminol-Lösung B des Roti®-Lumin (Chemilumineszenz-Substrat)-Kits für ca. eine Minute inkubiert und mit Hilfe des Chem Doc XRS System des *Molecular Imager* Modelles der Firma BIO RAD analysiert.

Verwendete primäre und dazugehörige sekundäre Antikörper

Erstantikörper	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
Anti-NCAM 5B8 (monoclonal)	1:750	Kaninchen-anti-Maus IgG	1:5000
Purified mouse anti- Actin Ab-5 MAb	1:5000	Kaninchen-anti-Maus IgG	1:5000
Anti-CREB (48H2) Rabbit mAb	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:5000
Anti-Phospho-CREB (Ser133)	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:5000
Anti-β-Tubulin	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:5000
Purified Mouse Anti- FAK	1:1000	Kaninchen-anti-Maus IgG	1:5000
Anti-ERK1+ERK2	1:1000	Kaninchen-anti-Maus IgG	1:5000
Anti-Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen IgG	1:5000

2.2.5.5 Co-Immunpräzipitation über G-Sepharose-beads

Bei der Immunpräzipitation wird die Fähigkeit von Protein A (isoliertes Protein aus *Staphylococcus aureus*) oder Protein G (Zelloberflächenprotein von Gruppe G-Streptococccen) genutzt, an den Fc-Teil von Antikörpern zu binden. Die an Protein G-/Protein A-Sepharose adsorbierten spezifischen Antikörper können das entsprechende Antigen aus einer Lösung binden.

Zum *in vitro* Nachweis von Protein-Protein Interaktionen wurde die Co-Immunpräzipitation (Co-IP) verwendet. Dabei wird generell ein Protein A mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert, aufgereinigt und mittels Western Blot auf eine Membran übertragen. Ist es auf diese Weise möglich, das Protein B auf der Membran nachzuweisen, so stellt der Nachweis eine Interaktion von Protein A und B dar.

Nachdem die gewünschten Zellen, wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben, solubilisiert wurden und die Proteinkonzentration entsprechend Kapitel 2.2.5.2 bestimmt wurde, wurde die Proteinlösung aliquotiert und für die anschließende Co-IP eingesetzt. Für die Co-IP wurden 50 µl G-Sepharose-beads viermal mit TBS-Puffer gewaschen und daraufhin für 3 Minuten bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die beads mit 50 µg anti-NCAM Antikörper 5B8 beschichtet und ü. N. bei 4 °C inkubiert. Nach einem erneuten zweimaligen Waschschrift mit Immunpräzipitationspuffer wurden die Zellsolubilisate in den gewünschten Konzentrationen auf die mit Antikörper vorbe-schichteten G-Sepharose beads gegeben und für 2,5 - 4 Stunden bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die beads dreimal mit Immunpräzipitationspuffer gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer für 5 Minuten aufgekocht. Das eluierte Material wurde dann im Western Blot zur Analyse eingesetzt.

2.2.5.6 Oberflächenbiotinylierung von Zellen

Mit Hilfe der von Lisanti et al. beschriebenen Methode wird es durch Biotin ermöglicht, alle auf der Zelloberfläche befindlichen Proteine zu markieren [117]. Das daraus gewonnene Zellsolubilisat (siehe Kapitel 2.2.5.1) wird dann anschließend mit einem bestimmten Oberflächenprotein spezifischen monoklonalen Antikörper immunpräzipitiert (siehe Kapitel 2.2.5.5). Dieses dann ebenfalls biotinylierte Protein kann hinterher durch eine an Streptavidin gekoppelte Peroxidase im Western Blot nachgewiesen werden.

Bei der Biotinylierung von transfizierten B35-Zellen wurden $2,5 \times 10^7$ Zellen durch dreiminütiges Zentrifugieren bei 4 °C mit 3000 rpm gewonnen. Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um überflüssige aminhaltige Rückstände aus dem Medium und Zellproteinen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 30 Minuten mit 2 mM Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS bei RT inkubiert. Zum

Absättigen der freien Bindungen und Entfernen überflüssiger Nebenprodukte wurden die Zellen dreimal mit PBS + 100 mM Glycerin gewaschen. Hinterher wurden die Zellen erneut in Medium aufgenommen und bei 37 °C weiterkultiviert. Nach Zeiträumen von 0, 4, 10, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen solubilisiert (siehe Kapitel 2.2.5.1) und NCAM wurde, wie in Kapitel 2.2.5.5 beschrieben, immunpräzipitiert. Die so erhaltenen Proben wurden dann anschließend mit Hilfe der SDS-Page und Western Blot-Analyse untersucht. Um die biotinylierten Proteine hinterher nachweisen zu können, wurden 2 µg/mL Streptavidin eingesetzt. Dieses ist an eine Peroxidase gekoppelt und ermöglicht somit den Nachweis im Western Blot. Die im Anschluss erhaltenen Western Blot Bilder sind dann mit Hilfe des GelEval Programmes (*FrogDance* Software) quantifiziert und analysiert worden.

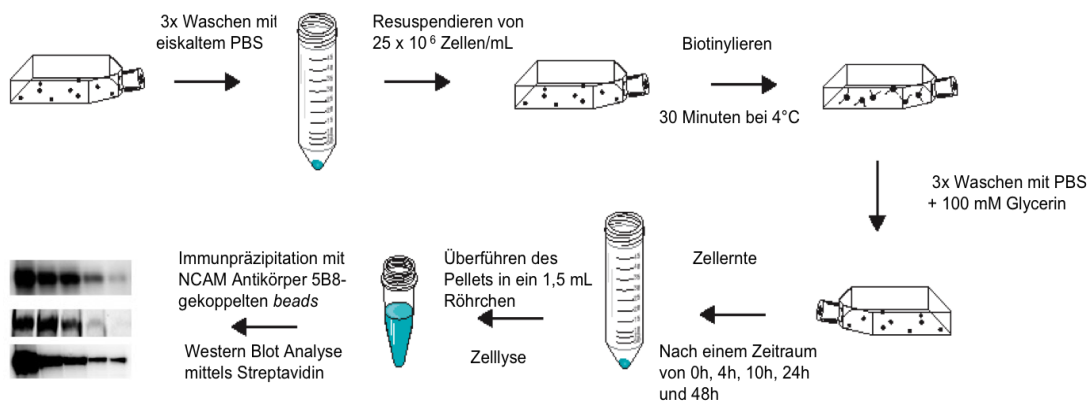


Abb. 7: Schematische Darstellung der Biotinylierung

Markierung aller Oberflächenproteine transfizierter B35-Zellen mittels Biotin und anschließender Analyse mit Hilfe des Western Blots.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse und Durchführung von Signifikanztests erfolgten mit dem Statistikprogramm GraphPad. Der statistische Vergleich zwischen Ergebnissen zweier unterschiedlicher Zelllinien erfolgte über den *paired* t-Test. War die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 5 % ($p < 0,05$), wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angesehen. Ein Signifikanzniveau von $p < 5\%$ wurde mit einem Stern (*) angegeben. Die Angabe eines Sternes ohne Balken bedeutet, dass dieses Ergebnis zu allen anderen signifikant war.

3 Ergebnisse

3.1 Austausch der Aminosäure Serin gegen Alanin und Asparaginsäure mittels ortsgerichteter Mutagenese

Matthias et al. konnten in Versuchen mit PC12-Zellen zeigen, dass es bei einer neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen zu einer verstärkten Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) kommt [53]. Welche der insgesamt 49 Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste hierbei phosphoryliert werden, ist jedoch unbekannt. Aus diesem Grund wurden zunächst mit dem Computerprogramm NetPhos 2.0 die potentiellen Phosphorylierungs-Wahrscheinlichkeiten für die cytoplasmatische Domäne von NCAM (Maus) bestimmt. Die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Phosphorylierung zeigte hierbei das Serin 774 mit einem NetPhos Wert von 0,994. Die Phosphorylierung des Serin 774 wurde auch bereits in mehreren Phospho-Proteomanalysen gefunden [58] [59]. Für die Untersuchungen der Bedeutung dieser potentiellen Phosphorylierungsstelle bei der Signaltransduktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) sollten zunächst Mutationen in NCAM 140-cDNA und 180-cDNA Konstrukte der Maus eingefügt werden. Dabei sollte die im cytoplasmatischen Teil von NCAM befindliche, als potentielle Phosphorylierungsstelle identifizierte Aminosäure Serin 774 zum einen gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin (NCAM140-S774A) und zum anderen gegen die Aminosäure Asparaginsäure (NCAM140-S774D) ersetzt werden, womit eine negative Ladung an die potentielle Phosphorylierungsstelle addiert wird und dadurch eine dauerhafte Phosphorylierung initiiert wird (siehe Abb. 8).

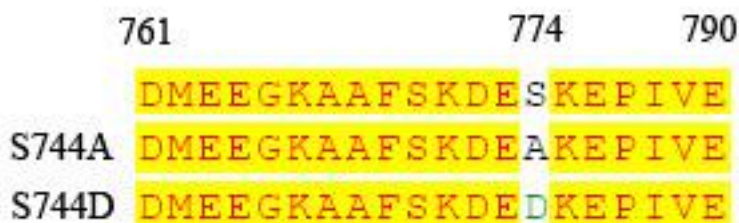


Abb. 8: Aminosäuresequenzausschnitt aus der cytoplasmatischen Domäne von NCAM.

In der oberen Zeile ist die Ausgangssequenz des Maus-NCAMs dargestellt, wohingegen in den beiden Reihen darunter jeweils die Varianten mit den eingefügten Mutationen dargestellt werden und an Stelle 774 jeweils gekennzeichnet sind.

Mittels PCR-basierender ortsgerichteter Mutagenese wurde in die Maus NCAM 140- und 180-cDNAs das für Serin 774 kodierende Triplet TCA durch Austausch einer Base

in das für Alanin kodierende Triplet GCA bzw. durch Austausch des ganzen Triplets in das für Asparaginsäure kodierende Triplet GAT umgewandelt. Als Ausgangsmaterial für die Mutagenese diente der eukaryotische Expressionsvektor pRc/CMV, in den die cDNA für NCAM 140 bzw. NCAM 180 inseriert war. Bei der PCR-basierenden ortsgerichteten Mutagenese wird der komplette Vektor mit den Primern, die die Mutation (TCA -> GCA und TCA -> GAT) enthalten, amplifiziert. Zur Kontrolle der Mutagenese-PCR wurden die amplifizierten Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Mutagenese-PCR-Produkte zeigten die zu erwartenden Größen von 8,8 kDa für NCAM 140 (Vektor pRc/CMV 5 kDa + NCAM 140 3,8 kDa) bzw. 9,6 kDa für NCAM 180 (siehe Abb. 9).

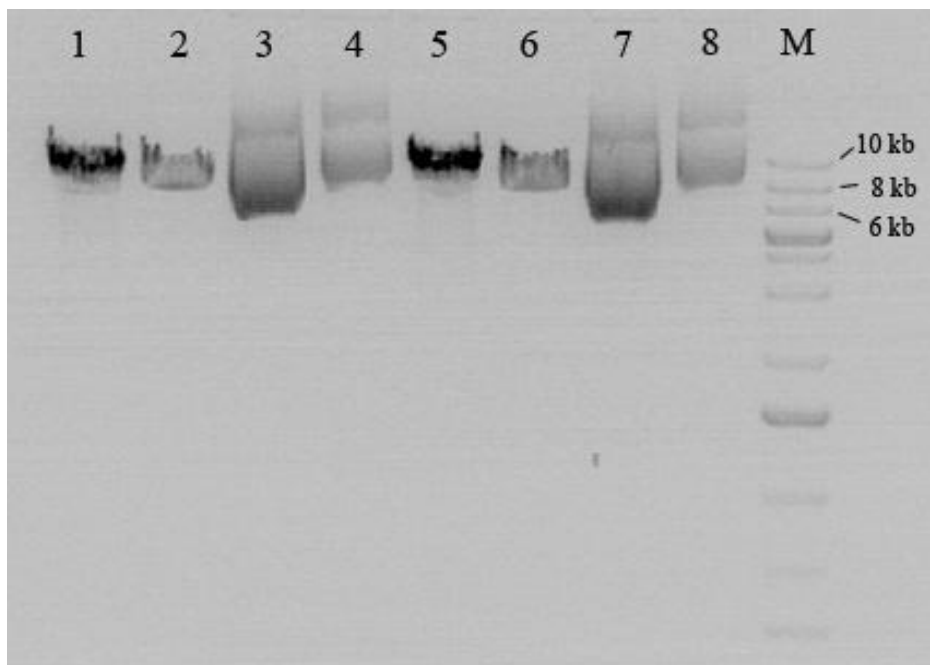


Abb. 9: Kontrolle der Mutagenese-PCR mittels Agarosegelelektrophorese.

Neben den PCR-Produkten wurden jeweils zum Vergleich die nicht linearisierten Ausgangsvektoren aufgetragen. Spuren: (1) pRc/CMV-NCAM180-S774A (PCR-Produkt), (2) pRc/CMV-NCAM140-S774A (PCR-Produkt), (3) pRc/CMV-NCAM140 (Ausgangsvektor), (4) pRc/CMV-NCAM180 (Ausgangsvektor), (5) pRc/CMV-NCAM180-S774D (PCR-Produkt), (6) pRc/CMV-NCAM140-S774D (PCR-Produkt), (7) pRc/CMV-NCAM140 (Ausgangsvektor), (8) pRc/CMV-NCAM180 (Ausgangsvektor)

Die bei der Mutagenese-PCR entstandenen linearisierten Plasmide wurden ligiert und in chemisch-kompetente *E. coli* transformiert. Die Plasmide von mindestens 3 Klonen pro Mutation wurden isoliert und sequenziert.

Serin 774 zu Alanin

2292 2320 2350

Maus NCAM140 Sequenz GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774A Klon 1 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774A Klon 2 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774A Klon 3 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774A Klon 4 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774A Klon 5 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA

Maus NCAM180 Sequenz GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM180S774A Klon 1 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM180S774A Klon 2 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM180S774A Klon 3 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA

Abb. 10: Sequenzausschnitt der NCAM-Konstrukte S774A

Blau gekennzeichnet: Ausgetauschte Base des für Alanin kodierenden Triplets.

Serin 774 zu Asparaginsäure

Maus NCAM140 Sequenz GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774D Klon 1 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774D Klon 2 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM140S774D Klon 3 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA

Maus NCAM180 Sequenz GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM180S774D Klon 1 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM180S774D Klon 2 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM180S774D Klon 3 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA
 pRc/CMV-NCAM180S774D Klon 4 GGGCAAGGCTGCTTTCTCGAAAGATGAGT CAAAAGAACCCATTGTGGAGGTCCGA

Abb. 11: Sequenzausschnitt der NCAM-Konstrukte S774D

Blau gekennzeichnet: Ausgetauschtes Basentriplett.

Wie in Abb. 10 und Abb. 11 gezeigt wird, wies ein Großteil der Klone die gewünschte Mutation auf. Für die Durchführung der weiteren Versuche wurde jeweils ein positiver Klon der jeweiligen NCAM-Konstrukte ausgewählt und mit diesem wurde weitergearbeitet. Die generierten Konstrukte sind in Tab. 11 aufgelistet.

Die jeweiligen Konstrukte wurden anschließend zusammen mit den Ausgangskonstrukten für Experimente zur Untersuchung der Signaltransduktion von NCAM genutzt.

Tab. 11: Zielkonstrukte und in der ortsgerichteten Mutagenese eingesetzte Primer

Gewünschter Aminosäureaustausch	Ausgangs-cDNA	Komplementäre Primer	Zielkonstrukt
S774A	pRc/CMV-NCAM140	neuPhos774-rev neuPhos774-for	pRc/CMV-NCAM140-S774A
S774A	pRc/CMV-NCAM180	neuPhos774-rev neuPhos774-for	pRc/CMV-NCAM180-S774A
S774D	pRc/CMV-NCAM140	NCAMS774D-rev neuPhos774-for	pRc/CMV-NCAM140-S774D
S774D	pRc/CMV-NCAM180	NCAMS774D-rev neuPhos774-for	pRc/CMV-NCAM180-S774D

3.2 Bedeutung der Phosphorylierungsstelle 774 des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM) bei Signaltransduktionsprozessen

Zu den wichtigsten Funktionen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles gehört dessen Beteiligung an der Induktion und Elongation von Neuriten, an der Wanderung von Neuronen und an der Bündelung von Axonen. In den funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit ist neben der allgemeinen Untersuchung zur Signaltransduktion NCAMs ein besonderer Schwerpunkt auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum gelegt worden. Die Funktion der Phosphorylierung Serin 774 des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM bei seiner Signaltransduktion sollte zunächst in einem eukaryotischen Zellsystem untersucht werden. B35-Zellen stellen dafür ein geeignetes Untersuchungssystem dar. Bei diesen Zellen handelt es sich um Neuroblastomzellen der Ratte, die endogen nur sehr geringe Mengen an NCAM exprimieren [56].

Dazu wurden die im pRc/CMV-Vektor generierten NCAM-Konstrukte zunächst in B35-Zellen transfiziert. Anschließend wurde der Einfluss der mittels ortsgerichteter Mutagenese eingefügten Mutationen S774A und S774D im Vergleich zum Wildtyp auf unterschiedliche NCAM-induzierte Signaltransduktionswege im Verlauf der Arbeit mit verschiedenen Experimenten untersucht.

3.2.1 Transfektion der NCAM-Konstrukte in B35-Neuroblastomzellen

Sowohl die mittels ortsgerichteter Mutagenese generierten NCAM-Konstrukte als auch die Ausgangskonstrukte wurden mittels Lipofektion in B35-Neuroblastomzellen transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Antibiotikum G418 selektiert und einzelne Zellklone wurden weiterkultiviert. Diese Zellen wurden anschließend mittels Western Blot analysiert.

3.2.2 Western Blot-Analysen transfizierter B35-Zellen

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurde auf Proteinebene die NCAM-Expression transfizierter B35-Zellen untersucht. Dadurch konnten Klone identifiziert werden, die das eingebrachte Maus-NCAM überexprimieren. Hierfür wurde der monoklonale NCAM-Antikörper 5B8 verwendet, der an eine Peptidsequenz innerhalb des für NCAM 140 und NCAM 180 identischen C-terminalen cytoplasmatischen Bereiches bindet. Der Antikörper 5B8 erkennt neben dem transfizierten Maus-NCAM auch das endogen exprimierte NCAM der Ratte.

Im Western Blot konnte so das NCAM Protein bei 140 kDa detektiert werden (siehe Abb. 12). Es konnte gezeigt werden, dass B35-Zellen geringe bis kaum detektierbare

Mengen an endogenem NCAM 140 exprimieren. Weiterhin ist in der Abb. 12 zu erkennen, dass die Zelllinien, die für die Untersuchungen in dieser Arbeit genutzt wurden, annähernd die gleichen Mengen an NCAM überexprimieren.

Für die weiteren durchgeführten Arbeiten zur Untersuchung der Signaltransduktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM wurden in den folgenden Untersuchungen jeweils 2 Klone der drei transfizierten Zelllinien

- B35-NCAM140 (WT)
- B35-NCAM140-S774A
- B35-NCAM140-S774D

und die untransfizierten B35-Zellen verwendet.

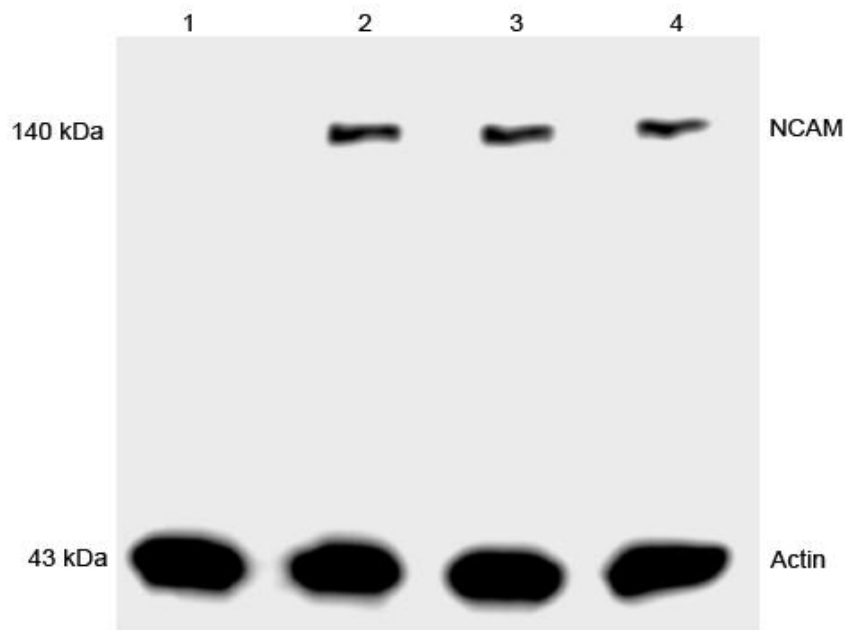


Abb. 12: Nachweis der NCAM-Expression der transfizierten B35-Zellen durch Western Blot-Analyse

Jeweils 50 µg Protein der Zellhomogenate wurden in einem 7%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des monoklonalen NCAM-Antikörpers 5B8 dargestellt. Als Kontrolle diente β-Actin. Spuren: (1) B35-Zellen, (2) B35-NCAM140 (WT), (3) B35-NCAM140-S774A, (4) B35-NCAM140-S774D

3.2.3 Zelleigenes NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum in transfizierten B35-Zellen

Um das Neuritenwachstum der transfizierten B35-Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurden B35-NCAM140-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen, B35-NCAM140-S774D-Zellen und untransfizierte B35-Zellen kultiviert, fixiert und mit Kristallviolett angefärbt.

Wie in der Abb. 13 zu erkennen ist, zeigten alle NCAM-transfizierten B35-Zellen im Vergleich zu den untransfizierten B35-Zellen ein gesteigertes Neuritenwachstum. Das stärkste Neuritenwachstum zeigten die B35-NCAM140-Zellen. Ein geringeres Neuritenwachstum konnte in den B35-NCAM140-S774D-Zellen beobachtet werden, wohingegen der Austausch der Aminosäure Serin zu Alanin in den B35-NCAM140-S774A-Zellen eine nochmals deutlichere Abnahme des Neuritenwachstums zeigte.

