# Untersuchungen zu der zuckerabhängigen Interaktion der neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24 und ihrer funktionellen Bedeutung im Nervensystem der Maus.

## DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frauke Brendel

Hamburg, 2005

Gutachter:

Herr Prof. Dr. P. Heisig

Frau Prof. Dr. M. Schachner

Datum der Disputation: 25.11.2005

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitu	ng	1
	1.1	Zuckerverbindungen als Träger biologischer Informationen	1
	1.1.1	Glykosylierung von Proteinen	3
	1.1.1.1	Struktur und Biosynthese der N-Glykane	3
	1.1.1.2	Struktur und Biosynthese der O-Glykane	4
	1.1.2	Glykosylierung von Lipiden	7
	1.2	Funktionelle Bedeutung der Glykosylierung für das Nervensystem	8
	1.2.1	Sialinsäuren	11
	1.3	Neurale Zelladhäsionsmoleküle	12
	1.3.1	Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie	12
	1.3.1.1	Das Zelladhäsionsmolekül L1	14
	1.3.2	Das Zelladhäsionsmolekül CD24	18
	1.3.3	Die Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24	20
	1.4	Aufgabenstellung	24
2	Material		25
	2.1	Chemikalien	25
	2.2	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	25
	2.3	Zelllinien	27
	2.4	<i>E. coli</i> -Stämme	28
	2.5	Plasmide	28
	2.6	Expressionskonstrukte	29
	2.7	Antibiotika	29
	2.8	Antikörper	30
	2.8.1	Primäre Antikörper	30
	2.8.2	Sekundäre Antikörper	31
	2.9	Peptide	31
	2.10	Zucker	32
~	Math		~ -
3	wethode	en	34
	3.1	Biochemische Methoden	34
	3.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34

3.1.2	Silberfärbungen von SDS-Polyacrylamidgelen	35
3.1.2.1	Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick	35
3.1.2.2	Silberfärbung nach Shevchenko	36
3.1.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	37
3.1.4	Immunoblot-Analyse ( <i>Western blot</i> )	37
3.1.4.1	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose- Membranen	37
3.1.4.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose- Membranen	38
3.1.4.3	Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz	39
3.1.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen (BCA-Test)	39
3.1.6	Proteinfällung nach Wessel	40
3.1.7	Aufreinigung monoklonaler Antikörper über Protein G	40
3.1.8	Kopplung von Liganden an CNBr-aktivierte Sepharose 4B	41
3.1.9	Aufreinigung von CD24 aus Maushirn	41
3.1.10	Rekombinante Expression von L1-Proteinfragmenten in E. coli	42
3.1.11	Aufreinigung der rekombinanten L1-Proteinfragmente	43
3.1.12	<u>Enzyme-Linked Immunos</u> orbent <u>A</u> ssay (ELISA)	44
3.1.13	Enzymatische Behandlung von aufgereinigtem CD24	47
3.1.13.1	Verdau von aufgereinigtem CD24 mit N-Glycosidase F	47
3.1.13.2	Verdau von aufgereinigtem CD24 mit O-Glycosidase und Neuraminidase	48
3.1.13.3	Verdau von aufgereinigtem CD24 mit O-Sialoglykoprotein Endopeptidase	49
3.1.14	Charakterisierung von Glykoproteinen mittels Lektinen	49
3.1.15	Herstellung eines Gehirnhomogenats, eines "17000 x g- Sedimentes" und "17000 x g-Überstandes" aus Gesamtgehirn	50
3.1.16	Identifizierung putativer Bindungspartner mit Hilfe von <i>Pull-down</i> -Experimenten	51
3.1.16.1	Kopplung von Liganden an Epoxy-Beads	51
3.1.16.2	Isolierung möglicher Bindungspartner mit Epoxy-Beads	51
3.1.17	Immunpräzipitation	52
3.2	Molekularbiologische Methoden	53
3.2.1	Stammhaltung und Kultivierung von E. coli	53
3.2.1.1	Stammhaltung	53
3.2.1.2	Kultivierung	53
3.2.2	Herstellung von kompetenten Bakterien	54