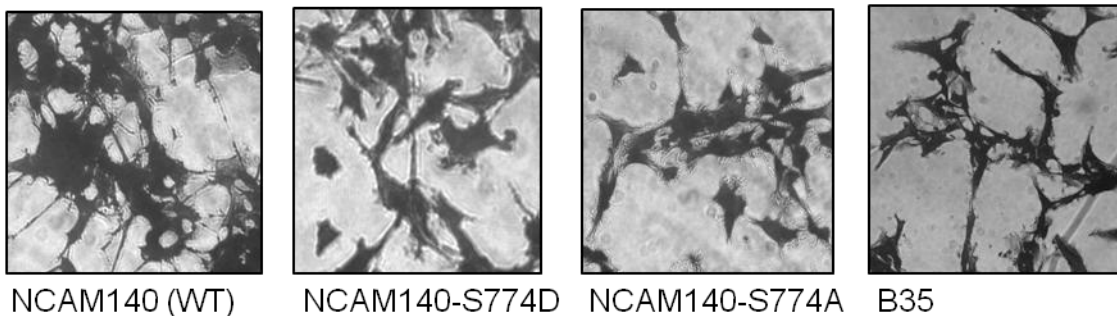


Abb. 13: Neuritenwachstum in B35-Zellen

Ausgewählte Bilder transfizierter und untransfizierter B35-Zellen.

3.2.4 NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum mit dem multivalenten Peptid C3

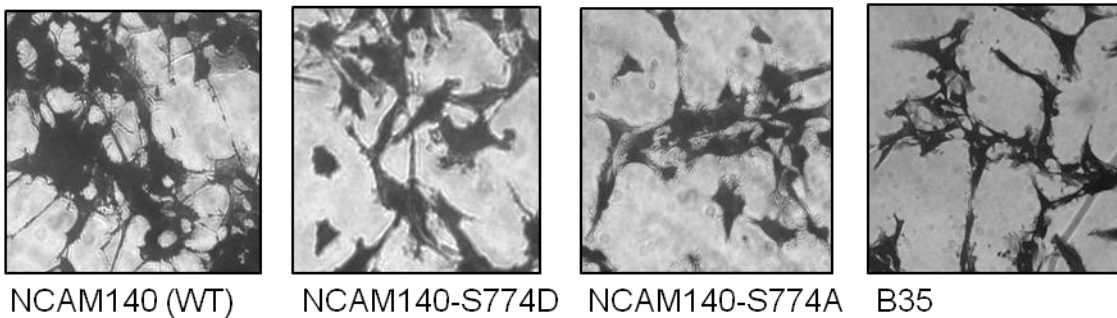
Es gibt mehrere experimentelle Möglichkeiten, ein verstärktes NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum bzw. NCAM Interaktionen *in vitro* zu induzieren. Zum einen besteht die Möglichkeit, Zellen mit NCAM-Antikörpern, die NCAM im extrazellulären Bereich erkennen, zu inkubieren. Dieses resultiert in einem Clustering der NCAM-Moleküle auf der Zelloberfläche [78]. Zum anderen können Zellen oder Neuronen auf einem Monolayer von NCAM-transfizierten Fibroblasten kultiviert werden [118]. Durch Zugabe von löslichem NCAM oder NCAM-Fc-Chimeren ins Medium kann ebenfalls NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum induziert werden [119]. In einigen Arbeitsgruppen werden seit einiger Zeit synthetische Peptidliganden, wie z. B. das C3-Peptid, verwendet [93] [94]. Bei diesem Peptid handelt es sich um ein mimetisches Peptid, welches an die erste Ig-Domäne von NCAM bindet und die homophilen NCAM-NCAM Interaktionen initiiert. Von diesem Peptid mit der Sequenz ASKKPKRNUKA ist bekannt, dass es das Neuritenwachstum in Folge der Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentrationen induziert.

tration, der Aktivierung von ERK1/2, Akt/PKB und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB induziert [120].

In dieser Arbeit wurden verschiedenen Differenzierungsassays mit diesem synthetischen Peptid durchgeführt, um die Rolle der Phosphorylierung an Serin 774 beim NCAM-vermittelten Neuritenwachstum näher zu untersuchen.

Transfizierte und untransfizierte B35-Zellen wurden ohne und unter Zugabe von 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Peptid für 24 - 72 Stunden kultiviert. Nach dem Fixieren und Färben der Zellen mit Kristallviolett wurden Ausschnitte photographiert.

A - C3-Peptid



B + C3-Peptid

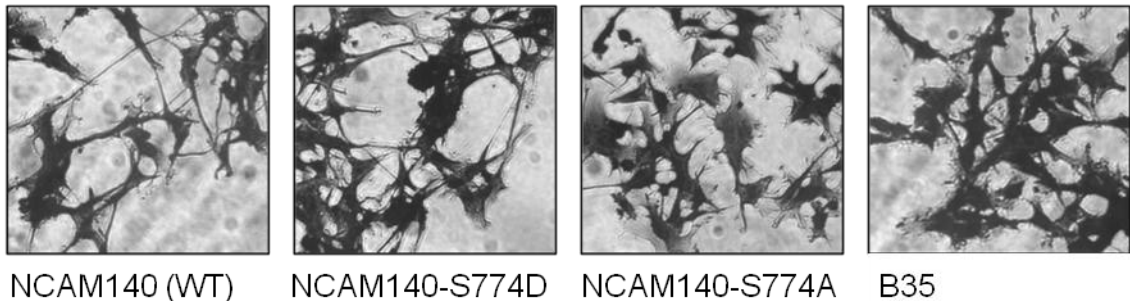


Abb. 14: Stimulation des Neuritenwachstums der B35-Zellen mit dem C3-Peptid

Ausgewählte Bilder von B35-Zellen, mit (B) und ohne (A) Zugabe von 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C3-Peptid.

In der Abb. 14 sind Bilder von den B35-NCAM140-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen, B35-NCAM140-S774D-Zellen und B35 Zellen, die mit und ohne Zugabe von 33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ C3-Peptid inkubiert wurden, gezeigt. Die Zugabe des C3-Peptides führte in allen B35-Zelllinien zu einer Steigerung des Neuritenwachstums. Eine deutliche Veränderung der Zellen in Bezug auf deren Neuritenwachstum konnte schon nach 24 Stunden beobachtet werden. Die stärkste Induktion des Neuritenwachstums durch das C3-Peptid konnte bei den B35-NCAM140-Zellen und B35-NCAM140-S774D-Zellen gezeigt werden. Zwischen diesen ist kaum ein Unterschied zu erkennen. Das

Neuritenwachstum der B35-NCAM140-S774A-Zellen hingegen wird geringer induziert. In den nicht NCAM exprimierenden B35-Zellen dagegen konnte das Neuritenwachstum nur ein wenig gesteigert werden (siehe Abb. 14B).

3.3 Untersuchungen des Neuritenwachstums im *xCELLIGENCE Real-Time-Cell-Analyser* Gerät

Zur Quantifizierung des Neuritenwachstums wurde eine neuartige Messmethode etabliert. Hierzu wurde das *xCELLIGENCE Real-Time-Cell-Analyser* (RTCA) Gerät genutzt. Dieses Gerät ermöglicht eine schnelle Messmethode zur Bestimmung des Neuritenwachstums durch Messung von Impedanzveränderungen auf Mikrotiterplatten mit Goldflim-Elektroden. Das verwendete RTCA Gerät quantifiziert das Zellwachstum und die Morphologie der Zelle unter Angabe eines Zellindex. Dadurch ist es möglich, Veränderungen der Zelle in Echtzeit zu dokumentieren und Informationen über den Zellstatus kontinuierlich zu erfassen [113].

Dies stellt eine effektivere Methode zur Bestimmung des Neuritenwachstums im Vergleich zu den sonst durchgeführten Methoden dar, bei denen die Neuriten von Hand einzeln ausgemessen und analysiert werden. Um die Vergleichbarkeit des Gerätes mit den herkömmlichen Methoden zu bestimmen, wurden die anfänglichen Versuche mit beiden Methoden durchgeführt. Da die erhaltenen Ergebnisse übereinstimmten, wurde der Zellindex in den weiteren Versuchen mit dem RTCA Gerät gemessen und als Parameter für das Neuritenwachstum herangezogen.

In den nun folgenden Experimenten sollten die in den vorherigen Versuchen beobachteten Unterschiede im Neuritenwachstum der jeweiligen B35-Zelllinien, mit Hilfe des RTCA Gerätes und dem daraus bestimmenden Zellindex, bestätigt und quantifiziert werden. Dafür wurde nach Etablierung der Messungen am RTCA Gerät der Zellindex der B35-Zellen, die stabil mit NCAM140, NCAM140-S774A oder NCAM140-S774D transfiziert wurden, mit und ohne Anwesenheit des C3-Peptides analysiert. Als Kontrolle bei diesen Versuchen dienten die untransfizierten B35 Zellen.

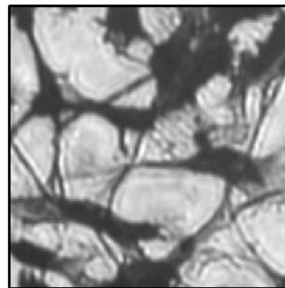
In der Abb. 15 ist zunächst nur das NCAM-vermittelte und gleichzeitig mit Peptidstimulation erfolgte Neuritenwachstum der B35-NCAM140-Zellen dargestellt. Die RTCA-Messungen bestätigen die in den vorherigen Versuchen beobachtete Stimulierung des Neuritenwachstums mit dem C3-Peptid. Dieses Resultat ist hier noch einmal in der Abb. 15 A anhand ausgewählter Fotoausschnitte dargestellt. Abb. 15 B zeigt einen repräsentativen Graphen der RTCA Messung von mindestens drei unterschiedlich laufenden Experimenten. Es ist deutlich zu erkennen, dass mit Anwesenheit des C3-Peptides der Zellindex der B35-NCAM140-Zellen sichtbar ansteigt und durchweg größer

ist als bei den B35-NCAM140-Zellen, die in Abwesenheit des Peptides kultiviert wurden.

A

- C3 Peptid

+ C3 Peptid



B

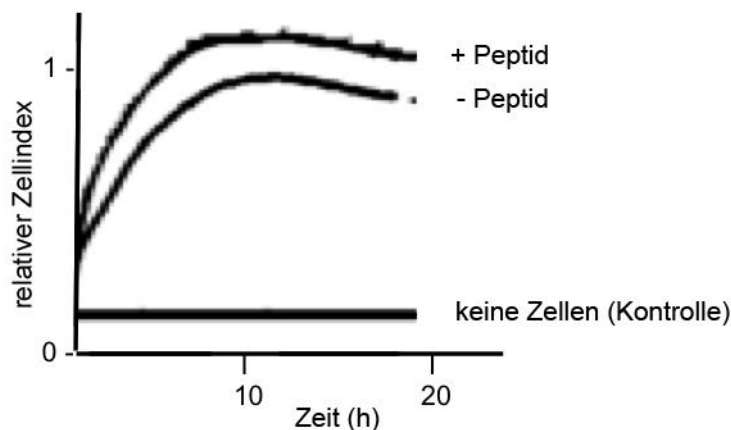


Abb. 15: NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum in B35-NCAM140 (WT)-Zellen

A: B35-NCAM140-Zellen wurden mit und ohne Anwesenheit des C3-Peptides kultiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Ausgewählte Fotos mehrerer durchgeführter Versuche sind hier abgebildet.

B: Repräsentativer Graph eines RTCA Experimentes von mindestens drei unterschiedlichen Experimenten

In weiteren Versuchen mit dem *Real-Time-Cell-Analyser* wurde sowohl das zelleigene NCAM-vermittelte Neuritenwachstum als auch das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum in Anwesenheit des C3-Peptides aller B35-Zelllinien untersucht. Dafür wurden zuerst Experimente im *Real-Time-Cell-Analyser* durchgeführt, bei denen das zelleigene NCAM-vermittelte Neuritenwachstum untersucht werden sollte. Die Zellen wurden dafür, wie oben beschrieben, ohne Zugabe des Peptides kultiviert. Wie in der Abb. 16 dargestellt, ist auch hier ein sichtbarer Unterschied im Neuritenwachstum anhand der dargestellten Zellindices der jeweiligen B35-Zellen zu erkennen. Wie auch auf den photographierten Ausschnitten erkennbar und hier bestätigt wurde, ist der Zellindex der

B35-NCAM140-Zellen am größten. Der Zellindex der B35-NCAM140-S774D-Zellen ist nur ein wenig geringer als der Index der B35-NCAM140-Zellen. Niedriger und mit den Ergebnissen der Neuritenlänge der Fotos übereinstimmend ist der Zellindex der transfizierten B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen.

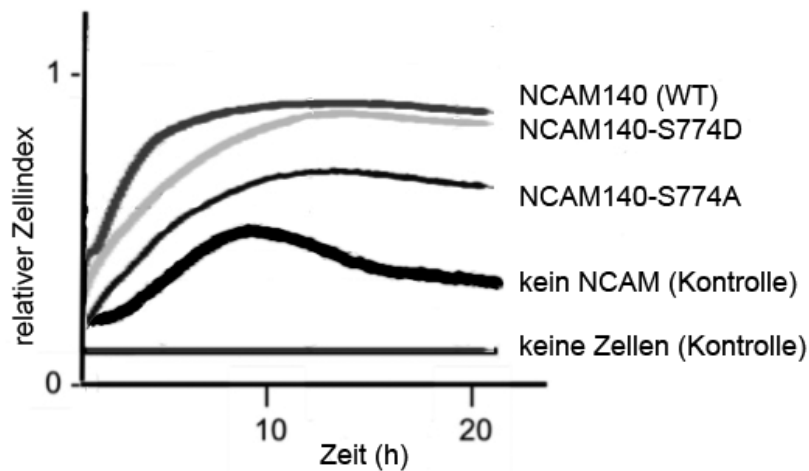


Abb. 16: Zelleigenes NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum in B35-Zelllinien

Repräsentativer Graph eines RTCA Experimentes von mindestens drei unterschiedlichen Experimenten

Weiterhin wurde auch das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum aller B35-Zelllinien mit dem RTCA Gerät untersucht. In der Abb. 17 ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes von mindestens drei gleichlaufenden Versuchen im RTCA Gerät gezeigt, bei dem die Zellen mit dem C3-Peptid stimuliert wurden. Wenn man die Zellindices der jeweiligen transfizierten B35-Zellen in Abb. 16 und Abb. 17 vergleicht, ist deutlich zu erkennen, dass das C3-Peptid das Neuritenwachstum der transfizierten B35-Zelllinien fördert. Wohingegen bei den nicht NCAM exprimierenden B35-Zellen nur wenig Steigerung des Neuritenwachstums nach erfolgter Stimulation zu erkennen ist. Es konnte gezeigt werden, dass die B35-Zellen, die NCAM140-S774A exprimieren, im Vergleich zu den Zellen, die NCAM140 und NCAM140-S774D exprimieren, ein weniger starkes Neuritenwachstum aufweisen.

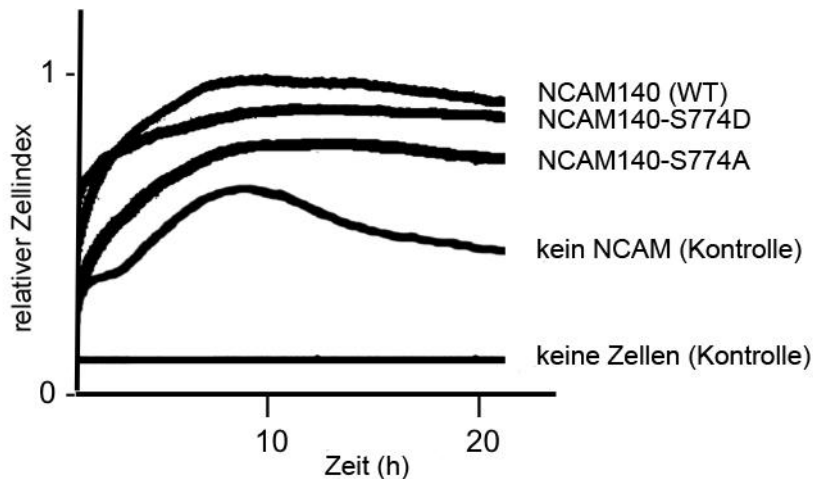


Abb. 17: NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum (C3-Peptid) in B35-Zelllinien

Repräsentativer Graph eines RTCA Experimentes von mindestens drei unterschiedlichen Experimenten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich das Neuritenwachstum der Zellen mit Anwesenheit des C3-Peptides stimulieren lässt. Weiterhin ist sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit des Peptides ein ersichtlicher Unterschied der Zellindices zwischen den einzelnen B35-Zelllinien zu erkennen. Das Neuritenwachstum der B35-NCAM140-S774A-Zellen ist sowohl in Anwesenheit des C3-Peptides als auch in Abwesenheit weniger ausgeprägt als bei den B35-NCAM140-Zellen und B35-NCAM140-S774D-Zellen.

3.4 Analyse unterschiedlicher NCAM-induzierter Signalwege

In den folgenden Experimenten dieser Arbeit sollten die unterschiedlichen NCAM-induzierten Signalwege, die eine Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren bewirken können, untersucht werden. Dazu wurde das Hauptaugenmerk auf die Signalwege gelegt, die letztendlich eine Phosphorylierung und somit eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB bewirken. Dieser wird dann an Serin 133 phosphoryliert und das dadurch aktivierte CREB fungiert dabei als Transkriptionsfaktor für Gene, welche das cAMP-Response Element (CRE) in der Promoterregion enthalten. Jessen et al. konnten in Versuchen mit PC12-Zellen zeigen, dass phosphoryliertes CREB essentiell für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum ist [86].

Zum derzeitigen Stand der Forschung gibt es hauptsächlich zwei Möglichkeiten der Signalweiterleitung von NCAM, die in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB enden. Ein Weg führt über die Nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn und der andere über den FGF-Rezeptor.

In den folgenden Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden dabei Experimente durchgeführt, die zum einen den FGF-Rezeptor-abhängigen Weg und zum anderen den FGF-Rezeptor-unabhängigen über die Nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn überprüfen. Des Weiteren wurde analysiert, ob die Phosphorylierungsstelle Serin 774 einen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB ausübt und ob sich Rückschlüsse auf die vorherigen Beobachtungen auf zellbiologischer Ebene ziehen lassen.

3.4.1 Untersuchung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (*Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein*)

Zunächst sollten die beobachteten morphologischen Veränderungen auf zellbiologischer Ebene, in Bezug auf die Bedeutung der Phosphorylierung des NCAMs beim Neuritenwachstum, auf molekularer Ebene bestätigt werden. Hierzu wurde mit Hilfe des Western Blots auf Proteinebene die Expression von CREB und Phospho-CREB untersucht. Es ist bekannt, dass beim NCAM-vermittelten Neuritenwachstum die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB induziert wird und die NCAM-vermittelte CREB Aktivierung das Neuritenwachstum fördert [121]. Des Weiteren ist ebenfalls bekannt, dass die Stimulierung von NCAM mittels C3-Peptid mit einer verstärkten Phosphorylierung von CREB einhergeht [78]. Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Untersuchungen ebenfalls die Phosphorylierung und somit erfolgte Aktivierung von CREB nach erfolgter Stimulation NCAMs mit dem C3-Peptid analysiert.

B35-NCAM140-WT-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen und B35-NCAM140-S774D-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von C3-Peptid für einen Zeitraum von 60 Minuten kultiviert und mit Hilfe der Western Blot-Analyse auf die Expression von CREB und Phospho-CREB untersucht.

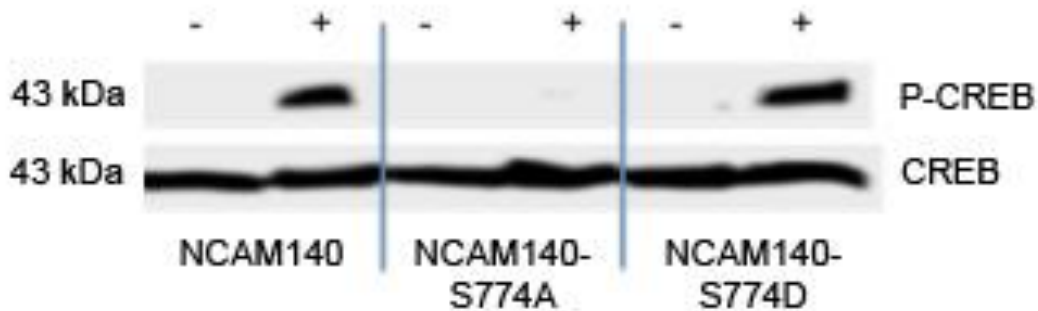


Abb. 18: CREB- und Phospho-CREB-Expression transfizierter B35 Zellen

Jeweils 50 µg Protein der Zellhomogenate wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen CREB und Phospho-CREB analysiert. Spuren: (-) – C3-Peptid (+) + C3-Peptid

In der Abb. 18 ist zu erkennen, dass sowohl mit als auch ohne Peptid behandelte Zelllinien eine Expression von CREB bei 43 kDa zeigen und zwischen ihnen kein Unterschied festgestellt werden kann. In Abwesenheit des C3-Peptides war in allen NCAM-exprimierenden B35-Zelllinien keine Expression an P-CREB detektierbar. Dagegen konnte eine Phosphorylierung und daraus resultierende Aktivierung von CREB nur bei den B35-NCAM140 (WT) und bei den B35-NCAM140-S774D-Zellen beobachtet werden, die in Anwesenheit des C3-Peptides kultiviert wurden. Es konnte keine Phosphorylierung und somit keine Aktivierung von CREB in den B35-NCAM140-S774A-Zellen nach erfolgter Stimulation mit dem C3-Peptid beobachtet werden.

3.4.2 Untersuchung des ERK-Signalweges

Als nächstes wurde zur Überprüfung des FGF-Rezeptor-abhängigen und FGF-Rezeptor-unabhängigen Signalweges, der über die Nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn verläuft, der ERK-Signalweg analysiert. Diese beiden Wege stellen die zwei bekannten Möglichkeiten der Signalweiterleitung von NCAM hin zum Ras-MAP-Kinase-Weg dar. Es ist bekannt, dass NCAM über die kleine GTPase Ras, den MAPK-Signalweg aktiviert und es wird postuliert, dass dieser durch NCAM mittels FAK aktivierte Ras-MAPK-Signalweg für die maximal mögliche Stimulation des Neuritenwachstums durch NCAM notwendig ist [27].

Da ERK *downstream* von MAP gelegen ist, wurde diese Kinase zur Überprüfung dieser Signalwege ausgewählt. Mit Hilfe des FGFR1-Inhibitors SU5402 konnte die Aktivierung der Tyrosinkinasen ERK1 und ERK2 durch den FGF-Rezeptor-abhängigen und -unabhängigen Weg unterschieden werden. Beim Einsatz von SU5402 sollte nur die

Aktivierung der Tyrosinkinasen ERK1 und ERK2 über den FGF-Rezeptor-unabhängigen Weg sichtbar sein.

In Western Blot-Analysen wurde untersucht, ob die unterschiedlichen B35-Zelllinien einen Einfluss auf die Aktivierung von ERK ausüben. Dazu wurden die B35-NCAM140-WT-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen und B35-NCAM140-S774D-Zellen für diese Versuche mit Zugabe von 33 µg/mL C3-Peptid für einen Zeitraum von 60 Minuten kultiviert, wobei eine Versuchsreihe vor Peptidzugabe für einen Zeitraum von 45 Minuten mit 25 µM SU5402-Inhibitor versetzt wurde. Mit Hilfe der Western Blot-Analyse wurden die jeweiligen B35-Zelllinien daraufhin auf die Expression von ERK und P-ERK untersucht.

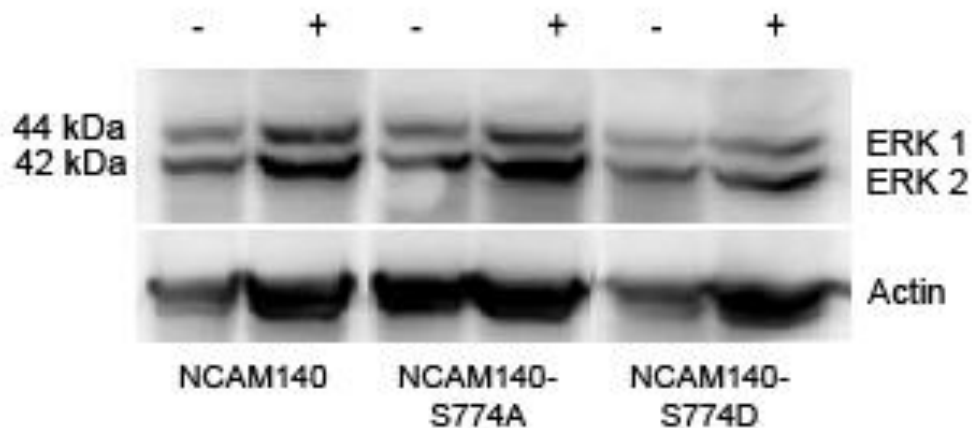


Abb. 19: Vergleich der ERK-Expression transfizierter B35-Zelllinien unter Einfluss eines FGFR1-Inhibitors

Jeweils 50 µg Protein der Zellhomogenate wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen ERK analysiert. Spuren: (-) + C3-Peptid, (+) +C3-Peptid und Inhibitor

In der Abb. 19 ist ein repräsentatives Ergebnis der Western Blot-Analysen zur Untersuchung der Expression von ERK dargestellt. Nach Analyse mit der GelEval 1.22 Software zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Expression von ERK1 und ERK2 nach Stimulation mit dem C3-Peptid in den B35-NCAM140 (WT)-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen und NCAM140-S774D-Zellen gibt. Bei Anwesenheit des FGFR1-Inhibitors kam es zu einer verstärkten Expression von ERK1 und ERK2, die jedoch in allen NCAM-exprimierenden B35-Zelllinien gleich stark zu beobachten war.

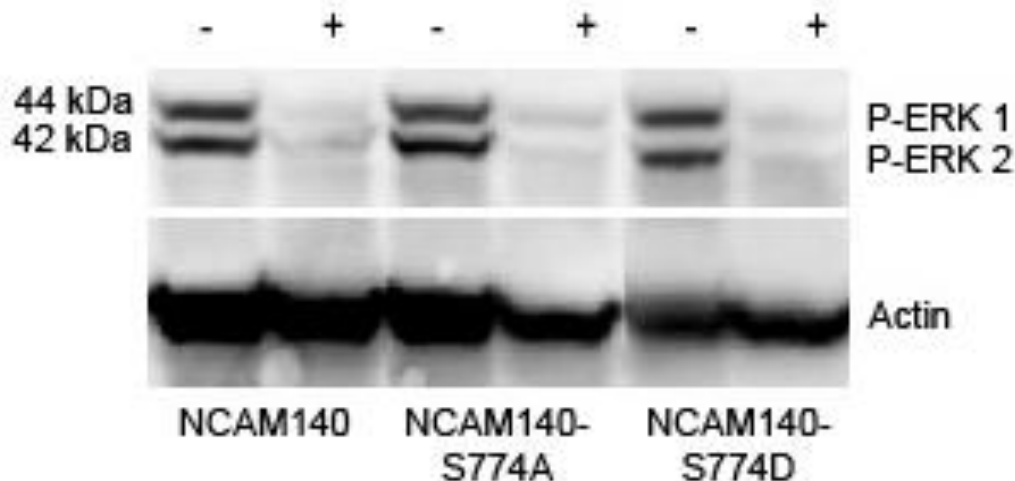


Abb. 20: Expression an P-ERK der jeweiligen NCAM-transfizierten B35-Zelllinien unter Einfluss des FGFR1-Inhibitors

Jeweils 50 µg Protein der Zellhomogenate wurden in einem 12%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen P-ERK analysiert. Spuren: (-) + C3-Peptid, (+) +C3-Peptid und Inhibitor

Die Abb. 20 zeigt ein ausgewähltes Ergebnis eines Western Blots, bei dem die Expression von P-ERK analysiert wurde. Es ist zu erkennen, dass alle NCAM-transfizierten B35-Zellen in Abwesenheit des Inhibitors, P-ERK als Doppelbande bei 42 und 44 kDa exprimieren. Zwischen den B35-NCAM140 (WT)-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen und NCAM140-S774D-Zellen ist dabei kein Unterschied zu erkennen. Nach erfolgter Zugabe des FGFR1-Inhibitors SU5402 kommt es zu einer starken Abnahme der P-ERK Expression aller NCAM-transfizierten B35-Zellen. Unter diesen Bedingungen ist P-ERK kaum detektierbar. Zwischen den jeweiligen NCAM-Konstrukten ist dabei ebenfalls kein Unterschied zu erkennen. Nach erfolgter Quantifizierung dieser Experimente mit der GelEval 1.22 Software konnte gezeigt werden, dass die Expression an P-ERK ohne Zugabe des Inhibitors zwischen den B35-NCAM140 (WT)-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen und NCAM140-S774D-Zellen keinen signifikanten Unterschied ergab. Die Analyse der transfizierten B35-Zellen mit der GelEval 1.22 Software, nach Kultivierung in Anwesenheit des Inhibitors, bestätigte die erfolgte Reduktion der P-ERK Expression. Bei den B35-NCAM140 (WT)-Zellen reduzierte sich die Expression um das 1,5-fache, bei den B35-NCAM140-S774D-Zellen um das 1,6-fache und bei den B35-NCAM140-S774A-Zellen ebenfalls um das 1,5-fache. Es konnte demnach bestätigt werden, dass es unter Zugabe des FGFR1-Inhibitors zu einer Abnahme der P-ERK Expression kommt. Dabei konnte jedoch zwischen den B35-NCAM140 (WT)-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen und den B35-NCAM140-S774D-Zellen kein Unterschied festgestellt werden.

3.4.3 Untersuchung des Fokalen Adhäsionen-Kinase (FAK)-Signalweges

Als weiterer Untersuchungsschwerpunkt im FGF-Rezeptor-unabhängigen Signaltransduktionsweg NCAMs wurde der Einfluss der Fokalen Adhäsions-Kinase, FAK, analysiert. FAK ist eine Nicht-Rezeptor Protein Tyrosin Kinase, die typischerweise, aber nicht immer mit supramolekularen Fokalen Adhäsionen Komplexen assoziiert. Die eigentliche Kinasedomäne von FAK ist zentral lokalisiert und wird von großen N- und C-terminalen Domänen flankiert. Am C-Terminus liegt die *focal adhesion targeting domain* (FAT-Domäne), an die Paxillin und Talin binden können [122].

Fokale Adhäsionen sind große, dynamische, membran-assoziierte Proteinkomplexe, die das Zytoskelett einer Zelle mit der Extrazellulärmatrix verbinden. Sie erfüllen einerseits eine rein strukturelle Funktion und wirken andererseits aber auch selber bei Signaltransduktionen als Reaktion auf Adhäsionsvorgänge und andere Stimulationen mit und initiieren diese [123]. Eine zentrale Stellung innerhalb der Fokalen Adhäsionen nimmt die Tyrosinkinase FAK ein [124].

3.4.3.1 Fokale Adhäsionen Assay

Es sollte der Einfluss der jeweiligen B35-Zelllinien auf den *turnover* von Fokalen Adhäsionen untersucht werden. Nach Optimierung der bestmöglichen Bedingungen wurde dafür ein Fokale Adhäsionen Assay durchgeführt. Die B35-Zelllinien wurden dafür auf Acht-Well-Permanox-Objekträgern ausgesät und für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen fixiert und anschließend erfolgte ein Anfärben der Zellen. Als primärer Antikörper wurde dafür ein Antikörper gegen Paxillin verwendet. Paxillin ist ein Adapterprotein der Fokalen Adhäsionen. Es spielt eine zentrale Rolle beim Verbinden von Signalen der extrazellulären Umwelt, die einen Einfluss auf die Umgestaltung der Zelle haben [125].

Anschließend wurden, wie in Abb. 21 gezeigt, mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie Fotos angefertigt. Die untransfizierten B35-Zellen zeigen sehr wenige bis kaum sichtbare Fokale Adhäsionen. Im Vergleich dazu weisen alle anderen mit NCAM-transfizierten B35-Zellen Paxillin-enthaltene Fokale Adhäsionen auf.

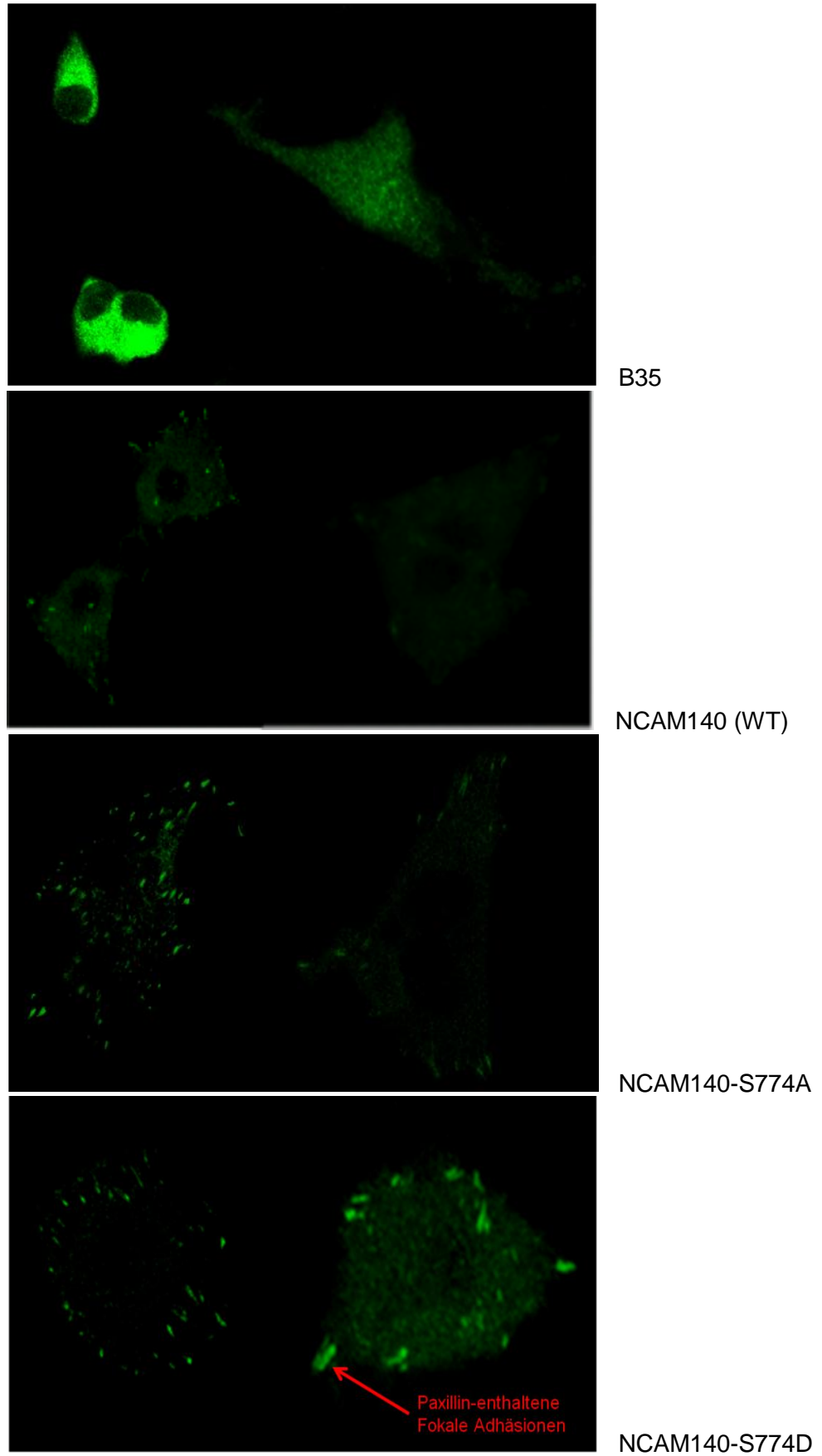


Abb. 21: Lokalisierung Fokaler Adhäsionen in den B35-Zelllinien

Ausgewählte Fotos an B35-Zelllinien, die mit Paxillin immungefärbt wurden.

Um zu überprüfen, ob es einen Unterschied im Vorhandensein an Fokalen Adhäsionen zwischen den einzelnen B35-Zelllinien gibt und um eindeutige Aussagen über die Anzahl der Fokalen Adhäsionen treffen zu können, wurden die angefertigten Fotos anschließend analysiert.

Dafür wurde die Anzahl an Paxillin-enthaltenen Fokalen Adhäsionen pro Zelle gezählt und diese hinterher mit Hilfe der Image J Software analysiert. Zur Analyse und Auswertung wurden die Fokalen Adhäsionen von 300 Zellen pro Zelllinie gezählt. Die dabei erhaltenen Angaben zur Anzahl der Fokalen Adhäsionen pro Zelle wurden anschließend mittels t-Test auf Signifikanz überprüft. In der Tab. 12 ist das Ergebnis dargestellt. Die untransfizierten B35-Zellen besitzen 0,76 Fokale Adhäsionen pro Zelle. Die B35-Zellen, die das NCAM140 (WT) exprimieren, kommen auf 13,32 Fokale Adhäsionen. Die Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen, bilden 15,81 Fokale Adhäsionen pro Zelle aus. Die B35-Zellen mit der Asparaginsäure-Mutation besitzen 17,59 Fokale Adhäsionen pro Zelle. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen transfizierten und untransfizierten B35-Zellen zu erkennen. Des Weiteren ist der in den photographierten Ausschnitten gezeigte Unterschied zwischen den einzelnen B35-Zelllinien bestätigt worden. Die wenigsten Fokalen Adhäsionen besitzen die Zellen, die das NCAM 140 (WT) überexprimieren. Die meisten Fokalen Adhäsionen besitzen die B35-Zellen, die die Mutation zu Asparaginsäure aufweisen (NCAM140-S774D).

Tab. 12: Anzahl an Fokalen Adhäsionen pro Zelle

Konstrukt	FA pro Zelle
B35	0,76
NCAM140 (WT)	13,32
NCAM-S774A	15,81
NCAM-S774D	17,59

In der Abb. 22 ist mittels Balkendiagramm die Anzahl an Paxillin-enthaltenen Fokalen Adhäsionen nochmals dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Unterschied zwischen den jeweiligen transfizierten B35-Zelllinien, in Bezug auf deren Anzahl an Fokalen Adhäsionen pro Zelle, im Vergleich zu den untransfizierten B35-Zellen signifikant ist. Die Signifikanzprüfung wurde mittels t-Test berechnet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der scheinbare Unterschied zwischen den einzelnen transfizierten B35-Zelllinien nicht signifikant ist und die Phosphorylierungsstelle keinen Einfluss auf die Ausbildung an Fokalen Adhäsionen hat.

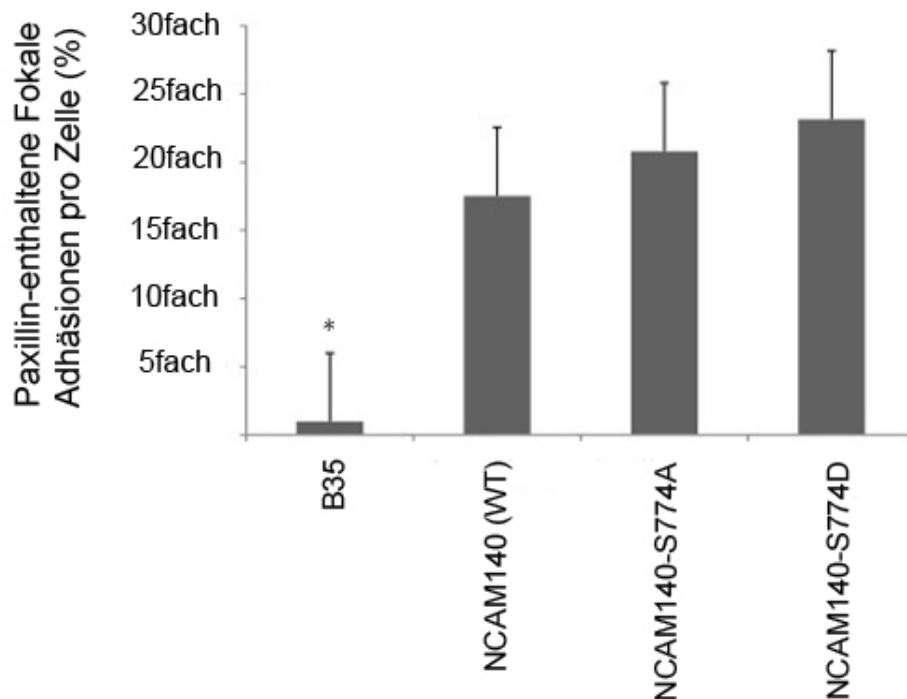


Abb. 22: Quantifizierung der Fokalen Adhäsionen in den jeweiligen B35-Zelllinien

Die in der Abbildung dargestellten Balken zeigen die Anzahl an Paxillin-enthaltenen Fokalen Adhäsionen pro Zelle als % der Kontrollzellen. Der Mittelwert der Kontrollzellen (untransfizierte B35-Zellen) ist mit 100 % gleichgesetzt.

3.4.3.2 Nachweis der FAK-Expression in B35-Zellen mittels Western Blot-Analyse

Mit Hilfe der Western Blot-Analyse sollte nun überprüft werden, ob es einen Unterschied in der Expression von FAK in den jeweiligen B35-Zelllinien gibt und ob die Phosphorylierungsstelle Serin 774 in der intrazellulären Domäne von NCAM einen Einfluss darauf hat. Weiterhin sollte mit dieser Methode überprüft werden, ob die gezeigten Beobachtungen in den Fokalen Adhäsionen Assay in Kapitel 3.4.3.1 sich auf diese Art bestätigen ließen.

Nach Ermittlung der optimalen Bedingungen für die Versuche wurden die B35-NCAM140 (WT)-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen, B35-NCAM140-S774D-Zellen und auch die untransfizierten B35-Zellen mit und ohne Zugabe von 33 µg/mL C3-Peptid für einen Zeitraum von 60 Minuten kultiviert und anschließend mit Hilfe der Western Blot-Analyse auf die Expression von FAK untersucht.

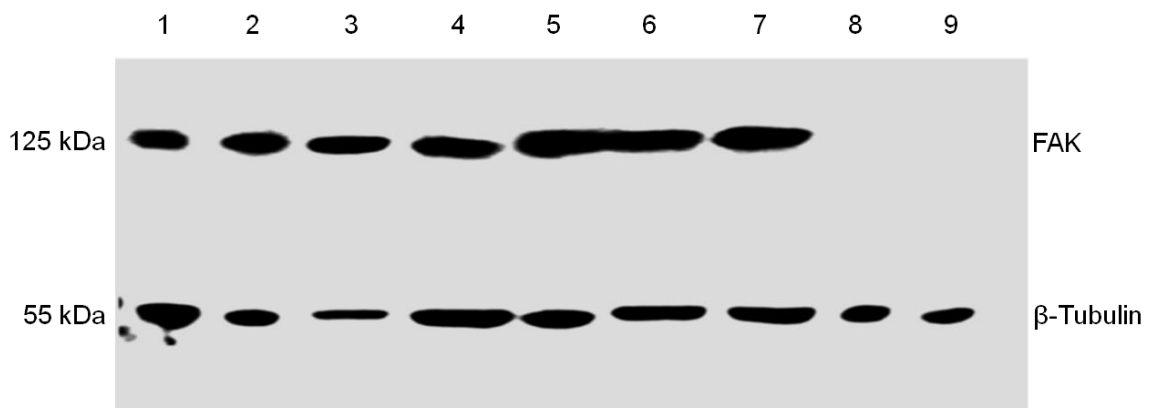


Abb. 23: Nachweis der FAK-Expression der jeweiligen B35-Zelllinien durch Western Blot-Analyse

Jeweils 50 µg Protein der Zellhomogenate wurden in einem 7%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines gegen FAK gerichteten Antikörpers dargestellt. Als Kontrolle diente β-Tubulin. Spuren: (M) Marker, (1) Positivkontrolle, (2) B35-NCAM140 (WT), (3) B35-NCAM140 (WT) + C3-Peptid, (4) B35-NCAM140-S774A, (5) B35-NCAM140-S774A + C3-Peptid, (6) B35-NCAM140-S774D, (7) B35-NCAM140-S774D + C3-Peptid, (8) B35, (9) B35 + C3-Peptid

In der Abb. 23 ist zu erkennen, dass alle B35-Zellen, die stabil mit einem NCAM-Konstrukt transfiziert wurden, eine Expression von FAK bei 125 kDa aufweisen. Bei den untransfizierten B35-Zellen ist sowohl mit als auch ohne Stimulation mit dem C3-Peptid keine Expression von FAK detektierbar. Im unstimulierten Zustand, ohne Zugabe des C3-Peptides, ist zwischen den B35-NCAM140-Zellen, den B35-NCAM140-S774A-Zellen und den B35-NCAM140S774D-Zellen kein Unterschied in der Expression an FAK zu erkennen. Nach Zugabe von C3-Peptid war zwischen den jeweiligen NCAM-transfizierten B35-Zelllinien ebenfalls kein Unterschied zu erkennen.