\_\_\_\_

	3.2.3	Transformation von Bakterien	. 54
	3.2.4	Plasmidisolation aus 3 ml Bakterienkulturen	55
	3.2.5	Restriktionsverdau von DNS	55
	3.2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS	55
	3.2.7	Polymerase-Kettenreaktion	56
	3.2.8	Gerichtete DNS-Mutagenese	56
	3.2.9	DNS-Konzentrationsbestimmung	. 58
	3.2.10	DNS-Sequenzierung	. 58
	3.3	Zellbiologische Methoden	. 58
	3.3.1	Kultivierung und Langzeitlagerung der Zelllinien	. 59
	3.3.1.1	Kultivierung von CHO-Zellen	. 59
	3.3.1.2	Kultivierung von Hybridomazellen	. 60
	3.3.1.3	Produktion monoklonaler Antikörper mit Hybridomazellen	61
	3.3.1.4	Langzeitlagerung der Zelllinien	61
	3.3.2	Primärzellkultur	62
	3.3.2.1	Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin	62
	3.3.2.2	Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen	63
	3.3.2.3	Einzelzellkulturen von Hinterwurzelganglienneuronen	66
	3.3.2.4	Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen	. 69
	3.3.3	Aufarbeitung von Zellen	. 69
4	Ergebni	sse	71
	4.1	Aufreinigung von CD24 aus Maushirn	. 71
	4.2	Identifizierung der Sialinsäure-Bindungsstelle im L1	. 73
	4.2.1	Expression und Aufreinigung der rekombinanten L1- Proteinfragmente	. 73
	4.2.2	Bindung der L1-Proteinfragmente an CD24	. 75
	4.2.3	Gerichtete Mutagenese in der putativen Sialinsäure- Bindungsstelle des L1	. 76
	4.2.4	Bindung der L1-Peptide an CD24	. 79
	4.3	Spezifität der Sialinsäure-Bindungsstelle im L1	81
	1 1	Rodoutung dar a2.2 varknünftan Sialinsäuran für das CD24	
	4.4	abhängige Neuritenwachstum	. 83
	4.4	abhängige Neuritenwachstum	83 85
	4.4 4.5 4.6	abhängige Neuritenwachstum Charakterisierung der Zuckerseitenketten des CD24 Funktionelle Bedeutung der O-Glykane des CD24	83 85 88

IV	1	Inhaltsverzeichnis	
	4.6.2	Bedeutung der O-Glykane des CD24 für das CD24-abhängige Neuritenwachstum	. 90
	4.7	Bedeutung des Lewis <sup>x</sup> -Epitops für das CD24-abhängige Neuritenwachstum	. 92
	4.7.1	Einfluss eines L-Fucose-Replika-Peptids auf das CD24- abhängige Neuritenwachstum	. 94
	4.8	Bedeutung von α2,3-verknüpften Sialinsäuren und Lewis <sup>x</sup> für das Neuritenwachstum der Kleinhirnneuronen	. 97
	4.9	Rezeptoren des Lewis <sup>x</sup> -Epitops	. 98
	4.9.1	Identifizierung putativer Lewis <sup>x</sup> -Rezeptoren	. 99
	4.9.2	Vorkommen der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin in Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen	101
	4.9.3	Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mit Lewis <sup>x</sup>	103
	4.9.4	Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mit CD24	104
	4.9.5	Bedeutung der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin für das CD24-abhängige Neuritenwachstum	106
5	Diskuss	sion1	109
6	Zusamn	nenfassung1	129
7	Summa	ry1	131
8	Literatu	r1	132
9	ANHAN	G1	154
	9.1	Oligonukleotide	154
	9.2	Gerichtete Mutation einer Aminosäure im I 1-Molekül	154
	9.3	Verzeichnis der Abbildungen	155
	9.4	Verzeichnis der Tabellen	157
	9.5	Abkürzungen und Einheiten	158
	9.6	Abkürzungen der Nukleotide und Aminosäuren	164