Nach Analysierung und Quantifizierung der Western Blots mit der GelEval 1.22 Software konnten die Beobachtungen ebenfalls bestätigt werden. Es konnte sowohl in Anwesenheit des C3-Peptides als auch in Abwesenheit kein Unterschied in der Expression an FAK zwischen den B35-Zellen, die NCAM140 (WT) exprimieren und den B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin oder von Serin zu Asparaginsäure aufweisen, festgestellt werden. Die Expression an FAK ist in Anwesenheit des Peptides um das 1,2 bis 1,3-fache erhöht.

Es konnte gezeigt werden, dass die in den Fokalen Adhäsionen Assay erhaltenen Ergebnisse sich in Bezug auf die Anzahl an Fokalen Adhäsionen pro Zelle auch molekularbiologisch mittels Western Blot-Analyse bestätigen ließen. Zusammenfassend ist festgestellt worden, dass die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 im neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM keinen Einfluss auf den FAK-vermittelten Signaltransduktionsweg auszuüben scheint.

3.5 Untersuchungen zur Endozytose und zum Abbau der unterschiedlichen NCAM-Konstrukte

Kleene et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass die Stimulation von NCAM mit NCAM-Antikörpern in einer proteolytischen Prozessierung von NCAM und FAK resultiert. Das C-terminale Fragment von NCAM, welches aus der intrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und einem Teil der extrazellulären Domäne besteht, und das N-terminale Fragment von FAK werden dabei in den Zellkern importiert. Es wird diskutiert, dass dadurch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden kann [104].

Die Endozytose ist ein Mechanismus, welcher dynamisch die Menge der Expression NCAMs an der Zelloberfläche beeinflusst und viele rapide Veränderungen der Expression NCAMs unter verschiedenen physiologischen oder pathologischen Bedingungen zur Folge haben kann. Die Endozytose ist generell sehr entscheidend in der *down*-Regulation von Zelloberflächenmolekülen und für Signaltransduktionsprozesse. Der am besten charakterisierte Endozytosesignalweg ist der Clathrin-abhängige. Neben diesem gibt es auch Clathrin-unabhängige Wege, wie die Caveolae- oder *lipid raft*-abhängige Endozytose, die gut beschrieben sind [97]. In Neuronen ist die Endozytose entscheidend für die korrekten Funktionen von Synapsen. Die Stabilität und Plastizität synaptischer Kontakte scheint zum Beispiel durch die Endozytose von mit dem Zytoskelett assoziierten Proteinen reguliert zu werden. Bisher ist die Internalisierung (Einschleusung) von NCAM durch den Clathrin-abhängigen Weg in Astrocyten und B35-Zellen gezeigt worden [126]. Über die Endozytose von NCAM in Neuronen ist bisher nicht viel bekannt. Diestel et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass die Endozytose von NCAM in seinen Funktionen involviert ist [101].

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde, neben den Untersuchungen und verschiedenen durchgeführten Experimenten in Bezug auf die Signaltransduktion NCAMs, die Endozytose der verschiedenen generierten NCAM-Konstrukte untersucht. Dabei sollte überprüft werden, ob die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 einen Einfluss auf die Endozytose und den Abbau der unterschiedlichen NCAM-Konstrukte hat und somit Rückschlüsse auf die zuvor erhaltenen Ergebnisse zur Untersuchung der Signaltransduktionswege gezogen werden können. Diese Fragestellung wurde durch Bestimmung der Halblebenszeiten von NCAM in den jeweiligen B35-Zelllinien beantwortet. Dafür wurde eine nicht-radioaktive Methode genutzt, bei der Biotin als Marker verwendet wurde.

Die Halblebenszeit von stabil transfizierten B35-Zellen mit NCAM140, NCAM140-S774A und NCAM140-S774D wurde durch den im Western Blot erkennbaren Abbau des spezifischen mit Biotin markierten NCAMs bestimmt. Dafür wurden die Plasmamembranen der jeweiligen B35-Zelllinien mit Biotin markiert und NCAM nach den Zeiträumen von 0, 4, 10, 20 und 48 Stunden nach Markierung mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper 5B8 immunpräzipitiert. Die spezifischen Markierungen wurden anschließend durch die Kennzeichnung mit Streptavidin, welches mit *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt ist, detektiert. Jeweils ein ausgewähltes und repräsentatives Experiment von mindestens sieben durchlaufenden Versuchen ist in der Abb. 24 dargestellt. Das Molekulargewicht der gezeigten NCAM-Banden liegt bei 140 kDa. Wie zu erkennen ist, kommt es bei den jeweiligen B35-Zelllinien mit erfolgter Zeitzunahme zum Abbau von NCAM. Die am stärksten detektierbare Bande befindet sich jeweils bei allen NCAM-Konstrukten bei 0 Stunden und nimmt dann mit zunehmendem Zeitverlauf signifikant ab. Die gezeigten Abbildungen sind ausgewählte Bilder und spiegeln die bestmöglichen Darstellungen mehrerer durchgeführter Experimente (n=7 - 9) wider.

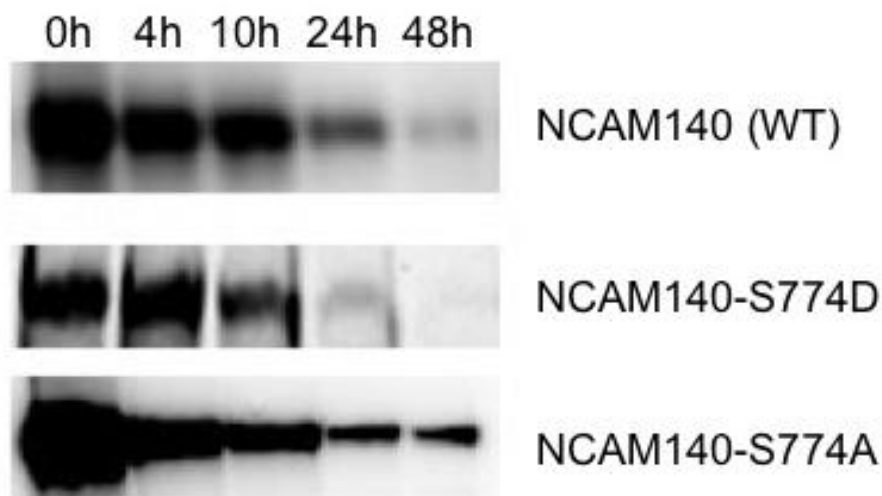


Abb. 24: Abfall der NCAM140-spezifischen Biotinmarkierungen in B35 Zellen

Plasmamembranen von B35 Zellen wurden mit Biotin markiert und 4, 10, 24 und 48 Stunden danach wurde NCAM mit dem monoklonalem AK 5B8 präzipitiert. Die spezifischen Markierungen wurden durch anschließende Kennzeichnung mit HRP gekoppeltem Streptavidin im Western Blot sichtbar. Jeweils 15 μ L Präzipitat wurden in einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot analysiert.

Die NCAM-spezifischen Banden mehrerer durchgeführter Experimente wurden anschließend mit der GelEval 1.22 Software quantifiziert und die Halblebenszeiten der einzelnen Konstrukte errechnet. Dafür wurde der Ausgangswert bei 0 Stunden mit

100 % gleichgesetzt. Die errechneten Halblebenszeiten ($T_{1/2}$) der unterschiedlichen NCAM-Konstrukte sind in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: Halblebenszeiten der einzelnen NCAM-Konstrukte.

Konstrukt	$T_{1/2}$ (h)
NCAM140 (WT)	29 +/- 5
NCAM-S774A	19 +/- 5
NCAM-S774D	28 +/- 5

B35-Zellen, die stabil mit NCAM 140 (WT) transfiziert wurden, weisen eine durchschnittliche Halblebenszeit von 29 +/- 5 h auf. Die Mutation von Serin 774 zu Alanin (S774A) in den B35-NCAM140-S774A-Zellen führt zu einer Reduzierung der Halblebenszeit auf 19 +/- 5 h. In den B35-NCAM140-S774D-Zellen, die die Mutation von Serin zu Asparaginsäure (S774D) aufweisen, konnte kein Effekt im Vergleich zum NCAM140 (WT) gezeigt werden und ihre Halblebenszeit liegt bei 28 +/- 5 h.

In der Abb. 25 sind die Halblebenszeiten der einzelnen NCAM-Konstrukte noch einmal schematisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die B35-NCAM140-S774A-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen, die geringste Halblebenszeit aufweisen und die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 einen Einfluss auf die Endozytose auszuüben scheint.

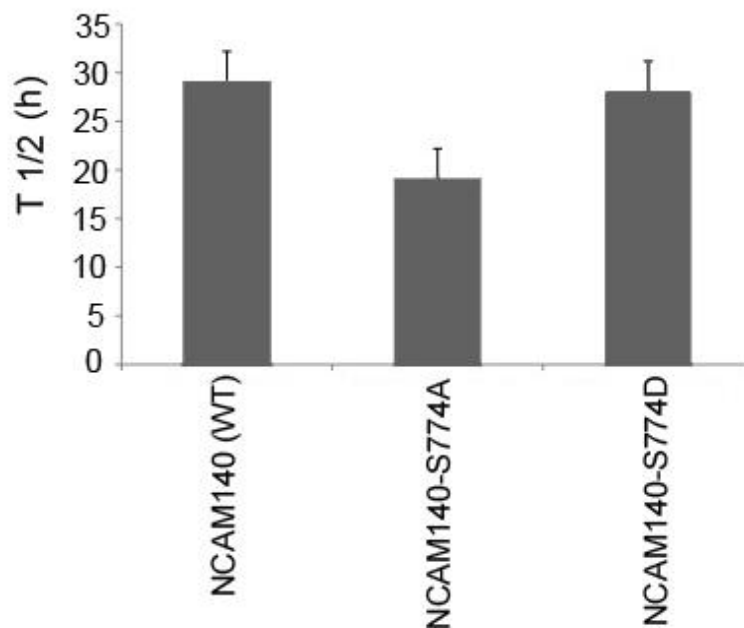


Abb. 25: Halblebenszeiten der einzelnen NCAM-Konstrukte

4 Diskussion

Entgegen früheren Vorstellungen weiß man heute, dass das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM in vielfältiger Weise an molekularen Wechselwirkungen und Signaltransduktionskaskaden beteiligt ist. Diese Interaktionen, in die NCAM involviert ist, können dabei sowohl homo- als auch heterophiler Natur sein. Bei der Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden kommt es zum Weiterleiten NCAM-vermittelter Signale in die Zelle, die daraufhin entsprechend reagieren kann. Zu den am besten untersuchten Reaktionen von Nervenzellen auf NCAM-vermittelte Signale zählt dabei das Neuritenwachstum [27].

Obwohl das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM sehr gut charakterisiert ist, ist über die genaue Funktion der Phosphorylierungen im Bereich seiner cytoplasmatischen Domäne und deren Auswirkung auf die NCAM-induzierten Signalwege bisher noch wenig bekannt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Mutanten von NCAM 140 hergestellt, um Aufschlüsse darüber zu erlangen, welche Rolle die Phosphorylierungen NCAMs im Bereich seiner cytoplasmatischen Domäne bei Signaltransduktionsprozessen spielen. Dafür wurde das Serin an Position 774 zum einen gegen Alanin ersetzt, um die potentielle Phosphorylierung zu verhindern und zum anderen gegen Asparaginsäure ersetzt, um eine dauerhafte Phosphorylierung vorzutauschen. Die durchgeführten Versuche für die Untersuchungen zur Signaltransduktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM 140 wurden in B35-Neuroblastomzellen durchgeführt. Die Resultate der Versuche zeigten, dass die in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM befindliche, als höchste potentiell phosphorylierbare Aminosäure Serin an der Stelle 774 einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum ausübt. Dabei übt sie jedoch keinen Einfluss auf die NCAM-induzierten FGF-Rezeptor-abhängigen und -unabhängigen Signalwege aus.

In weiteren Versuchen wurde die Endozytose des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM 140 untersucht. Dabei konnte anhand von Bestimmungen der Halblebenszeiten der jeweiligen B35-Zelllinien gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsstelle Serin 774 in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM ebenfalls einen Einfluss auf die Endozytose des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM 140 hat.

4.1 Untersuchungen zur Bedeutung der Phosphorylierungsstelle Serin 774 von NCAM bei Signaltransduktionsprozessen

Es konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von NCAM spezifisch für Differenzierungsvor-

gänge, wie z. B. für das Neuritenwachstum ist [53]. Des Weiteren wurde darüber spekuliert, ob mögliche Phosphorylierungen spezifischer Aminosäuren im Bereich der cytoplasmatischen Domäne gleichzeitig die Funktion von NCAM kontrollieren können. Kolkova et al. konnten in Versuchen mit PC12-E2-Zellen zeigen, dass die Aminosäurereste Thr-Glu-Val-Lys-Thr (839 – 843) im C-terminalen Teil der cytoplasmatischen Region von NCAM 140 essentiell für das Neuritenwachstum sind [118].

In der Arbeitsgruppe Diestel et al. wurden Versuche am NCAM 180 durchgeführt, bei denen die Bedeutung der phosphorylierbaren Aminosäure Tyrosin an der Stelle 734 untersucht werden sollte. Dabei wurde die einzige in der cytoplasmatischen Domäne befindliche Aminosäure Tyrosin im menschlichen NCAM 180 gegen Phenylalanin ausgetauscht. Das Resultat dieses Versuches war ein gesteigertes Neuritenwachstum der mit NCAM180-Y734F transfizierten B35-Zellen im Vergleich zu den NCAM180-WT Transfektanten auf dem Substrat poly-L-Lysin. Dieses gesteigerte Neuritenwachstum war nachweislich auf eine höhere FGF-Rezeptor 1- und ERK1-Aktivität zurückzuführen [56].

4.1.1 Erzeugung von NCAM-Mutanten mittels ortsgerechter Mutagenese

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Phosphorylierungen im Bereich der cytoplasmatischen Domäne des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM auf seine Signalwege ausüben, wurden in dieser Arbeit die NCAM-Konstrukte pRc/CMV-NCAM140-S774A, pRc/CMV-NCAM180-S774A, pRc/CMV-NCAM140-S774D und pRc/CMV-NCAM180-S774D generiert (siehe Abb. 9). Für die während dieser Promotionsarbeit durchgeführten Versuche wurden dabei nur die NCAM140-Konstrukte berücksichtigt und jeweils mit dem NCAM140-Wildtyp verglichen. Das NCAM 140-Molekül wurde deshalb ausgewählt, da von ihm bekannt ist, dass es das Neuritenwachstum fördert [127] [128].

Mit Hilfe des Computerprogrammes NetPhos 2.0 wurde die Aminosäure Serin 774 als höchste potentiell phosphorylierbare Aminosäure in der cytoplasmatischen Domäne des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles NCAM mit einem Wert von 0,994 identifiziert. Weiterhin wurde diese Phosphorylierungsstelle auch in mehreren Massenproteomanalysen gefunden [58] [59]. Deshalb wurde sie für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bezüglich der Signaltransduktionen NCAMs ausgewählt. Um der Frage nachgehen zu können, ob diese Phosphorylierungsstelle eine Rolle in der NCAM-induzierten Signalwegweiterleitung spielt, wurde das für Serin kodierende Triplet TCA durch Austausch einer Base in das für Alanin kodierende Triplet GCA bzw. durch Austausch des ganzen Triplets in das für Asparaginsäure kodierende Triplet GAT umgewandelt (sie-

he Abb. 10 und Abb. 11). Dadurch sollte die Phosphorylierung zum einen durch Austausch mit der nicht phosphorylierbaren Aminosäure Alanin (S774A) verhindert werden und zum anderen durch Austausch gegen Asparaginsäure (S774D) eine negative Ladung an die potentielle Phosphorylierungsstelle addiert werden, um dadurch eine dauerhafte Phosphorylierung zu imitieren.

4.1.2 Stabile Expression der generierten NCAM-Konstrukte in B35-Zellen

Als eukaryotisches Zellkultursystem für die funktionellen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden B35-Zellen ausgewählt. Bei diesen Zellen handelt es sich um Neuroblastomzellen, welche aus dem ZNS der Ratte stammen und endogen nur sehr geringe Mengen an NCAM exprimieren [56]. Weiterhin ist bekannt, dass diese Zellen einfach zu kultivieren und zu transfizieren sind und sich sehr gut für molekulare Analysen zur Überprüfung von Endozytosevorgängen und Signalwegen eignen, insbesondere für solche, bei denen Neuritenwachstum und Zellmotilität eine Rolle spielen [129].

Nach Transfektion von B35-Zellen mit den unterschiedlichen cDNAs der generierten NCAM-Konstrukte und des NCAM140-WT wurde die Expression von NCAM im Western Blot nachgewiesen (siehe Abb. 12). Anhand dieser Analyse wurden die Klone identifiziert, die das eingebrachte Maus-NCAM überexprimieren. Für die weiteren Experimente wurden Zellklone mit ähnlichem Expressionsniveau ausgewählt und mit diesen dann in den folgenden Untersuchungen weitergearbeitet. Um klonale Unterschiede vermeiden und ausschließen zu können, wurden jeweils 2 Klone für die weitergeführten Experimente kultiviert und für die Analysen genutzt. In der Western Blot-Analyse zeigte sich, dass die untransfizierten B35-Zellen geringe bis kaum detektierbare Mengen an endogenem NCAM140 exprimieren.

4.1.3 Untersuchungen zum zelleigenen NCAM-vermittelten Neuritenwachstum in B35-Zellen

Bei der Analyse zu den „Untersuchungen der Signaltransduktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM)“ wurde das Augenmerk zuerst auf das Neuritenwachstum gelegt, eine der am besten untersuchten Reaktionen von Nervenzellen auf NCAM-vermittelte Signale [27]. Dafür wurden die mit verschiedenen NCAM-Mutanten transfizierten B35-Zellen verglichen. Alle NCAM-transfizierten B35-Zellen zeigten im Vergleich zu den untransfizierten B35-Zellen ein gesteigertes Neuritenwachstum (siehe Abb. 13). Das stärkste Neuritenwachstum zeigten die B35-NCAM140-Zellen. Ein geringeres Neuritenwachstum wurde in den B35-NCAM140-S774D-Zellen beobachtet, wohingegen jedoch der Austausch der Aminosäure Serin zu Alanin in den B35-

NCAM140-S774A-Zellen eine nochmals deutlichere Abnahme des Neuritenwachstums zeigte.

Doherty et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass das durch homophile NCAM-Interaktion induzierte Neuritenwachstum erst eintritt, wenn die Expression an NCAM einen bestimmten Schwellenwert erreicht hat [63]. Möglicherweise übt die Phosphorylierungsstelle einen Einfluss auf die Interaktionen zwischen den einzelnen NCAM-Molekülen untereinander aus und das Bestreben, homophile Bindungen einzugehen, ist unter phosphorylierten Umständen größer. Folglich lässt sich sagen, dass sowohl die B35-NCAM140-Zellen als auch die B35-NCAM140-S774D-Zellen diesem Bestreben eher nachgehen und der geforderte Schwellenwert bei ihnen dadurch eher erreicht wird als bei den B35-NCAM140-S774A-Zellen. Dadurch wäre das gesteigerte Neuritenwachstum im Vergleich zu den NCAM-transfizierten B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen, zu erklären.

Kiselyov et al. zeigten in ihren Versuchen, dass das durch homophile NCAM-Interaktionen induzierte Neuritenwachstum ein Anhäufen von NCAM-Molekülen erfordert. Diese Anhäufung der NCAM-Moleküle erhöht daraufhin die lokale Konzentration an heterophilen Signaltransduktions-Bindungspartnern von NCAM wie z. B. dem FGF-Rezeptor [71]. In der Arbeitsgruppe Diestel et al. wurden Versuche am NCAM 180 durchgeführt, bei denen die Bedeutung der phosphorylierbaren Aminosäure Tyrosin an der Stelle 734 untersucht wurde. Dabei wurde die einzige in der cytoplasmatischen Domäne befindliche Aminosäure Tyrosin im menschlichen NCAM 180 gegen Phenylalanin ausgetauscht. Das Resultat dieses Versuches war ein gesteigertes Neuritenwachstum der mit NCAM180-Y734F transfizierten B35-Zellen im Vergleich zu den NCAM180-WT Transfektanten auf dem Substrat poly-L-Lysin. Dieses gesteigerte Neuritenwachstum war nachweislich auf eine höhere FGF-Rezeptor 1- und ERK1-Aktivität zurückzuführen [56].

Möglicherweise lässt sich ein ähnliches Geschehen auch in dieser Arbeit zeigen. Es könnte die Möglichkeit bestehen, dass durch das Abschaffen der Phosphorylierungsstelle sowohl die Aktivität des FGF-Rezeptors als auch die Aktivität von ERK1 vermindert ist. Dadurch ist das Neuritenwachstum nicht in dem Maße stimulierbar, wie es mit bestehender Phosphorylierung oder in den B35-NCAM140-S774D-Zellen mit vorgetäuschter Dauerphosphorylierung der Fall ist. Diese Vermutung würde die oben genannte ebenfalls bekräftigen. Durch das geringere Bestreben der Zellen, homophile NCAM-Interaktionen einzugehen, nimmt die lokale Konzentration an heterophilen Signaltransduktions-Bindungspartnern von NCAM wie z. B. dem FGF-Rezeptor ab. Somit könnten die B35-NCAM140-S774A-Zellen den FGF-Rezeptor gar nicht in gleichem Maße aktivieren, da seine Konzentration in dem Fall geringer wäre.

Weiterhin lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Phosphorylierung auch einen Einfluss auf die Assoziation von NCAM mit intrazellulären Tyrosinkinase, wie z. B. der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p59^{lyn} und der fokalen Adhäsionskinase p125^{fak}, hat. Von beiden Kinasen ist bekannt, dass sie als NCAM-vermittelte Signaltransduktionswege eine Rolle beim Neuritenwachstum spielen [80].

Büttner et al. identifizierten 5 Proteine, die direkt an die intrazelluläre Domäne von NCAM binden. Zu diesen 5 gehören unter anderem RPTP α und PLC γ [130]. Beide Proteine sind in Signalwege involviert, die im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum eine Rolle spielen [121]. Es besteht die Möglichkeit, dass diese intrazellulären Liganden, aufgrund der fehlenden Phosphorylierung in der cytoplasmatischen Domäne, nicht an NCAM binden. Dadurch könnten die Signalwege, die das Neuritenwachstum induzieren, auch nicht aktiviert werden.

Um diese Vermutungen zu bekräftigen, wurden in dieser Arbeit weitere Experimente durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, welche NCAM-induzierten Signalwege für das unterschiedliche Neuritenwachstum eine Rolle spielen. Diese werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

4.1.4 Untersuchung des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums nach Stimulation mit dem C3-Peptid

Für die Untersuchungen der NCAM-vermittelten Signaltransduktionen wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Weit verbreitet sind dabei die Co-Kultur-Versuche, bei denen die Zellen auf Monolayern von NCAM-exprimierenden Fibroblasten ausgesät werden [86]. Daneben verwenden einige Arbeitsgruppen auch synthetische Peptidmimetika [93] [94]. Um die Rolle der Phosphorylierung an Serin 774 beim NCAM-vermittelten Neuritenwachstum in dieser Arbeit näher zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem synthetischen Peptidmimetika stimuliert. Diese Peptidmimetika werden in der Forschung einerseits eingesetzt, um neue Erkenntnisse über die NCAM-involvierten homophilen Interaktionen und auch intra- und extrazellulären Interaktionen zu erhalten und andererseits, um das Neuritenwachstum und Überleben von Zellen genauer zu charakterisieren. Viele Arbeitsgruppen verwenden neben diesen auch lösliches NCAM oder NCAM-Fc-Chimere zur Stimulation des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums [131] [76].

Ronn et al. zeigten, dass das synthetische Peptid C3 an die erste Ig-Domäne von NCAM bindet, die homophilen NCAM-NCAM-Interaktionen imitiert und das Neuritenwachstum in Folge der Erhöhung der cytoplasmatischen Calciumkonzentration, der Aktivierung von ERK1/2, Akt/PKB und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB

induziert [93] [94]. Daher schien es wahrscheinlich, dass es auch dazu befähigt ist, die in dieser Arbeit zu untersuchenden Konstrukte in Bezug auf deren Neuritenwachstum zu stimulieren.

Die Zugabe des C3-Peptides führte, wie es zu erwarten war, in allen B35-Zelllinien zu einer Steigerung des Neuritenwachstums (siehe Abb. 14). Bereits nach 24 Stunden konnte eine deutliche Veränderung der Zellen in Bezug auf deren Neuritenwachstum beobachtet werden. Die größte Induktion durch das Peptid zeigten die B35-NCAM140-Zellen und B35-NCAM140-S774D-Zellen. Interessanterweise war nun zwischen diesen kaum noch ein Unterschied zu erkennen. Das Neuritenwachstum der B35-NCAM140-S774A-Zellen wurde jedoch geringer induziert. Die nicht NCAM-exprimierenden B35-Zellen dagegen zeigten nur eine geringe Steigerung. Sowohl in Anwesenheit des Peptides als auch in Abwesenheit war ein Unterschied im Neuritenwachstum zwischen den jeweiligen NCAM-transfizierten B35-Zellen zu erkennen. Das Neuritenwachstum der B35-NCAM140-S774A-Zellen war unter beiden Bedingungen am wenigsten ausgeprägt.

Nach einer Kultivierung von 72 Stunden erwies sich in Bezug auf die Differenzierung bzw. das Auswachsen der Neuriten hinsichtlich der Zellen, die nur 24 Stunden mit dem Peptid inkubiert wurden, kein erkennbarer Unterschied. Vermutlich kommt es ab einer bestimmten Inkubationszeit bzw. Konzentration an Peptid zum Erreichen eines Wertes, bei dem das NCAM-induzierte Neuritenwachstum durch die Stimulation mit dem C3-Peptid eine Sättigung erreicht. Dabei könnten alle beteiligten Signalwege, die zur Stimulierung des Neuritenwachstums beigetragen haben, in ihrer Aktivierung vollkommen ausgeschöpft worden sein oder durch einen Feedbackmechanismus die Stimulation eingestellt haben. Diese Vermutung würde die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bei Versuchen mit dem Peptid widerspiegeln. Ronn et al. beobachteten bei Experimenten mit dem C3-Peptid, dass bei einer Konzentration von 1 - 2 μM das Neuritenwachstum stimuliert wird und ab einer Konzentration von 5 μM kein stimulierender Effekt mehr vorhanden ist [93]. Dabei wird vermutet, dass sich die Konzentration an Peptid zum Erreichen des stimulierenden Effekts „glockenförmig“ verhält. Somit könnte die hier hervorgerufene Hypothese einer Sättigung Bestätigung finden. Es wurde wahrscheinlich von Anfang an eine Konzentration eingesetzt, die eine maximale Stimulation des Neuritenwachstums induziert. Dadurch konnte kein ersichtlicher Unterschied der Neuritenlänge nach den verschiedenen Zeiträumen gezeigt werden.

Wie Ronn et al. bereits zeigten, konnte bestätigt werden, dass das C3-Peptid zu einer Stimulierung der homophilen NCAM-NCAM-Interaktionen führt und sich dadurch das Neuritenwachstum steigern lässt [93] [94]. Das Verhindern der Phosphorylierung an Serin 774 in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM in den B35-NCAM140-S774A-

Zellen führte in diesen Versuchen zu einer geringeren Induktion des Neuritenwachstums. Ditlevsen et al. konnten anhand von Versuchen mit CNGs (*rat cerebellar granule neurons*) zeigen, dass die mittels C3-Peptid induzierte NCAM-Stimulation eine Phosphorylierung von ERK, Akt und CREB bewirkt [132]. Von allen ist bekannt, dass sie als Signalwege im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum involviert sind [133]. Es kann somit vermutet werden, dass durch die fehlende Phosphorylierung die durch C3-Peptid induzierte NCAM-Stimulation und dadurch erfolgte Aktivierung der verschiedenen Signalwege nicht in gleichem Maße ausgeprägt ist, wie es mit Phosphorylierung zu sein scheint. Dies würde mit den zuvor gezeigten Untersuchungen des Neuritenwachstums ohne Stimulation durch das Peptid übereinstimmen. Es ließ sich somit die Vermutung bestätigen, dass die Phosphorylierung einen Einfluss auf die NCAM-induzierten Signalwege auszuüben scheint, die beim NCAM-vermittelten Neuritenwachstum involviert sind.

4.1.5 Quantifizierung des Neuritenwachstums im *xCELLigence Real-Time-Cell-Analyser* Gerät

Zur Quantifizierung des Neuritenwachstums wurde eine neuartige Messmethode etabliert, die eine effektivere Bestimmung des Neuritenwachstums im Vergleich zur bisher üblichen Methode, bei der die Neuriten von Hand einzeln ausgemessen und analysiert werden, ermöglicht. Das RTCA Gerät quantifiziert das Zellwachstum und die Morphologie der Zelle unter Angabe eines Zellindexes, der auf Impedanz basiert. In Versuchen mit PC12-Zellen konnte gezeigt werden, dass der erhaltene Zellindex des RTCA Gerätes mit der sonst üblichen Quantifizierung des Neuritenwachstums (Ausmessen und Analysieren mittels Photoshop) übereinstimmt [60]. Aus diesem Grund wurde der Zellindex in dieser Arbeit als Parameter des Neuritenwachstums verwendet. In den durchgeführten Experimenten mit dem RTCA Gerät wurden die zuvor beobachteten Unterschiede im Neuritenwachstum zwischen den jeweiligen B35-Zelllinien mit Hilfe des gemessenen Zellindexes bestätigt.

In den Versuchen zum zelleigenen NCAM-vermittelten Neuritenwachstum ohne Peptidzugabe ließ sich ein sichtbarer Unterschied im Neuritenwachstum anhand der dargestellten Zellindices der jeweiligen B35-Zellen erkennen (siehe Abb. 16). Es konnte, wie in den vorigen Versuchen gezeigt, bestätigt werden, dass der Zellindex der B35-NCAM140-Zellen am größten ist. Der Zellindex der B35-NCAM140-S774D-Zellen ist dagegen nur ein wenig geringer. Eindeutig niedriger ist jedoch der Zellindex der transfizierten B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen.

Wie zu erwarten war, konnte in den Versuchen mit dem *Real-Time-Cell-Analyser* bestätigt werden, dass das C3-Peptid das Neuritenwachstum der mit NCAM-transfizierten B35-Zellen stimuliert (siehe Abb. 17). Die nicht NCAM-transfizierten B35-Zellen zeigten nur eine geringere Induktion des Neuritenwachstums. Bei den NCAM-transfizierten B35-Zellen, die das NCAM140-S774A exprimieren, konnte ein weniger starkes Neuritenwachstum im Vergleich zu den Zellen, die NCAM140 und NCAM140-S774D exprimieren, beobachtet werden. Interessanterweise war auch hier fast keine Differenz im Zellindex zwischen den B35-NCAM140-Zellen und B35-NCAM140-S774D-Zellen zu erkennen. Obwohl unbekannt ist, wie hoch der Anteil an phosphoryliertem Serin 774 vor, während und nach dem Neuritenwachstum war, konnte beobachtet werden, dass das Neuritenwachstum der mit C3-Peptid stimulierten B35-NCAM140-S774A-Zellen ungefähr gleich stark ausgeprägt ist wie das der B35-NCAM140 (WT)-Zellen, die nicht mit dem Peptid stimuliert wurden.

Es konnte wiederum gezeigt werden, dass die Phosphorylierung in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM an Position 774 einen entscheidenden Einfluss auf das zelleigene und auch auf das stimulierte NCAM-vermittelte Neuritenwachstum ausübt. Für die Beobachtung der Experimente im RTCA Gerät können die gleichen Ansätze wie in den Kapiteln 4.1.3 und 4.1.4 (Untersuchungen zum zelleigenen und stimulierten NCAM-vermittelten Neuritenwachstum) diskutiert werden. Wie bereits erwähnt, ist es denkbar, dass die fehlende Phosphorylierung einen Einfluss auf das Bestreben der Zellen hat, unter ihresgleichen homophile NCAM-Interaktionen einzugehen. Die genauen Mechanismen, die für das Eingehen homophiler Verbindungen verantwortlich sind, bleiben strittig. Wie in dem Review von Kiselyov et al. beschrieben, liegt NCAM in Abwesenheit von anderen NCAM-Molekülen auf der Zell-Oberfläche als *cis*-Dimer vor. Diese *cis*-Dimere gehen dann in *trans* zu existierenden *cis*-Dimeren der anderen NCAM-exprimierenden Zellen Bindungen ein [71]. Es besteht die Möglichkeit, dass die fehlende Phosphorylierung an Serin 774 einen Einfluss auf die Konformation der NCAM-Moleküle ausübt und durch eine Konformationsänderung das Eingehen von *trans*-Bindungen zwischen den NCAM-Molekülen nicht mehr gegeben ist. Dadurch wäre das nachlassende Bestreben der Moleküle, homophile Bindungen einzugehen, zu erklären. Es könnte weiterhin die Hypothese aufgestellt werden, dass durch Peptidstimulation die mögliche Konformationsänderung in den B35-NCAM140-S774A-Zellen unterbunden wird, da sich ihr Neuritenwachstum durch Stimulation mit dem C3-Peptid auf das Level der NCAM-140 (WT)-Zellen ohne Peptidstimulation induzieren lässt. Somit ist denkbar, dass die NCAM-exprimierenden B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin (S774A) aufweisen, sich in Anwesenheit des C3-Peptides anders verhalten als beim Eingehen homophiler Bindungen untereinander.

4.2 Untersuchungen der NCAM-induzierten Signalwege

Wie bereits gezeigt, übt die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM einen entscheidenden Einfluss auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum aus. Es wurde nun genauer untersucht, welche Signalwege darin involviert sind. Dazu wurden die NCAM-induzierten Signalwege ausgewählt, die in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB enden. Jessen et al. konnten in Versuchen mit PC12-Zellen zeigen, dass phosphoryliertes CREB für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum essentiell ist [86]. Zum jetzigen Stand der Forschung sind zwei Möglichkeiten der Signalweiterleitung von NCAM, die in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB enden, bekannt. Ein Weg führt über die Nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn und der andere über den FGF-Rezeptor.

4.2.1 Untersuchung der CREB-Aktivierung

Es ist bekannt, dass durch das Clustering von NCAM 140-Molekülen auf der Oberfläche von B35-Neuroblastomzellen CREB an Serin 133 phosphoryliert werden kann. Das somit aktivierte CREB fungiert dann als Transkriptionsfaktor für Gene, die das *cAMP-Response Element* (CRE) in der Promoterregion enthalten [78]. Dass phosphoryliertes CREB für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum essentiell ist, konnten Jessen et al. in Versuchen mit PC12-Zellen zeigen [86]. Des Weiteren ist bekannt, dass beim NCAM-vermittelten Neuritenwachstum die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB induziert wird [121] und dass die Stimulierung von NCAM mittels C3-Peptid mit einer verstärkten Phosphorylierung von CREB einhergeht [78]. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der Western Blot-Analyse auf Proteinebene die Expression an CREB und Phospho-CREB mit und ohne Anwesenheit des C3-Peptides untersucht (siehe Abb. 18). Es konnte festgestellt werden, dass sowohl mit als auch ohne Peptid behandelte Zellen eine Expression an CREB zeigen und dass zwischen ihnen in der Expression kein Unterschied zu erkennen war. In Abwesenheit des C3-Peptides war in allen NCAM-exprimierenden B35-Zelllinien keine Expression an P-CREB detektierbar. Eine Phosphorylierung und daraus resultierende Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB konnte in Anwesenheit des C3-Peptides dagegen jedoch nur bei den B35-NCAM140-(WT)-Zellen und den B35-NCAM140-S774D-Zellen beobachtet werden. Es konnte keine Phosphorylierung und somit keine Aktivierung von CREB in den B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen, nach erfolgter Stimulation mit dem C3-Peptid gezeigt werden.

Das C3-Peptid konnte sowohl in den NCAM140 (WT)-Zellen als auch in den B35-NCAM140-S774D-Zellen eine Aktivierung von CREB durch Phosphorylierung an Se-

rin 133 induzieren. Wie Ditlevsen et al. in Versuchen mit CNGs (*rat cerebellar granule neurons*) zeigten, wird der Transkriptionsfaktor CREB nach erfolgter NCAM-Stimulation mittels C3-Peptid phosphoryliert. Weiterhin fanden sie heraus, dass die über C3 vermittelte CREB-Phosphorylierung nur über die Signalwege der Src-Kinasen und MEK vermittelt wird [132]. Diese Beobachtung findet Übereinstimmung mit dem Ergebnis dieser Arbeit, dass das C3-Peptid eine Aktivierung von CREB induzieren kann. Da keine Aktivierung in den Zellen nachzuweisen war, in denen die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 in der cytoplasmatischen Domäne mutiert wurde (B35-NCAM140-S774A-Zellen), lässt sich hiermit die aufgestellte Hypothese bestätigen, dass die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 einen Einfluss auf die NCAM-vermittelte Signaltransduktion ausübt.

Die erhaltenen Ergebnisse konnten die Ergebnisse der zellbiologischen Experimente zum Teil bestätigen. Auf zellbiologischer Ebene konnte bei allen NCAM-transfizierten B35-Zelllinien ein verstärktes Neuritenwachstum nach Stimulation mit dem C3-Peptid beobachtet werden. In den durchgeführten Western Blot-Analysen ließ sich eine Expression von Phospho-CREB nach Stimulation mit dem C3-Peptid nur in den B35-NCAM140 (WT)-Zellen und in den B35-NCAM140-S774D-Zellen nachweisen und, wie auf zellbiologischer Ebene gezeigt, ließ sich das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum dadurch induzieren. Die B35-NCAM140-S774A-Zellen, in denen die Phosphorylierung an Serin 774 verhindert wurde, zeigten keine Expression an Phospho-CREB. Dagegen jedoch konnte ihr Neuritenwachstum auf zellbiologischer Ebene mittels C3-Peptid gesteigert werden. Wodurch lässt sich nun dieses Phänomen erklären? Es ist zu vermuten, dass die fehlende Phosphorylierung einen Einfluss auf die NCAM-vermittelten Signalwege ausübt, die darin involviert sind, den Transkriptionsfaktor CREB zu aktivieren. Somit könnte wieder bestätigt werden, dass die Phosphorylierung an Serin 774 im NCAM 140 einen entscheidenden Einfluss auf das Neuritenwachstum hat. Anhand der erhaltenen Ergebnisse mit dem RTCA Gerät wurde gezeigt, dass die B35-NCAM140-S774A-Zellen mit Stimulation des C3-Peptides annähernd ein gleich starkes Neuritenwachstums aufweisen wie die B35-NCAM140 (WT)-Zellen ohne Stimulation. Es ist somit denkbar, dass das C3-Peptid in den B35-NCAM140-S774A-Zellen nur die „normale“ angestrebte homophile NCAM-Bindung verstärkt bzw. imitiert. Wie in den Western Blot-Analysen gezeigt wurde, konnte in den B35-NCAM140 (WT)-Zellen ohne Stimulation durch das C3-Peptid ebenfalls keine Phosphorylierung und dadurch erfolgte Aktivierung von CREB beobachtet werden. Wenn sich die Zellen mit der Mutation von Serin zu Alanin in Anwesenheit des C3-Peptides genauso verhalten wie die B35-NCAM140 (WT)-Zellen, lässt sich das gezeigte Ergebnis eventuell dadurch erklären. Weiterhin ist auch zu vermuten, dass das mit Hilfe des C3-Peptides induzierte

Neuritenwachstum in den B35-NCAM140-S774A-Zellen durch Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren induziert wird und CREB dadurch nur eine untergeordnete Rolle in diesen Zellen einnimmt. Jessen et al. konnten in ihren Versuchen zeigen, dass neben CREB auch c-FOS für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum notwendig ist und dass weder CREB noch c-FOS die Inaktivierung des jeweils anderen Transkriptionsfaktors kompensieren können [86]. Weiterhin induziert das C3-Peptid durch die Imitierung der homophilen NCAM-NCAM-Bindung ebenso die Expression an c-Fos [27]. Ferner ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor NF κ B an der NCAM-stimulierten Signaltransduktion und dem daraus resultierenden Neuritenwachstum beteiligt ist [92] [134]. Der Einfluss auf diese Transkriptionsfaktoren könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.2.2 Untersuchungen zum ERK-Signalweg

Es ist bekannt, dass NCAM über die kleine GTPase Ras den MAPK-Signalweg aktiviert und es wird postuliert, dass dieser durch NCAM mittels FAK aktivierte Ras-MAPK-Signalweg für die maximal mögliche Stimulation des Neuritenwachstums durch NCAM notwendig ist [27]. Da ERK *downstream* von MAP gelegen ist, wurde diese Kinase zur Analyse der NCAM-induzierten Signalwege ausgewählt. Dass das Clustering von NCAM 140 auf der Oberfläche neuronaler Zellen die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 induziert, die im weiteren Verlauf zu einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB an Serin 133 führt, konnten Schmid et al. in ihren Experimenten zeigen [78]. Auch Niethammer et al. konnten eine Erhöhung der Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 nach Stimulation von Neuroblastomzellen mit polyklonalen NCAM Antikörpern beobachten [48].

Bei den Versuchen zur Untersuchung von ERK und Phospho-ERK wurden die Zellen zum einen nur mit dem C3-Peptid stimuliert und zum anderen vor Peptidzugabe mit dem FGFR1-Inhibitor SU5402 versetzt. Dadurch sollte es ermöglicht werden, einen Unterschied zwischen der Aktivierung von ERK über den FGF-Rezeptor-abhängigen und -unabhängigen Weg aufzuzeigen.

Die Western Blot-Analysen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Expression an ERK1 und ERK2 nach Stimulation mit dem C3-Peptid in den B35-NCAM140 (WT)-Zellen, B35-NCAM140-S774A-Zellen und NCAM140-S774D-Zellen (siehe Abb. 19). Dagegen jedoch kam es in Anwesenheit des FGFR1-Inhibitors zu einer verstärkten Expression von ERK1 und ERK2, die in allen NCAM-exprimierenden B35-Zelllinien gleich stark zu beobachten war. Bei der Analyse von Phospho-ERK konnte gezeigt werden, dass alle NCAM-transfizierten B35-Zellen in Abwesenheit des Inhibitors

Phospho-ERK gleich stark exprimieren (siehe Abb. 20). Es war kein Unterschied zwischen ihnen erkennbar. Unter Zugabe des Inhibitors war eine starke Abnahme der Phospho-ERK Expression zu beobachten und Phospho-ERK war kaum detektierbar. Es konnte jedoch erneut kein Unterschied zwischen den jeweiligen B35-Zelllinien erkannt werden. Die starke Abnahme der Phospho-ERK Expression in Anwesenheit des Inhibitors deutet darauf hin, dass die mittels C3-Petid induzierte NCAM-vermittelte Signaltransduktion, welche in der Aktivierung von ERK endet, über den FGF-Rezeptor-abhängigen Weg verläuft. Diese Beobachtung würde mit der von Ditlevsen et al. aufgestellten Vermutung übereinstimmen, dass das C3-Peptid die erhöhte Phosphorylierung von ERK durch eine Aktivierung des FGF-Rezeptors, der Src-Kinasen, MEK und G-Proteinen vermittelt [132]. Erstaunlicherweise war kein Unterschied zwischen den generierten NCAM-Mutanten nachweisbar. Obwohl bekannt ist, dass dieser FGF-Rezeptor-abhängige Weg eine Möglichkeit der Signalweiterleitung zum Transkriptionsfaktor CREB darstellt, scheint er jedoch für die zuvor beobachteten Unterschiede in den Versuchen zur Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors nicht verantwortlich zu sein. Die nicht nachweisbare Aktivierung von CREB in den B35-Zellen, bei denen die Phosphorylierung an Serin 774 verhindert wurde, korreliert dabei nicht mit den hier erhaltenen Resultaten bezüglich der Expression an Phospho-ERK. Aufgrund dieses Resultates kann somit gesagt werden, dass die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM keinen Einfluss bei der Signalweiterleitung über den FGR-Rezeptor-abhängigen Signalweg ausübt. Daher scheint es, resultierend aus den vorherigen gezeigten Ergebnissen, wahrscheinlich, dass es weitere Möglichkeiten gibt, die für die unterschiedliche Aktivierung von CREB und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Neuritenwachstum verantwortlich sind.

4.2.3 Untersuchung des Signalweges über die Fokale Adhäsionskinase

Um zu überprüfen, ob der FGF-Rezeptor-unabhängige Weg entscheidend für die in dieser Arbeit beobachtete unterschiedliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB ist, wurde der Einfluss der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) untersucht. Beggs et al. konnten in ihren Versuchen eine Interaktion von NCAM 140 mit der Fokalen Adhäsionskinase p125 ^{fak} nachweisen. Des Weiteren zeigten sie, dass die Behandlung von NCAM mit Antikörpern, die die homophile NCAM-Bindung imitieren, in einer Steigerung der Phosphorylierung von Tyrosin 925 der p125 ^{fak} resultiert [80]. Schlaepfer et al. konnten zeigen, dass mehrere Mechanismen durch FAK in Anspruch genommen werden können, um den MAPK-Signalweg zu stimulieren. Ein besagter ist, dass FAK an Tyrosin 925 phosphoryliert wird, es dadurch über die Ausbildung des Grb2/SOS

Komplexes zur Aktivierung der kleinen GTPase Ras kommt und dadurch der MAPK-Signalweg aktiviert wird [82]. Wie bereits erwähnt, ist dieser durch NCAM mittels FAK aktivierte Ras-MAPK-Signalweg für die maximal mögliche Stimulation des Neuritenwachstums durch NCAM notwendig [27].