## 1 Einleitung

### 1.1 Zuckerverbindungen als Träger biologischer Informationen

Die Anheftung und anschließende Prozessierung von Zuckerverbindungen wird als **Glykosylierung** bezeichnet und ist eine wichtige Modifikation vieler Proteine und Lipide. Die angehefteten Zuckerverbindungen (**Glykane**, Oligosaccharide) setzen sich aus Monosacchariden zusammen. Sie galten lange Zeit lediglich als zusätzliche Strukturelemente von Proteinen und Lipiden. Im Laufe der letzten Jahre allerdings wurden den Zuckerverbindungen mehr und mehr auch biologische Aktivitäten zugesprochen (Kottgen *et al.*, 2003). Daher sind die Glykane, ihre Struktur und Synthese sowie ihre Aufgaben und Funktionen im Organismus zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Für die Untersuchung der Glykosylierung wurde der Begriff **Glycomics**, in Anlehnung an

die Begriffe *Proteomics* und *Genomics*, geprägt. Durch die Interaktion der Glykane mit **Lektinen** (kohlenhydratbindende Proteine) ist eine Vermittlung von zahlreichen wichtigen Prozessen, wie Adhäsionsund

Kommunikationsprozessen, gezeigt worden (Kottgen *et al.*, 2003). Eine Übersicht über beschriebene allgemeine Funktionen von Zuckerseitenketten gibt die **Tabelle 1.1**. Tab. 1.1: Funktionen, die durch Glykosylierungen beeinflusst und reguliert werden (Kottgen *et al.*, 2003).

- Qualitätskontrolle der Proteinsynthese im ER
- Stabilisierung der Proteinkonformation
- Regulation des intrazellulären Proteintransports, der Proteinsekretion und –endozytose
- Organisation der zellulären Plasmamembran
- Vermittlung und/oder Modulation der Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren
  - Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, Zellmigration
  - angeborene und erworbene Immunität, z.B. Entzündungsprozesse
  - Fertilisierung, Embryonalentwicklung
  - Apoptose und Zelllyse
  - Tumorinvasion und -metastasierung

Die angehefteten Glykane zeichnen sich durch eine hohe **Strukturdiversität** aus. Diese ergibt sich aus der Art der verknüpften Monosaccharide, ihrer Anzahl und der Vielfalt der Verknüpfungsmöglichkeiten der Monosaccharide (Kottgen et al., 2003). Zu den vorkommenden Monosacchariden gehören D-Glucose (Glc), D-D-Mannose (Man), L-Fucose D-Xylose Galactose (Gal), (Fuc), (Xyl), Glucuronsäure und Iduronsäure, die Aminozucker N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin (GalNAc) und die Sialinsäuren (Neu5Ac). Die Vielfalt der Verknüpfungsmöglichkeiten ergibt sich durch die anomeren Zentren und die weiteren drei bis vier Hydroxylgruppen der Monosaccharide, über die glykosidische Bindungen von Zuckern erfolgen können. Eine glykosidische Bindung zwischen Zuckern erfolgt zwischen der Hydroxylgruppe des anomeren C-Atoms und einer der Hydroxylgruppen des anderen Zuckers unter Abspaltung von Wasser. Für die Beschreibung alvkosidischer Bindungen ist wichtig, welche C-Atome der beiden Monosaccharide über die glykosidische Bindung verknüpft sind und welche Position das verknüpfende Sauerstoff-Atom hat. Ist z.B. das C1-Atom des ersten Monosaccharids mit dem Sauerstoff des C4-Atoms des zweiten Monosaccharids über eine glykosidische Bindung verknüpft und das verknüpfende O-Atom liegt oberhalb der Ebene des Ringes des ersten Monosaccharids, beschreibt man diese Bindung mit  $\beta$ 1,4. Befindet sich die Verknüpfung der beiden Monosaccharide unterhalb der Ebene des ersten Ringes, spricht man von einer  $\alpha$ 1,4-Verknüpfung.