Es wurde ein Fokale Adhäsionen Assay durchgeführt, bei dem untersucht werden sollte, ob die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 einen Einfluss auf die Paxillin-enthaltenen Fokalen Adhäsionen ausübt. Diese Fokalen Adhäsionen funktionieren wie Schlüsselsensoren, die extrazelluläre Signale integrieren, diese daraufhin mit dem Zytoskelett der Zelle verbinden und dadurch letztendlich eine komplexe Zellantwort vermitteln [135]. Dafür wurde ein Färben mit einem gegen Paxillin gerichteten Antikörper durchgeführt. Paxillin ist ein Adapterprotein der Fokalen Adhäsionen und wurde als Bindungspartner von FAK identifiziert. Weiterhin wird auch vermutet, dass es als Vermittler der FAK-Lokalisierung gilt [83]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl optisch in den mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie angefertigten Fotos als auch nach der Analyse und Quantifizierung mittels ImageJ Software ein deutlicher Unterschied in der Ausbildung an Paxillin-enthaltenen Fokalen Adhäsionen zwischen mit NCAM-transfizierten und untransfizierten B35-Zellen zu beobachten ist. Auf den Fotos ist zu erkennen, dass die untransfizierten B35-Zellen sehr wenige nahezu kaum sichtbare Fokale Adhäsionen ausbilden. Die B35-Zellen besitzen 0,76 Fokale Adhäsionen pro Zelle. Im Vergleich dazu weisen alle anderen mit NCAM-transfizierten B35-Zellen in den Fotos Paxillin-enthaltenen Fokale Adhäsionen auf (siehe Abb. 21). Auch dies fand mittels ImageJ Analyse Bestätigung. 13,32 Fokale Adhäsionen und damit die wenigsten besitzen die Zellen, die das NCAM 140 (WT) überexprimieren. Die Zellen mit der Mutation von Serin zu Alanin (S774A) bilden 15,81 Fokale Adhäsionen pro Zelle aus. Mit 17,59 Fokalen Adhäsionen pro Zelle bilden die Zellen mit der Mutation zu Asparaginsäure (S774D) am meisten Fokale Adhäsionen aus (siehe Tab. 12). Diese Aussage stimmt mit der Analyse der Fotos überein. Nach Signifikanzprüfung mittels t-Test musste jedoch festgestellt werden, dass der Unterschied zwischen der Ausbildung an Fokalen Adhäsionen innerhalb der NCAM-transfizierten Zellen nicht signifikant ist. Dagegen jedoch ist der gezeigte Unterschied zwischen transfizierten und untransfizierten B35-Zellen signifikant (siehe Abb. 22). Es wurde somit gezeigt, dass die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140 keinen Einfluss auf die Ausbildung an Fokalen Adhäsionen ausübt.

Weiterhin wurde mit Hilfe des Western Blots analysiert, ob es einen Unterschied in der Expression von FAK in den jeweiligen B35-Zelllinien gibt und ob die Phosphorylierungsstelle Serin 774 darauf einen Einfluss hat. Diese Versuche wurden zum einen in Anwesenheit des Peptides und zum anderen ohne erfolgte Stimulation durch das C3-

Peptid durchgeführt. Es wurde nachgewiesen, dass alle B35-Zellen, die stabil mit einem NCAM-Konstrukt transfiziert wurden, FAK exprimieren. Im unstimulierten Zustand war dabei zwischen den mit NCAM-transfizierten B35-Zellen kein Unterschied zu erkennen. Bei den untransfizierten B35-Zellen war sowohl mit als auch ohne Peptid keine Expression von FAK detektierbar. Dieses Ergebnis findet Übereinstimmung mit den erhaltenen Fotos und deren Quantifizierung, bei denen diese Zellen nur 0,76 Fokale Adhäsionen pro Zelle aufwiesen. Nach Zugabe von C3-Peptid war zwischen den jeweiligen NCAM-transfizierten Zellen ebenfalls kein Unterschied nachweisbar. Die Expression an FAK in Anwesenheit des Peptides ließ sich um das 1,2 bis 1,3-fache erhöhen. Es konnte sowohl in Anwesenheit des C3-Peptides als auch in Abwesenheit kein Unterschied in der Expression an FAK zwischen den B35-Zellen, die NCAM140 (WT) exprimieren, und den B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin oder von Serin zu Asparaginsäure aufweisen, festgestellt werden. Daher kann nach Analysierung des FAK-Signalweges gesagt werden, dass die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 ebenfalls keinen Einfluss auf den FGF-Rezeptor-unabhängigen Signalweg ausübt. Da nun der FGF-Rezeptor-abhängige und -unabhängige Weg für die nachgewiesene unterschiedliche Aktivierung von CREB in dieser Arbeit ausgeschlossen werden können, muss es einen hiervon unabhängigen Weg geben, der für die gezeigten Ergebnisse verantwortlich ist.

4.3 Untersuchungen zur Endozytose und zum Abbau von NCAM

Aufgrund der erhaltenen und zuvor diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit ließ sich die nicht vorhandene Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und das unterschiedliche Neuritenwachstum der B35-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen, nicht über die sonst üblichen NCAM-induzierten Signalwege, die in einer Aktivierung von CREB enden, nachweisen. Da neuere Erkenntnisse zur Signaltransduktion von NCAM zeigten, dass die Endozytose und Signaltransduktion korrelieren, wurden Untersuchungen zur Endozytose und zum Abbau von NCAM durchgeführt [104]. Dadurch sollte untersucht werden, ob Rückschlüsse auf die zuvor erhaltenen Ergebnisse zur Untersuchung der Signaltransduktion gezogen werden können. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden mit Hilfe einer nicht radioaktiven Methode, bei der Biotin als Marker verwendet wurde, die Halblebenszeiten der jeweiligen B35-Zelllinien bestimmt. Es konnte anhand der Western Blot-Analyse gezeigt werden, dass es in den jeweiligen B35-Zelllinien mit erfolgter Zeitzunahme zum erwarteten Abbau von NCAM kommt (siehe Abb. 24). Die am stärksten detektierbare Bande befindet sich bei allen NCAM-Konstrukten bei 0 Stunden. Nach Quantifizierung der NCAM-spezifischen Banden mit

der GelEval 1.22 Software wurden die Halblebenszeiten ($T_{1/2}$) der unterschiedlichen NCAM-Konstrukte errechnet (siehe Tab. 13). Es zeigt sich, dass die B35-Zellen, die stabil mit NCAM 140 (WT) transfiziert wurden, eine durchschnittliche Halblebenszeit von 29 +/- 5 h aufweisen. Die Mutation von Serin 774 zu Alanin (S774A) in den B35-NCAM140-S774A-Zellen führt zu einer Reduzierung der Halblebenszeit auf 19 +/- 5 h. In den B35-NCAM140-S774D-Zellen, die die Mutation von Serin zu Asparaginsäure (S774D) aufweisen, konnte kein Effekt im Vergleich zum NCAM140 (WT) gezeigt werden und ihre Halblebenszeit liegt bei 28 +/- 5 h. Es ist somit festzuhalten, dass die B35-NCAM140-S774A-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen, die geringste Halblebenszeit besitzen und die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 einen Einfluss auf die Endozytose der Zellen ausübt. Wie lässt sich nun der Einfluss der Phosphorylierungsstelle auf die geringere Halblebenszeit und dadurch beschleunigte Endozytose der B35-NCAM140-S774A-Zellen erklären? Es konnte bereits im NCAM-verwandten Molekül ApCAM in *Aplysia californica* gezeigt werden, dass die Phosphorylierung einer MAP-Kinase innerhalb der PEST Sequenz Voraussetzung für seine Endozytose ist [136]. Die PEST Sequenz HTEPNETTPLTEPE von NCAM 140 beinhaltet ebenfalls eine Sequenz, die der Konsensussequenz für MAP-Kinasen entspricht [137]. Das einzige bekannte destabilisierende Motiv in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM ist seine PEST Sequenz, die reich an Prolin, Glutaminsäure, Serin und Threonin ist [101]. Analog zum ApCAM-Molekül konnte in der Arbeitsgruppe um Diestel et al. gezeigt werden, dass es durch Austausch des MAP-Kinase Konsensussequenzmotives innerhalb der PEST Sequenz von NCAM 140 und NCAM 180 zu einer veränderten Endozytose kommt [101]. Da sich die Phosphorylierungsstelle Serin 774 in der Nähe der PEST Sequenz von NCAM 140 in der cytoplasmatischen Domäne befindet, ist es möglich, dass dadurch ebenso ein Einfluss auf das MAP-Kinase Konsensussequenzmotiv ausgeübt wird und die Endozytose deshalb in den Zellen, die die Mutation zu Serin aufweisen, erhöht ist. Welchen Einfluss die fehlende Phosphorylierungsstelle hier einnimmt, könnte Schwerpunkt zukünftiger Untersuchungen sein. Welche Rückschlüsse lassen sich nun auf die zuvor erhaltenen Ergebnisse zur Untersuchung der Signaltransduktion ziehen? Es könnte zum einen vermutet werden, dass der schnellere *turnover* von dem NCAM-S774A-Konstrukt die Proteinrekrutierung zu NCAM verhindert und dadurch das geringere Neuritenwachstum zu erklären ist. Zum anderen gibt es, wie bereits erwähnt, neue Erkenntnisse zur Signaltransduktion von NCAM und seiner Endozytose. Die Arbeitsgruppe um Kleene et al. konnte kürzlich in ihren Versuchen zeigen, dass die Stimulation von NCAM mit NCAM-Antikörpern in einer proteolytischen Prozessierung von NCAM und FAK resultiert. Dabei werden das C-terminale Fragment von NCAM, welches aus der intrazellulären Domäne, der

Transmembrandomäne und einem Teil der extrazellulären Domäne besteht, und das N-terminale Fragment von FAK in den Zellkern importiert. Der Weg, über den das transmembrane NCAM-Fragment den Zellkern in einer Calmodulin- und Ca^{2+} -abhängigen Weise erreicht, erfolgt durch endozytotischen Transport über das Endoplasmatische Retikulum und Zytoplasma. Darüber hinaus wird bereits diskutiert, dass dadurch verschiedene Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden können [104]. Es ist somit vorstellbar, dass durch die erhöhte Endozytose der B35-Zellen, die NCAM140-S774A überexprimieren, veranlasst wird, dass mehr transmembrane NCAM-Fragmente in den Zellkern transportiert werden als bei den B35-Zellen, die NCAM140 (WT) und NCAM140-S774D überexprimieren. Die daraufhin in den Zellkern gelangenden NCAM-Fragmente könnten aufgrund ihres verstärkten Imports zum einen die Assoziation mit anderen Kernproteinen behindern und zum anderen ein Blockieren der Transkription bewirken. Dadurch ist es möglich, dass durch den verstärkten Import von NCAM-Fragmenten in den Zellkern die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB blockiert ist. Somit wäre die nicht vorhandene Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB in den B35-NCAM140-S774A-Zellen zu erklären. Die B35-Zellen, die NCAM140 (WT) und NCAM140-S774D überexprimieren, würden aufgrund ihrer längeren Halblebenszeiten weniger NCAM-Fragmente in den Zellkern importieren und führen dadurch womöglich nicht zu einer kompletten Blockierung der Transkription, sondern ermöglichen noch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB.

Kleene et al. beschreiben weiterhin, dass dieses Modell der proteolytischen Prozessierung von NCAM und FAK Calmodulin-abhängig ist. Sie konnten zeigen, dass sowohl der Zellkerntransport als auch das erhöhte Neuritenwachstum abgeschafft werden, wenn es zu einer Veränderung des Calmodulin-Bindungs-Motives in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM durch Einfügen einer Mutation kommt [104]. Obwohl das erforderliche Calmodulin-Bindungs-Motiv nicht weit entfernt von unserer Phosphorylierungsstelle Serin 774 liegt, scheint diese, im Gegensatz zur PEST Sequenz, keinen Einfluss auf das Calmodulin-Bindungs-Motiv auszuüben.

4.4 Neues Modell der möglichen Signalweiterleitung zum Transkriptionsfaktor CREB

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die unterschiedliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB als auch das dadurch unterschiedlich resultierende Neuritenwachstum der jeweiligen NCAM-überexprimierenden B35-Zellen nicht über die zwei bekannten NCAM-induzierten Signalwege erfolgte. Aus diesem Grunde wurde ein

neues Modell der möglichen Signalweiterleitung aufgestellt, das in der folgenden Abb. 26 dargestellt wird.

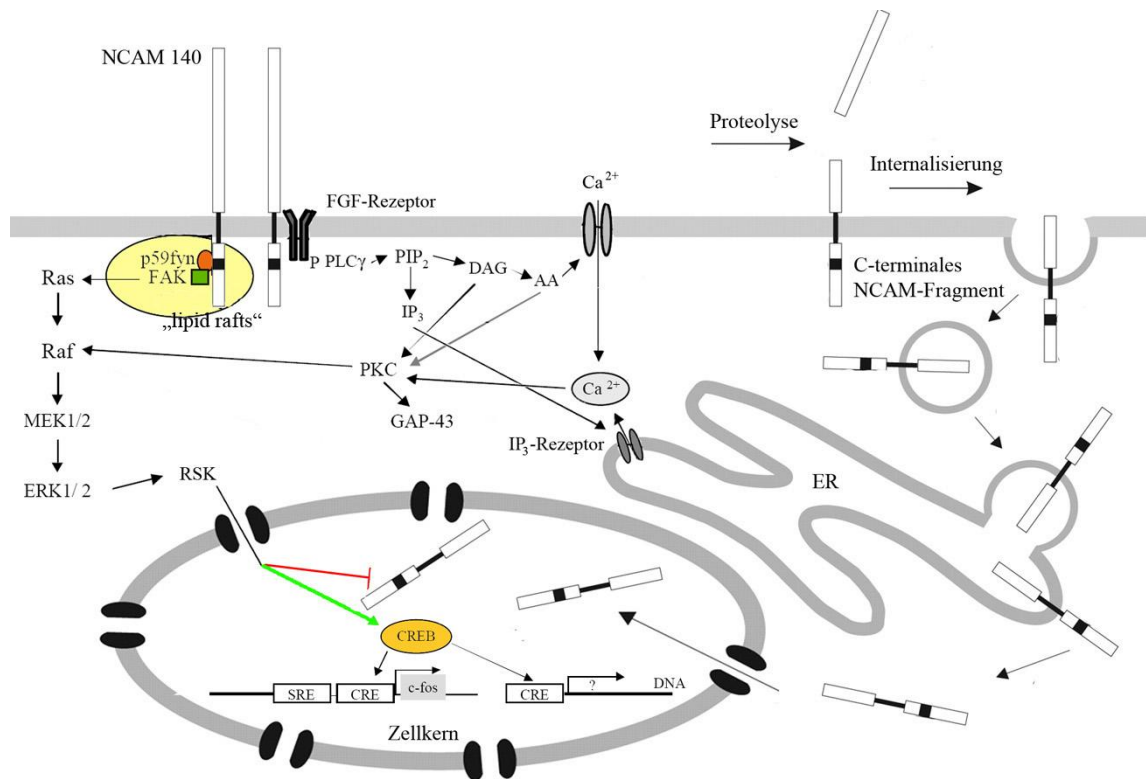


Abb. 26: Mögliches Modell der Signalweiterleitung zum Transkriptionsfaktor CREB

In dieser Abbildung wird die mögliche NCAM-induzierte Signalweiterleitung zum Transkriptionsfaktors CREB dargestellt. Dabei wird gezeigt, dass die mittels proteolytischer Prozessierung entstandenen C-terminalen NCAM-Fragmente durch endozytotischen Transport über das Endoplasmatische Retikulum und Zytoplasma in den Zellkern importiert werden. Dort können diese dann die Aktivierung vom Transkriptionsfaktor CREB blockieren (roter Strich). Weiterhin ist zu erkennen, dass sowohl der durch NCAM-induzierte FGF-Rezeptor-abhängige als auch -unabhängige Weg keinen Einfluss auf die Aktivierung von CREB zeigen (grüner Pfeil).

Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 keinen Einfluss auf den FGF-Rezeptor-abhängigen und -unabhängigen Weg ausübt, die in einer Aktivierung von CREB enden. Die unterschiedliche CREB-Aktivierung der in dieser Arbeit generierten NCAM-Konstrukte ist über ihre unterschiedlichen Halblebenszeiten zu erklären. Dazu wurde das von Kleene et al. aufgestellte Modell herangezogen. Wie in der Abb. 26 dargestellt, kommt es durch proteolytische Prozessierung von NCAM zur Entstehung eines löslichen NCAM-Fragmentes und zur Entstehung eines C-terminalen NCAM-Fragmentes. Dabei wird das C-terminale NCAM-Fragment, welches aus der intrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und einem Teil der extrazellulären Domäne besteht, in den Zellkern importiert. Der Weg, über den das C-terminale

NCAM-Fragment den Zellkern durch Kernporen in einer Calmodulin- und Ca^{2+} -abhängigen Weise erreicht, erfolgt durch endozytotischen Transport über das Endoplasmatische Retikulum und Zytoplasma [104]. Im Zellkern können diese NCAM-Fragmente dann zum einen die Assoziation mit anderen Kernproteinen behindern und zum anderen die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflussen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Endozytose der B35-Zellen, die das NCAM140-S774A überexprimieren, im Vergleich zu den NCAM140 (WT)- und NCAM140-S774D-überexprimierenden Zellen, erhöht ist. Diese erhöhte Endozytose könnte zu einem verstärkten Import von NCAM-Fragmenten in den Zellkern führen und dadurch dort die Aktivierung von CREB blockiert werden.

Für die Zukunft besteht die Möglichkeit, weitere Untersuchungen bezüglich der NCAM-induzierten Signalwege durchzuführen. Dabei könnte untersucht werden, inwieweit die Phosphorylierungsstelle einen Einfluss auf die anderen bekannten Transkriptionsfaktoren hat, von denen man weiß, dass auch sie im NCAM-induzierten Neuritenwachstum involviert sind. Dabei wären der Transkriptionsfaktor c-Fos und $\text{NF}\kappa\text{B}$ zu erwähnen. Des Weiteren könnten die begonnenen Untersuchungen zur Aktivierung des FGF-Rezeptors fortgeführt werden, um die hier aufgeführten Aussagen weiter zu bekräftigen. Es wäre sicherlich auch von Interesse, das neu aufgestellte Modell der Signalweiterleitung von NCAM zum Transkriptionsfaktor CREB genauer zu analysieren. Dabei könnte, wie es in den Versuchen von Kleene et al. gezeigt wurde, der Kerntransport nochmals genauer untersucht werden. Ferner könnte untersucht werden, welchen Einfluss die Phosphorylierung in den generierten NCAM180-Konstrukten hat und ob dort, wie in Versuchen anderer Arbeitsgruppen beobachtet wurde, ebenfalls ein ersichtlicher Einfluss zu erkennen ist.

5 Zusammenfassung

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist ein membrangebundenes Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches vor allem auf der Oberfläche von Nervenzellen exprimiert wird. NCAM spielt eine entscheidende Rolle während der Embryonalentwicklung und ist außerordentlich wichtig für die Formierung von Zellgruppen sowie bei Prozessen der neuronalen Entwicklung, wie z. B. der Migration von Neuroblasten und dem Auswachsen von Neuriten. Es trägt im späteren Verlauf auch zum Erhalt der synaptischen Plastizität und Regenerationsfähigkeit von Nervengewebe bei. Homophile NCAM Bindungen vermitteln Adhäsion zwischen Zellen und führen zu einer Aktivierung eines komplexen Netzes intrazellulärer Signalkaskaden. NCAM besitzt neben der extrazellulären Domäne, die aus fünf Ig-artigen Domänen und zwei membranahen Fibronectin-Typ-III-homologen Domänen besteht, auch eine große cytoplasmatische Domäne. Diese cytoplasmatische Domäne spielt eine entscheidende Rolle bei der Signalweiterleitung und beim NCAM-induzierten Neuritenwachstum. Sie besitzt, abhängig von der Isoform, bis zu 49 potentielle Phosphorylierungsstellen. Obwohl bekannt ist, dass es beim NCAM-induzierten Neuritenwachstum zu einer verstärkten Phosphorylierung der cytoplasmatischen Domäne von NCAM kommt, war bisher nicht bekannt, welche der Phosphorylierungsstellen daran beteiligt sind.

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Computerprogrammes NetPhos 2.0 die potentiellen Phosphorylierungs-Wahrscheinlichkeiten für die cytoplasmatische Domäne von NCAM (Maus) bestimmt. Die höchste Wahrscheinlichkeit für eine Phosphorylierung zeigte dabei Serin 774 mit einem Wert von 0,994. Die Phosphorylierung des Serin 774 wurde auch in mehreren Phospho-Proteomanalysen gefunden. Aus diesem Grund wurde diese potentielle Phosphorylierungsstelle an Serin 774 ausgewählt und ihre Bedeutung bei der Signaltransduktion des NCAM-Moleküles untersucht. Dafür wurden mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese Mutationen in die NCAM140-cDNA Konstrukte der Maus eingefügt. Die Aminosäure Serin 774 wurde zum einen gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Alanin (S774A) und zum anderen gegen die Aminosäure Asparaginsäure (S774D) ersetzt, womit eine negative Ladung an die potentielle Phosphorylierungsstelle addiert wurde und dadurch eine dauerhafte Phosphorylierung imitiert wurde. Anschließend wurden diese NCAM-Konstrukte in B35-Neuroblastomzellen exprimiert und der Einfluss dieser Mutationen auf die Signaltransduktion von NCAM untersucht. Dazu wurden die Zellen mit einem NCAM-analogen Peptid (C3-Peptid) stimuliert, um eine homophile NCAM-NCAM Interaktion zu imitieren und eine NCAM-vermittelte Signaltransduktion zu induzieren. Die Stimulation mit dem C3-Peptid führte in den NCAM140-S774A-transfizierten Zellen gegenüber den NCAM140 (WT)-

transfizierten und NCAM140-S774D-transfizierten Zellen zu einer deutlichen Reduktion des Neuritenwachstums. Auf molekularer Ebene zeigte sich eine verringerte Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB. CREB ist der zentrale Transkriptionsfaktor bei der Induzierung des Neuritenwachstums. Die NCAM-vermittelte CREB-Aktivierung ist über einen FGF-Rezeptor-abhängigen und -unabhängigen Weg möglich. Beiden Signalwegen gemeinsam ist die Aktivierung von ERK. Um die Aktivierung von ERK nach NCAM-Stimulation mit dem C3-Peptid in den jeweiligen NCAM-exprimierenden B35-Zellen zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von ERK in Gegenwart von einem FGFR1-Inhibitor analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Mutation von Serin zu Alanin (S774A) weder einen Einfluss auf den FGF-Rezeptor-abhängigen noch auf den -unabhängigen Weg ausübt. Eine weitere zentrale Rolle bei der NCAM-vermittelten Signaltransduktion spielt die Fokale Adhäsionskinase FAK. Interessanterweise zeigten alle NCAM-überexprimierenden Zellen eine verstärkte Ausbildung von Fokalen Adhäsionen. Jedoch weder in der Ausbildung an Fokalen Adhäsionen noch in der FAK-Expression zeigten die NCAM-Mutanten einen Unterschied im Vergleich zum NCAM140 (WT).

Endozytiertes NCAM kann gespalten und diese NCAM-Fragmente können in den Zellkern importiert werden. Aus diesem Grund wurde über Bestimmung der Halblebenszeiten der jeweiligen NCAM-Mutanten der Einfluss der Mutationen auf die Endozytose von NCAM untersucht. In den B35-NCAM140-S774A-Zellen, die die Mutation von Serin zu Alanin aufweisen, kam es zu einer Reduzierung der Halblebenszeit ($T_{1/2}$) auf 19 ± 5 h im Vergleich zu den B35-NCAM140-S774D-Zellen mit $T_{1/2}$ von 28 ± 5 h und den B25-NCAM140 (WT)-Zellen mit $T_{1/2}$ von 29 ± 5 h. Somit konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungsstelle an Serin 774 einen Einfluss auf die Endozytose ausübt. Eine solche erhöhte Endozytose von NCAM könnte zu einem verstärkten Import von NCAM-Fragmenten in den Zellkern führen und dort die Aktivierung von CREB blockieren. Dies würde das verringerte Neuritenwachstum in den B35-NCAM140-S774A-Zellen erklären.

6 Summary

The neural cell adhesion molecule NCAM is a membrane-associated glycoprotein of the immunoglobulin-super family, which is highly expressed on the cell surface of neuronal cells. NCAM plays an important role during the embryonic development and is very important in formation of cell groups as well as during processes of the neuronal development, such as migration of neuroblasts and regulated outgrowth of neurites. It is not only crucial during the development of the nervous system but it is also very important for synaptic plasticity and the ability of regeneration of nerve tissue. Homophilic NCAM binding mediates cell adhesion and leads to the activation of a complex network of intracellular signaling cascades. NCAM possesses an extracellular domain, which consists of five immunoglobulin-like domains and two fibronectin-type-III-domains. Apart from that NCAM also has a large intracellular domain, which plays an important role in signal transduction and during NCAM-induced neurite outgrowth. This cytoplasmic domain of NCAM contains, depending on the isoform, up to 49 potential phosphorylation sites. Although it is known that during the NCAM-induced neurite outgrowth the phosphorylation of the intracellular domain increases, it is not yet known which phosphorylation sites are involved.

We have indentified serine 774 as the major potential phosphorylation site of the cytoplasmic domain of NCAM (mouse) with a value of 0,994 using the NetPhos 2.0 tool. Phosphorylated serine 774 has also been found in several phosphoproteomic analyses. Therefore we further analyzed whether phosphorylation of serine 774 is involved in NCAM-mediated signal transduction. By PCR-based site-directed mutagenesis, we mutated serine 774 of NCAM 140 to alanine (S774A), which can not be phosphorylated and to aspartic acid (S774D), which adds a negative charge at the potential phosphorylation site. B35 neuroblastoma cells, which express very low levels of endogenous NCAM, were stably transfected with NCAM140, NCAM140-S774A and NCAM140-S774D, respectively and effects on NCAM-mediated signal transduction were investigated. Cells were stimulated by the NCAM-mimetic C3 peptide that binds to NCAM, mimics the homophilic NCAM-NCAM interaction and stimulates the NCAM-mediated signal transduction. In the presence of the C3 peptide, B35 cells expressing NCAM140-S774A were less potent to extend neurites compared to cells expressing NCAM140-S774D vs. wild-type NCAM140. On molecular level we found significant phosphorylation of CREB only in NCAM140 or NCAM140-S774D-transfected B35 cells. Phosphorylation of CREB was not observed in B35 cells transfected with NCAM140-S774A. Two principal pathways describe how the neurite outgrowth-promoting signal is transduced by NCAM 140, first an FGF receptor dependent path-

way and second an FGF receptor independent pathway. Both are known to activate ERK. Therefore we analyzed the activation of ERK in the different NCAM-expressing B35 cells after stimulating with the C3 peptide in absence and presence of the FGFR1-inhibitor. Interestingly we could neither observe an influence of our mutation from serine to alanine (S774A) on the FGF-receptor dependent nor on the FGF-receptor independent way. Another central role during NCAM-mediated signal transduction plays the focal adhesion kinase FAK. NCAM overexpression resulted in increased focal adhesions. However, neither the expression of focal adhesions nor the expression of FAK was different among our NCAM-mutants.

Recently it has been shown, that fragments of NCAM could be imported into the nucleus by endocytotic transport. Therefore we wanted to know, whether serine 774 is involved in the regulation of endocytosis. Therefore degradation time of NCAM140, NCAM140-S774A and NCAM140-S774D was determined. In B35 cells, NCAM140 had an average half-life of degradation of 29 +/- 5 hours. Mutation of serine to 774 to alanine led to a reduction of half-life to 19 +/- 5 hours, whereas mutation to aspartic acid had no effect with 28 +/-5 hours. Consequently we could show that the phosphorylation site serine 774 influences the endocytosis of the NCAM molecule. Such an increased endocytosis of NCAM could lead to an increased import of NCAM fragments into the nucleus and finally blocks the activation of CREB. That could be an explanation for the decreased neurite outgrowth of the B35 cells expressing NCAM-S774A.

7 Literaturverzeichnis

- [1] D. Schubert, „**The possible role of adhesion in synaptic modification**“, *Trends Neurosci.*, Bd. 14, Nr. 4, S. 127–130, Apr. 1991.
- [2] R. O. Hynes und A. D. Lander, „**Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons**“, *Cell*, Bd. 68, Nr. 2, S. 303–322, Jan. 1992.
- [3] A. E. Aplin, A. Howe, S. K. Alahari, und R. L. Juliano, „**Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins**“, *Pharmacol. Rev.*, Bd. 50, Nr. 2, S. 197–263, Juni 1998.
- [4] M. Takeichi, „**Morphogenetic roles of classic cadherins**“, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Bd. 7, Nr. 5, S. 619–627, Okt. 1995.
- [5] L. A. Lasky, „**Selectin-Carbohydrate Interactions and the Initiation of the Inflammatory Response**“, *Annual Review of Biochemistry*, Bd. 64, Nr. 1, S. 113–140, 1995.
- [6] L. F. Reichardt und K. J. Tomaselli, „**Extracellular Matrix Molecules and their Receptors: Functions in Neural Development**“, *Annual Review of Neuroscience*, Bd. 14, Nr. 1, S. 531–570, 1991.
- [7] T. Brümmendorf und F. G. Rathjen, „**Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily**“, *Protein Profile*, Bd. 2, Nr. 9, S. 963–1108, 1995.
- [8] D. E. Vaughn und P. J. Bjorkman, „**The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules**“, *Neuron*, Bd. 16, Nr. 2, S. 261–273, Feb. 1996.
- [9] A. F. Williams und A. N. Barclay, „**The Immunoglobulin Superfamily—Domains for Cell Surface Recognition**“, *Annual Review of Immunology*, Bd. 6, Nr. 1, S. 381–405, 1988.
- [10] T. J. Baldwin, M. S. Fazeli, P. Doherty, und F. S. Walsh, „**Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules**“, *J. Cell. Biochem.*, Bd. 61, Nr. 4, S. 502–513, Juni 1996.
- [11] A. L. Main, T. S. Harvey, M. Baron, J. Boyd, und I. D. Campbell, „**The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions**“, *Cell*, Bd. 71, Nr. 4, S. 671–678, Nov. 1992.
- [12] R. Brackenbury, J. P. Thiery, U. Rutishauser, und G. M. Edelman, „**Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding.**“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 252, Nr. 19, S. 6835–6840, Okt. 1977.
- [13] J. P. Thiery, R. Brackenbury, U. Rutishauser, und G. M. Edelman, „**Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina.**“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 252, Nr. 19, S. 6841–6845, Okt. 1977.

-
- [14] O. S. Jørgensen, A. Delouvé, J.-P. Thiery, und G. M. Edelman, „**The nervous system specific protein D2 is involved in adhesion among neurites from cultured rat ganglia**“, *FEBS Letters*, Bd. 111, Nr. 1, S. 39–42, Feb. 1980.
- [15] M. Hirn, M. Pierres, H. Deagostini-Bazin, M. R. Hirsch, C. Goridis, M. S. Ghandour, O. K. Langley, und G. Gombos, „**A new brain cell surface glycoprotein identified by monoclonal antibody**“, *Neuroscience*, Bd. 7, Nr. 1, S. 239–250, Jan. 1982.
- [16] P. Richard T., „**A bovine brain cDNA purported to encode calmodulin-insensitive adenylyl cyclase has extensive identity with neural cell adhesion molecules (N-CAMs)**“, *FEBS Letters*, Bd. 295, Nr. 1–3, S. 230–231, Dez. 1991.
- [17] J. Thompson, G. Dickson, S. E. Moore, H. J. Gower, W. Putt, J. G. Kenimer, C. H. Barton, und F. S. Walsh, „**Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain.**“, *Genes Dev.*, Bd. 3, Nr. 3, S. 348–357, März 1989.
- [18] J. J. Hemperly, G. M. Edelman, und B. A. Cunningham, „**cDNA clones of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate**“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 83, Nr. 24, S. 9822–9826, Dez. 1986.
- [19] K. Balak, M. Jacobson, J. Sunshine, und U. Rutishauser, „**Neural cell adhesion molecule expression in *Xenopus* embryos**“, *Developmental Biology*, Bd. 119, Nr. 2, S. 540–550, Feb. 1987.
- [20] M. Mayford, A. Barzilai, F. Keller, S. Schacher, und E. R. Kandel, „**Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia***“, *Science*, Bd. 256, Nr. 5057, S. 638–644, Mai 1992.
- [21] G. Grenningloh und C. S. Goodman, „**Pathway recognition by neuronal growth cones: genetic analysis of neural cell adhesion molecules in *Drosophila***“, *Curr. Opin. Neurobiol.*, Bd. 2, Nr. 1, S. 42–47, Feb. 1992.
- [22] Y. Huang, J. Jellies, K. M. Johansen, und J. Johansen, „**Differential glycosylation of tractin and LeechCAM, two novel Ig superfamily members, regulates neurite extension and fascicle formation**“, *J. Cell Biol.*, Bd. 138, Nr. 1, S. 143–157, Juli 1997.
- [23] G. M. Edelman, „**Cell Adhesion and the Molecular Processes of Morphogenesis**“, *Annual Review of Biochemistry*, Bd. 54, Nr. 1, S. 135–169, 1985.
- [24] G. M. Edelman und K. L. Crossin, „**Cell Adhesion Molecules: Implications for a Molecular Histology**“, *Annual Review of Biochemistry*, Bd. 60, Nr. 1, S. 155–190, 1991.
- [25] A. M. Hinsby, V. Berezin, und E. Bock, „**Molecular mechanisms of NCAM function**“, *Front. Biosci.*, Bd. 9, S. 2227–2244, Sep. 2004.
- [26] G. Keilhauer, A. Faissner, und M. Schachner, „**Differential inhibition of neu-**

- rone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies“**, *Nature*, Bd. 316, Nr. 6030, S. 728–730, Aug. 1985.
- [27] P. S. Walmod, K. Kolkova, V. Berezin, und E. Bock, „**Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction“**, *Neurochem. Res.*, Bd. 29, Nr. 11, S. 2015–2035, Nov. 2004.
- [28] P. D'Eustachio, G. C. Owens, G. M. Edelman, und B. A. Cunningham, „**Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse“**, *PNAS*, Bd. 82, Nr. 22, S. 7631–7635, Nov. 1985.
- [29] C. Nguyen, M. G. Mattei, J. F. Mattei, M. J. Santoni, C. Goriadis, und B. R. Jordan, „**Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11“**, *J. Cell Biol.*, Bd. 102, Nr. 3, S. 711–715, März 1986.
- [30] F. S. Walsh, W. Putt, J. G. Dickson, C. A. Quinn, R. D. Cox, M. Webb, N. Spurr, und P. N. Goodfellow, „**Human N-CAM gene: mapping to chromosome 11 by analysis of somatic cell hybrids with mouse and human cDNA probes“**, *Brain Res.*, Bd. 387, Nr. 2, S. 197–200, Nov. 1986.
- [31] B. A. Cunningham, J. J. Hemperly, B. A. Murray, E. A. Prediger, R. Brackenbury, und G. M. Edelman, „**Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing“**, *Science*, Bd. 236, Nr. 4803, S. 799–806, Mai 1987.
- [32] G. C. Owens, G. M. Edelman, und B. A. Cunningham, „**Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains“**, *PNAS*, Bd. 84, Nr. 1, S. 294–298, Jan. 1987.
- [33] J. A. Barbas, J. C. Chaix, M. Steinmetz, und C. Goriadis, „**Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse.**“, *EMBO J*, Bd. 7, Nr. 3, S. 625–632, März 1988.
- [34] S. Olive, C. Dubois, M. Schachner, und G. Rougon, „**The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized to glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum“**, *J. Neurochem.*, Bd. 65, Nr. 5, S. 2307–2317, Nov. 1995.
- [35] C. Chothia und E. Y. Jones, „**THE MOLECULAR STRUCTURE OF CELL ADHESION MOLECULES“**, *Annual Review of Biochemistry*, Bd. 66, Nr. 1, S. 823–862, 1997.
- [36] R. W. Nelson, P. A. Bates, und U. Rutishauser, „**Protein Determinants for Specific Polysialylation of the Neural Cell Adhesion Molecule“**, *J. Biol. Chem.*, Bd. 270, Nr. 29, S. 17171–17179, Juli 1995.
- [37] R. Kleene und M. Schachner, „**Glycans and neural cell interactions“**, *Nat. Rev. Neurosci.*, Bd. 5, Nr. 3, S. 195–208, März 2004.
- [38] C. Goriadis und J. F. Brunet, „**NCAM: structural diversity, function and**

- regulation of expression“, *Semin. Cell Biol.*, Bd. 3, Nr. 3, S. 189–197, Juni 1992.
- [39] M.-J. Santoni, D. Barthels, J. A. Barbas, M.-R. Hirsch, M. Steinmetz, C. Goridis, und W. Wille, „**Analysis of cDNA clones that code for the transmembrane forms of the mouse neural cell adhesion molecule (NCAM) and are generated by alternative RNA splicing**“, *Nucl. Acids Res.*, Bd. 15, Nr. 21, S. 8621–8641, Nov. 1987.
- [40] J. L. Saffell, F. S. Walsh, und P. Doherty, „**Expression of NCAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to NCAM in a cellular substratum.**“, *J Cell Biol*, Bd. 125, Nr. 2, S. 427–436, Apr. 1994.
- [41] D. Barthels, G. Vopper, A. Boned, H. Cremer, und W. Wille, „**High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle**“, *Eur. J. Neurosci.*, Bd. 4, Nr. 4, S. 327–337, 1992.
- [42] L. Krog, M. Olsen, A. M. Dalseg, J. Roth, und E. Bock, „**Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma**“, *J. Neurochem.*, Bd. 59, Nr. 3, S. 838–847, Sep. 1992.
- [43] M. Olsen, L. Krog, K. Edvardsen, L. T. Skovgaard, und E. Bock, „**Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane.**“, *Biochem J*, Bd. 295, Nr. Pt 3, S. 833–840, Nov. 1993.
- [44] L. A. Krushel, M. H. Tai, B. A. Cunningham, G. M. Edelman, und K. L. Crossin, „**Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation**“, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Bd. 95, Nr. 5, S. 2592–2596, März 1998.
- [45] E. G. Pollerberg, R. Sadoul, C. Goridis, und M. Schachner, „**Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development.**“, *J Cell Biol*, Bd. 101, Nr. 5, S. 1921–1929, Nov. 1985.
- [46] G. E. Pollerberg, C. Nolte, und M. Schachner, „**Accumulation of N-CAM 180 at Contact Sites Between Neuroblastoma Cells and Latex Beads Coated with Extracellular Matrix Molecules**“, *Eur. J. Neurosci.*, Bd. 2, Nr. 10, S. 879–887, 1990.
- [47] E. Persohn, G. E. Pollerberg, und M. Schachner, „**Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes**“, *J. Comp. Neurol.*, Bd. 288, Nr. 1, S. 92–100, Okt. 1989.
- [48] P. Niethammer, M. Delling, V. Sytnyk, A. Dityatev, K. Fukami, und M. Schachner, „**Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis**“, *J Cell Biol*, Bd. 157, Nr. 3, S. 521–532, Apr. 2002.
- [49] B. C. Sorkin, S. Hoffman, G. M. Edelman, und B. A. Cunningham, „**Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM**“, *Science*, Bd. 225, Nr. 4669, S. 1476–1478, Sep. 1984.

-
- [50] F. S. Walsh, R. B. Parekh, S. E. Moore, G. Dickson, C. H. Barton, H. J. Gower, R. A. Dwek, und T. W. Rademacher, „**Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM)**“, *Development*, Bd. 105, Nr. 4, S. 803–811, Apr. 1989.
- [51] E. B. Little, G. M. Edelman, und B. A. Cunningham, „**Palmitoylation of the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM serves as an anchor to cellular membranes**“, *Cell Adhes. Commun.*, Bd. 6, Nr. 5, S. 415–430, 1998.
- [52] K. Mackie, B. C. Sorkin, A. C. Nairn, P. Greengard, G. M. Edelman, und B. A. Cunningham, „**Identification of two protein kinases that phosphorylate the neural cell-adhesion molecule, N-CAM**“, *J. Neurosci.*, Bd. 9, Nr. 6, S. 1883–1896, Juni 1989.
- [53] S. Matthias und R. Horstkorte, „**Phosphorylation of the neural cell adhesion molecule on serine or threonine residues is induced by adhesion or nerve growth factor**“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 84, Nr. 1, S. 142–150, Juli 2006.
- [54] L. Christer, „**Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton**“, *Cellular Signalling*, Bd. 18, Nr. 3, S. 276–284, März 2006.
- [55] B. Büttner, C. Kannicht, W. Reutter, und R. Horstkorte, „**The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton**“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 310, Nr. 3, S. 967–971, Okt. 2003.
- [56] S. Diestel, C. Laurini, O. Traub, und B. Schmitz, „**Tyrosine 734 of NCAM180 interferes with FGF receptor-dependent signaling implicated in neurite growth**“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 322, Nr. 1, S. 186–196, Sep. 2004.
- [57] B. Büttner, C. Kannicht, W. Reutter, und R. Horstkorte, „**Novel Cytosolic Binding Partners of the Neural Cell Adhesion Molecule: Mapping the Binding Domains of PLC γ , LANP, TOAD-64, Syndapin, PP1, and PP2A $^{+}$** “, *Biochemistry*, Bd. 44, Nr. 18, S. 6938–6947, 2005.
- [58] M. O. Collins, L. Yu, M. P. Coba, H. Husi, I. Campuzano, W. P. Blackstock, J. S. Choudhary, und S. G. N. Grant, „**Proteomic analysis of in vivo phosphorylated synaptic proteins**“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 280, Nr. 7, S. 5972–5982, Feb. 2005.
- [59] J. A. DeGiorgis, H. Jaffe, J. E. Moreira, C. G. Carlotti Jr, J. P. Leite, H. C. Pant, und A. Dosemeci, „**Phosphoproteomic analysis of synaptosomes from human cerebral cortex**“, *J. Proteome Res.*, Bd. 4, Nr. 2, S. 306–315, Apr. 2005.
- [60] J. Pollscheit, N. Glaubitz, H. Haller, R. Horstkorte, und K. Bork, „**Phosphorylation of serine 774 of the neural cell adhesion molecule is necessary for cyclic adenosine monophosphate response element binding protein activation and neurite outgrowth**“, *Journal of Neuroscience Research*, März 2012.
- [61] U. Schuch, M. J. Lohse, und M. Schachner, „**Neural cell adhesion mole-**

- cules influence second messenger systems“**, *Neuron*, Bd. 3, Nr. 1, S. 13–20, Juli 1989.
- [62] P. Doherty, C. H. Barton, G. Dickson, P. Seaton, L. H. Rowett, S. E. Moore, H. J. Gower, und F. S. Walsh, „**Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms.**“, *J Cell Biol*, Bd. 109, Nr. 2, S. 789–798, Aug. 1989.
- [63] P. Doherty, J. Cohen, und F. S. Walsh, „**Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid**“, *Neuron*, Bd. 5, Nr. 2, S. 209–219, Aug. 1990.
- [64] P. Doherty, G. Rimon, D. A. Mann, und F. S. Walsh, „**Alternative splicing of the cytoplasmic domain of neural cell adhesion molecule alters its ability to act as a substrate for neurite outgrowth**“, *J. Neurochem.*, Bd. 58, Nr. 6, S. 2338–2341, Juni 1992.
- [65] L. Liu, S. Haines, R. Shew, und R. A. Akeson, „**Axon growth is enhanced by NCAM lacking the VASE exon when expressed in either the growth substrate or the growing axon**“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 35, Nr. 3, S. 327–345, Juni 1993.
- [66] S. J. Small und R. Akeson, „**Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development**“, *J. Cell Biol.*, Bd. 111, Nr. 5 Pt 1, S. 2089–2096, Nov. 1990.
- [67] J. L. Saffell, P. Doherty, M.-C. Tiveron, R. J. Morris, und F. S. Walsh, „**NCAM Requires a Cytoplasmic Domain to Function as a Neurite Outgrowth-Promoting Neuronal Receptor**“, *Molecular and Cellular Neuroscience*, Bd. 6, Nr. 6, S. 521–531, Dez. 1995.
- [68] P. Doherty, S. V. Ashton, S. E. Moore, und F. S. Walsh, „**Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels**“, *Cell*, Bd. 67, Nr. 1, S. 21–33, Okt. 1991.
- [69] E. J. Williams, J. Furness, F. S. Walsh, und P. Doherty, „**Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin**“, *Neuron*, Bd. 13, Nr. 3, S. 583–594, Sep. 1994.
- [70] V. V. Kiselyov, G. Skladchikova, A. M. Hinsby, P. H. Jensen, N. Kulahin, V. Soroka, N. Pedersen, V. Tsetlin, F. M. Poulsen, V. Berezin, und E. Bock, „**Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP**“, *Structure*, Bd. 11, Nr. 6, S. 691–701, Juni 2003.
- [71] V. V. Kiselyov, V. Soroka, V. Berezin, und E. Bock, „**Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR**“, *J. Neurochem.*, Bd. 94, Nr. 5, S. 1169–1179, Sep. 2005.
- [72] E. J. Williams, B. Mittal, F. S. Walsh, und P. Doherty, „**FGF inhibits neurite outgrowth over monolayers of astrocytes and fibroblasts expressing transfected cell adhesion molecules**“, *J. Cell. Sci.*, Bd. 108 (Pt 11), S. 3523–3530, Nov. 1995.

-
- [73] E. J. Williams, J. Furness, F. S. Walsh, und P. Doherty, „**Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF**“, *Development*, Bd. 120, Nr. 6, S. 1685–1693, Juni 1994.
- [74] E. Sanchez-Heras, F. V. Howell, G. Williams, und P. Doherty, „**The fibroblast growth factor receptor acid box is essential for interactions with N-cadherin and all of the major isoforms of neural cell adhesion molecule**“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 281, Nr. 46, S. 35208–35216, Nov. 2006.
- [75] E. J. Williams, F. S. Walsh, und P. Doherty, „**The production of arachidonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by NCAM, N-cadherin, and L1**“, *J. Neurochem.*, Bd. 62, Nr. 3, S. 1231–1234, März 1994.
- [76] K. F. Meiri, J. L. Saffell, F. S. Walsh, und P. Doherty, „**Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones**“, *J. Neurosci.*, Bd. 18, Nr. 24, S. 10429–10437, Dez. 1998.
- [77] I. Leshchyns'ka, V. Sytnyk, J. S. Morrow, und M. Schachner, „**Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via betal spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth**“, *J. Cell Biol.*, Bd. 161, Nr. 3, S. 625–639, Mai 2003.
- [78] R. S. Schmid, R. D. Graff, M. D. Schaller, S. Chen, M. Schachner, J. J. Hemperly, und P. F. Maness, „**NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells**“, *J. Neurobiol.*, Bd. 38, Nr. 4, S. 542–558, März 1999.
- [79] H. E. Beggs, P. Soriano, und P. F. Maness, „**NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice**“, *J. Cell Biol.*, Bd. 127, Nr. 3, S. 825–833, Nov. 1994.
- [80] H. E. Beggs, S. C. Baragona, J. J. Hemperly, und P. F. Maness, „**NCAM140 Interacts with the Focal Adhesion Kinase p125fak and the SRC-related Tyrosine Kinase p59fyn**“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 272, Nr. 13, S. 8310–8319, März 1997.
- [81] R. Roskoski Jr, „**Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation**“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 331, Nr. 1, S. 1–14, Mai 2005.
- [82] D. D. Schlaepfer, S. K. Hanks, T. Hunter, und P. van der Geer, „**Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase**“, *Nature*, Bd. 372, Nr. 6508, S. 786–791, Dez. 1994.
- [83] M. D. Schaller, „**Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase**“, *Biochim. Biophys. Acta*, Bd. 1540, Nr. 1, S. 1–21, Juli 2001.
- [84] H. C. Chen, P. C. Chan, M. J. Tang, C. H. Cheng, und T. J. Chang, „**Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to mitogen-activated protein kinase activation**“, *J.*

- Biol. Chem.*, Bd. 273, Nr. 40, S. 25777–25782, Okt. 1998.
- [85] K. Kolkova, V. Novitskaya, N. Pedersen, V. Berezin, und E. Bock, „**Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway**“, *J. Neurosci.*, Bd. 20, Nr. 6, S. 2238–2246, März 2000.
- [86] U. Jessen, V. Novitskaya, N. Pedersen, P. Serup, V. Berezin, und E. Bock, „**The transcription factors CREB and c-Fos play key roles in NCAM-mediated neuritogenesis in PC12-E2 cells**“, *J. Neurochem.*, Bd. 79, Nr. 6, S. 1149–1160, Dez. 2001.
- [87] A. Davy, C. Feuerstein, und S. M. Robbins, „**Signaling within a caveolae-like membrane microdomain in human neuroblastoma cells in response to fibroblast growth factor**“, *J. Neurochem.*, Bd. 74, Nr. 2, S. 676–683, Feb. 2000.
- [88] K. Simons und D. Toomre, „**Lipid rafts and signal transduction**“, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Bd. 1, Nr. 1, S. 31–39, Okt. 2000.
- [89] M. Deak, A. D. Clifton, L. M. Lucocq, und D. R. Alessi, „**Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB**“, *EMBO J.*, Bd. 17, Nr. 15, S. 4426–4441, Aug. 1998.
- [90] R. Bourtchuladze, B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, und A. J. Silva, „**Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein**“, *Cell*, Bd. 79, Nr. 1, S. 59–68, Okt. 1994.
- [91] A. J. Whitmarsh, P. Shore, A. D. Sharrocks, und R. J. Davis, „**Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element**“, *Science*, Bd. 269, Nr. 5222, S. 403–407, Juli 1995.
- [92] L. A. Krushel, B. A. Cunningham, G. M. Edelman, und K. L. Crossin, „**NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes**“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 274, Nr. 4, S. 2432–2439, Jan. 1999.
- [93] L. C. Rønn, P. Doherty, A. Holm, V. Berezin, und E. Bock, „**Neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule requires fibroblast growth factor receptor activation**“, *J. Neurochem.*, Bd. 75, Nr. 2, S. 665–671, Aug. 2000.
- [94] L. C. Rønn, M. Olsen, S. Ostergaard, V. Kiselyov, V. Berezin, M. T. Mortensen, M. H. Lerche, P. H. Jensen, V. Soroka, J. L. Saffell, P. Doherty, F. M. Poulsen, E. Bock, A. Holm, und J. L. Saffells, „**Identification of a neuritogenic ligand of the neural cell adhesion molecule using a combinatorial library of synthetic peptides**“, *Nat. Biotechnol.*, Bd. 17, Nr. 10, S. 1000–1005, Okt. 1999.
- [95] D. K. Ditlevsen, L. B. Køhler, M. V. Pedersen, M. Risell, K. Kolkova, M. Meyer, V. Berezin, und E. Bock, „**The role of phosphatidylinositol 3-kinase in neural cell adhesion molecule-mediated neuronal differentiation and survival**“, *J. Neurochem.*, Bd. 84, Nr. 3, S. 546–556, Feb. 2003.

-
- [96] D. K. Ditlevsen, L. B. Køhler, V. Berezin, und E. Bock, „**Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway plays a role in neural cell adhesion molecule-mediated neurite outgrowth and survival**“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 85, Nr. 4, S. 703–711, März 2007.
- [97] L. Johannes und C. Lamaze, „**Clathrin-dependent or not: is it still the question?**“, *Traffic*, Bd. 3, Nr. 7, S. 443–451, Juli 2002.
- [98] R. Miñana, J. M. Duran, M. Tomas, J. Renau-Piqueras, und C. Guerri, „**Neural cell adhesion molecule is Endozytosed via a clathrin-dependent pathway**“, *Eur. J. Neurosci.*, Bd. 13, Nr. 4, S. 749–756, Feb. 2001.
- [99] H. Kamiguchi, K. E. Long, M. Pendergast, A. W. Schaefer, I. Rapoport, T. Kirchhausen, und V. Lemmon, „**The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is Endozytosed via the clathrin-mediated pathway**“, *J. Neurosci.*, Bd. 18, Nr. 14, S. 5311–5321, Juli 1998.
- [100] C. H. Bailey, M. Chen, F. Keller, und E. R. Kandel, „**Serotonin-mediated endocytosis of apCAM: an early step of learning-related synaptic growth in Aplysia**“, *Science*, Bd. 256, Nr. 5057, S. 645–649, Mai 1992.
- [101] S. Diestel, D. Schaefer, H. Cremer, und B. Schmitz, „**NCAM is ubiquitylated, Endozytosed and recycled in neurons**“, *J. Cell. Sci.*, Bd. 120, Nr. Pt 22, S. 4035–4049, Nov. 2007.
- [102] M. Rechsteiner und S. W. Rogers, „**PEST sequences and regulation by proteolysis**“, *Trends Biochem. Sci.*, Bd. 21, Nr. 7, S. 267–271, Juli 1996.
- [103] T. Itoh und T. Takenawa, „**Regulation of endocytosis by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and ENTH proteins**“, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Bd. 282, S. 31–47, 2004.
- [104] R. Kleene, M. Mzoughi, G. Joshi, I. Kalus, U. Bormann, C. Schulze, M.-F. Xiao, A. Dityatev, und M. Schachner, „**NCAM-induced neurite outgrowth depends on binding of calmodulin to NCAM and on nuclear import of NCAM and fak fragments**“, *J. Neurosci.*, Bd. 30, Nr. 32, S. 10784–10798, Aug. 2010.
- [105] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, und N. Arnheim, „**Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia**“, *Science*, Bd. 230, Nr. 4732, S. 1350–1354, Dez. 1985.
- [106] K. B. Mullis und F. A. Faloona, „**Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction**“, *Meth. Enzymol.*, Bd. 155, S. 335–350, 1987.
- [107] J. E. Brooks, „**Properties and uses of restriction endonucleases**“, *Meth. Enzymol.*, Bd. 152, S. 113–129, 1987.
- [108] H. O. Smith und K. W. Wilcox, „**A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties**“, *J. Mol. Biol.*, Bd. 51, Nr. 2, S. 379–391, Juli 1970.

- [109] B. Weiss, T. R. Live, und C. C. Richardson, „**Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. V. End group labeling and analysis of deoxyribonucleic acid containing single stranded breaks**“, *J. Biol. Chem.*, Bd. 243, Nr. 17, S. 4530–4542, Sep. 1968.
- [110] H. C. Birnboim und J. Doly, „**A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA**“, *Nucleic Acids Res.*, Bd. 7, Nr. 6, S. 1513–1523, Nov. 1979.
- [111] F. Sanger, S. Nicklen, und A. R. Coulson, „**DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977**“, *Biotechnology*, Bd. 24, S. 104–108, 1992.
- [112] „Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: **Molecular cloning: A laboratory manual**“ . .
- [113] Roche, ***RTCA SP Instrument Operator's Manual***, Version November 2009.
- [114] M. M. Bradford, „**A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**“, *Anal. Biochem.*, Bd. 72, S. 248–254, Mai 1976.
- [115] U. K. Laemmli, „**Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**“, *Nature*, Bd. 227, Nr. 5259, S. 680–685, Aug. 1970.
- [116] H. Towbin, T. Staehelin, und J. Gordon, „**Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979**“, *Biotechnology*, Bd. 24, S. 145–149, 1992.
- [117] M. P. Lisanti und M. Sargiacomo, „**Biotinylation and analysis of membrane-bound and soluble proteins**“, *Curr Protoc Immunol*, Bd. Chapter 8, S. Unit 8.16, Mai 2001.
- [118] K. Kolkova, N. Pedersen, V. Berezin, und E. Bock, „**Identification of an amino acid sequence motif in the cytoplasmic domain of the NCAM-140 kDa isoform essential for its neuritogenic activity**“, *J. Neurochem.*, Bd. 75, Nr. 3, S. 1274–1282, Sep. 2000.
- [119] F. S. Walsh, K. Meiri, und P. Doherty, „**Cell signalling and CAM-mediated neurite outgrowth**“, *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, Bd. 52, S. 221–226, 1997.
- [120] V. Berezin und E. Bock, „**NCAM mimetic peptides: an update**“, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Bd. 663, S. 337–353, 2010.
- [121] D. K. Ditlevsen und K. Kolkova, „**Signaling pathways involved in NCAM-induced neurite outgrowth**“, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Bd. 663, S. 151–168, 2010.
- [122] D. D. Schlaepfer, C. R. Hauck, und D. J. Sieg, „**Signaling through focal adhesion kinase**“, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, Bd. 71, Nr. 3–4, S. 435–478, 1999.
- [123] E. Zamir und B. Geiger, „**Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions**“, *J. Cell. Sci.*, Bd. 114, Nr. Pt 20, S. 3583–3590, Okt. 2001.
- [124] M. D. Schaller und J. T. Parsons, „**Focal adhesion kinase and associated**

- proteins“**, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Bd. 6, Nr. 5, S. 705–710, Okt. 1994.
- [125] M. C. Brown, J. A. Perrotta, und C. E. Turner, „**Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin**“, *Mol. Biol. Cell*, Bd. 9, Nr. 7, S. 1803–1816, Juli 1998.
- [126] R. Miñana, J. M. Duran, M. Tomas, J. Renau-Piqueras, und C. Guerri, „**Neural cell adhesion molecule is Endozytosed via a clathrin-dependent pathway**“, *Eur. J. Neurosci.*, Bd. 13, Nr. 4, S. 749–756, Feb. 2001.
- [127] G. E. Pollerberg, K. Burridge, K. E. Krebs, S. R. Goodman, und M. Schachner, „**The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions**“, *Cell Tissue Res.*, Bd. 250, Nr. 1, S. 227–236, Okt. 1987.
- [128] B. Büttner, W. Reutter, und R. Horstkorte, „**Cytoplasmic domain of NCAM 180 reduces NCAM-mediated neurite outgrowth**“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 75, Nr. 6, S. 854–860, März 2004.
- [129] C. A. Otey, M. Boukhelifa, und P. Maness, „**B35 neuroblastoma cells: an easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons**“, *Methods Cell Biol.*, Bd. 71, S. 287–304, 2003.
- [130] B. Büttner und R. Horstkorte, „**Intracellular ligands of NCAM**“, *Adv. Exp. Med. Biol.*, Bd. 663, S. 55–66, 2010.
- [131] H. Son, J. Seuk Kim, J. Mogg Kim, S.-H. Lee, und Y.-S. Lee, „**Reciprocal actions of NCAM and tPA via a Ras-dependent MAPK activation in rat hippocampal neurons**“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Bd. 298, Nr. 2, S. 262–268, Okt. 2002.
- [132] D. K. Ditlevsen, S. Owczarek, V. Berezin, und E. Bock, „**Relative role of upstream regulators of Akt, ERK and CREB in NCAM- and FGF2-mediated signalling**“, *Neurochem. Int.*, Bd. 53, Nr. 5, S. 137–147, Nov. 2008.
- [133] D. K. Ditlevsen, G. K. Povlsen, V. Berezin, und E. Bock, „**NCAM-induced intracellular signaling revisited**“, *J. Neurosci. Res.*, Bd. 86, Nr. 4, S. 727–743, März 2008.
- [134] J. Choi, L. A. Krushel, und K. L. Crossin, „**NF-kappaB activation by N-CAM and cytokines in astrocytes is regulated by multiple protein kinases and redox modulation**“, *Glia*, Bd. 33, Nr. 1, S. 45–56, Jan. 2001.
- [135] A. D. Lafrenaye und B. Fuss, „**Focal adhesion kinase can play unique and opposing roles in regulating the morphology of differentiating oligodendrocytes**“, *J. Neurochem.*, Bd. 115, Nr. 1, S. 269–282, Okt. 2010.
- [136] C. H. Bailey, B. K. Kaang, M. Chen, K. C. Martin, C. S. Lim, A. Casadio, und E. R. Kandel, „**Mutation in the phosphorylation sites of MAP kinase blocks learning-related internalization of apCAM in Aplysia sensory neurons**“, *Neuron*, Bd. 18, Nr. 6, S. 913–924, Juni 1997.
- [137] U. L. Bonn, „**Die Bedeutung NCAM-vermittelter Signaltransduktion für Endozytose und Neuritenwachstum**“. [Online]. Available: <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2004/0413/0413.htm>. [Accessed: 28-Juni-2012].

Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Publikationen:

Bork K, Karbe Y, Pollscheit J, Glaubitz N, Nöhning S, Horstkorte R.
„**Role of collapsin response mediator protein-2 in neurite outgrowth of PC12 cells.**”
Neuroreport. 2010 Jun 23;21(9):641-5

Pollscheit J, Glaubitz N, Haller H, Horstkorte R, Bork K.
„**Phosphorylation of serine 774 of the neural cell adhesion molecule is necessary for cyclic adenosine monophosphate response element binding protein activation and neurite outgrowth.**”
J Neurosci Res. 2012 Aug;90(8):1577-82. doi: 10.1002/jnr.23038. Epub 2012 Mar 15.

Wissenschaftliche Vorträge:

Pollscheit J., Horstkorte R., Bork K.
„**The Role Of Phosphorylation Of The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) During Neurite Outgrowth**”
International Symposium, Signal Transduction and Disease, 27. - 30. November 2009, Aachen (Germany)

Posterbeiträge:

Pollscheit J., Horstkorte R., Bork K.
„**The Nuclear Concentration Of Sialic Acid is Independent From The CMP-Sialic Acid Synthetase Expression**”
19th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), November 30th - Decemeber 2nd, 2008, Wageningen (Niederlande)

Pollscheit J., Horstkorte R., Bork K.
„**The Role Of Phosphorylation Of The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) During Neurite Outgrowth**”
International Symposium, Signal Transduction and Disease, 27.-30. November 2009, Aachen (Germany)

Pollscheit J., Horstkorte R., Bork K.
„**The Role Of Phosphorylation Of The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) During Neurite Outgrowth**”
13th Joint Meeting Signal Transduction Society (STS), “Signal Transduction Receptors, Mediators and Genes”, October 28th - 30th, 2009, Weimar (Germany)

Pollscheit J., Horstkorte R., Bork K.
„**Phosphorylation On Serine 774 Of The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Is Crucial For CREB Activation And Neurite Outgrowth**”
14th Joint Meeting Signal Transduction Society (STS), “Signal Transduction Receptors, Mediators and Genes”, October 18th - 20th, 2010, Weimar (Germany)

Pollscheit J., Horstkorte R., Bork K.

„Phosphorylation On Serine 774 Of The Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Is Crucial For CREB Activation And Neurite Outgrowth”

9th Göttingen Meeting Of The German Neuroscience Society, March 23th - 27th, 2011 (Germany)

Posterpreis:

A1-Anja Seiferth, A2-Sabrina Winter, A3-Rebecca Wagner, A4-Maria Schindler, A5-Kati Richter, A6-Juliane Pollscheit, A7-Paulina Rolewska, A8-Ilka Oerlecke und A9-André Steven

„Ausbildung von Signalnetzen auf dem Weg von der Zellmembran zum Zellkern: Konvergenz auf Komponenten des klassischen cAMP/CREB-Signalwegs“

Forschungstag 2011 Universitätsmedizin Halle/Saale, 30.Juni 2011,

Diplomarbeit:

Pollscheit, J. (2009). Diplomarbeit (Dipl. troph.) **„Bedeutung der Phosphorylierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) beim Neuritenwachstum“**. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Juliane Pollscheit
Geburtsdatum und –ort	19.01.1984, Magdeburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnort	Händelstraße 33 06114 Halle (Saale)

Ausbildung und Beruf

1990 – 1994	Grundschule Thomas Müntzer Magdeburg
1994 – 1998	Humboldt Gymnasium Magdeburg
1998 – 2001	Sportgymnasium Magdeburg
2001 – 2003	Sportgymnasium Halle
2003	Abschluss Allgemeine Hochschulreife
2003 bis 2009	Studium Ernährungswissenschaft Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Mai 2008 bis Februar 2009	Diplomarbeit mit dem Thema: „Bedeutung der Phosphorylierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM)“ (angefertigt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Horstkorte am Institut für Physiologische Chemie, MLU Halle-Wittenberg)
Februar 2009	Abschluss Diplom
März 2009 – Juni 2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Promotion bei Prof. Dr. R. Horstkorte mit dem Thema „Untersuchung zur Signaltransduktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM)“
Juni 2011 – November 2011	Forschungsaufenthalt an der Virginia Commonwealth University in Richmond, VA (USA) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Fuss im <i>Department of Anatomy & Neurobiology, Medical Center</i>

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rüdiger Horstkorte für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit, das allzeit entgegengebrachte Vertrauen in meine Arbeit und seine fachliche und persönliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

Herzlichen Dank auch für die Ermöglichung des Forschungsaufenthaltes in den USA.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl und Frau PD Dr. Kerstin Danker für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Kaya Bork danke ich für die gute Betreuung, die fachlichen Diskussionen und vor allem für die intensive Unterstützung und aufmunternden Worte, besonders in den letzten Wochen und Monaten.

Für die freundliche und angenehme Laboratmosphäre, für die stete Hilfsbereitschaft bei der Lösung jeglicher Laborprobleme möchte ich mich bei allen „Horstkortes“ bedanken, die in den letzten Jahren mit mir zusammen den Laboralltag gemeistert haben. Ein besonderer Dank gilt Nicole Glaubitz, die zu jeder Tages- und Nachtzeit (besonders während meiner Zeit in Übersee) bemüht war, die Probleme des Laboralltages zu lösen und mich hilfreich unterstützt hat. Nicht vergessen möchte ich unsere vielen Aktivitäten außerhalb des Labors: Essen, Geburtstagsfeiern, Kicker-Turniere und die täglichen „Laborgespräche“. Auch dafür Danke!

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hollemann bedanke ich mich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Motivation in frustrierenden Zeiten und ihr stets offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte. Ich danke Euch für die vielen Versuche, mich in der letzten Zeit aus meinem Kämmerchen zu locken und mir dadurch zu helfen, den Kopf frei zu bekommen und wieder Energie zu tanken!

Der größte Dank jedoch gilt meinen lieben Eltern, die mir während meiner Promotionszeit immer zur Seite standen, mich jederzeit in meiner Motivation bestärkten und die es mir ermöglichten, mein Ziel wirklich zu realisieren. DANKE!

Weiterhin danke ich besonders meinem Bruder Chrischi und seiner Frau Corina, die stets für mich da waren und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Danke auch für das Korrekturlesen der Arbeit und jegliche angebrachte Kritik.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Untersuchungen zur Signaltransduktion des neuronalen Zelladhäsionsmoleküles (NCAM)“ selbstständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Alle hierzu benutzten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel sind genau und vollständig angegeben worden.

Des Weiteren erkläre ich, dass keine Strafverfahren gegen mich anhängig sind.

Halle (Saale), den 24.07.2012

Juliane Pollscheit