Wegen einer fehlenden Matrize für die Zusammensetzung der Oligosaccharidketten sind die an der Biosynthese beteiligten spezifischen Glykosyltransferasen, die für den Transfer eines Monosaccharids auf eine Akzeptorstruktur spezifisch sind, von großer Bedeutung (s. 1.1.1.1 und 1.1.1.2). die Weitere wichtige Faktoren für Regulation der Biosynthese von Oligosaccharidseitenketten sind die Konformation des jeweiligen Proteins, das zelluläre Expressionsmuster von Glykosidasen und Glykosyltransferasen und ihre subzelluläre Lokalisierung und die Konzentration der Monosaccharide (Kottgen et 2003). Aufgrund Unterschieden im Expressionsmuster al., von von Glykosyltransferasen und Glykosidasen sind Unterschiede in der Glykosylierung in

Abhängigkeit des Zelltyps und der Entwicklung zu beobachten (Lowe und Marth, 2003).

#### 1.1.1 Glykosylierung von Proteinen

Als **Glykoproteine** werden Proteine bezeichnet, die kovalent an ihre Peptidkette gebundene Glykane tragen. Hier werden nach der Art der Verknüpfung mit dem Peptid zwei Gruppen unterschieden, die N-glykosidisch verknüpften **N-Glykane** und die O-glykosidisch verknüpften **O-Glykane**. Die N- und O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide besitzen unterschiedliche Strukturen und werden in den folgenden Unterkapiteln dargestellt.

Mucine sind stark glykosylierte Proteine, die reich an Serin- und/oder Threoninresten im Proteinkern sind und daher auch reich an O-Glykanen sind (s. 1.1.1.2), die sich häufig in dicht gepackten Clustern befinden (Kleene und Schachner, 2004). Mucine werden besonders häufig auf verschiedenen Epithelzellen gefunden (Haltiwanger und Lowe, 2004). Proteoglykane tragen Glykosaminoglykanketten, die sich aus repetitiven, meist unverzweigten und negativ geladenen Polymeren aus 20 – 400 bestimmten Disacchariden zusammensetzen. Die Proteoglykane sind in Bindegeweben, der extrazellulären Matrix (EZM) und auf der Oberfläche verschiedener Epithelzellen zu finden (Kottgen *et al.*, 2003; Haltiwanger und Lowe, 2004).

#### 1.1.1.1 Struktur und Biosynthese der N-Glykane

N-glykosidisch verknüpfte Glykane setzen sich aus 7 – 20 oder auch mehr Monosacchariden zusammen. In der Regel liegt der N-verknüpfte Zuckeranteil eines Glykoproteins zwischen 5 – 15 % des Gesamtmolekulargewichts (Kottgen *et al.*, 2003). Die N-glykosidisch verknüpften Glykane sind über N-Acetylglucosamin an die Amidgruppe eines Asparaginrestes in der spezifischen Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr gebunden, wobei X für eine beliebige Aminosäure außer Prolin steht. Zu Beginn der Biosynthese (**Abb. 1.1**) wird im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ein bereits fertig gestellter Oligosaccharidvorläufer en bloc auf die naszierende Polypeptidkette durch einen Multienzymkomplex übertragen. Während des Transports des nun glykosylierten Polypeptids durch das ER und den Golgi-Apparat finden Modifikationen an der Oligosaccharidstrukur statt (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Dabei werden durch spezifische Glykosidasen und Glykosyltransferasen sowohl Monosaccharide abgespalten (*trimming*) als auch angefügt (processing). So entstehen verschiedene Oligosaccharidstrukturen: oligomannosidische Glykane (high *mannose type*) mit terminalen unsubstituierten Mannoseresten, hybride Glykane (hybrid type) und komplexe Glykanstrukturen (complex type), deren mögliche Strukturen in der **Abbildung 1.1** dargestellt sind. Trotz dieser Modifikationen haben die N-verknüpften Oligosaccharide eine Kernstruktur aus zwei N-Acetylglucosamin- und drei Mannoseresten gemeinsam, die sich aus der en bloc Übertragung des Vorläuferoligosaccharids erklärt.

#### 1.1.1.2 Struktur und Biosynthese der O-Glykane

O-glykosidisch gebundene Glykane sind im allgemeinen kürzer als die schon beschriebenen N-Glykane und setzen sich meist aus weniger als zehn Monosacchariden zusammen. Die O-glykosidisch verknüpften Glykane sind an die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Serin oder Threonin des Proteinkerns gebunden, wobei eine Konsensussequenz bisher nicht bekannt ist. Ihre Biosynthese ist auch im ER bis zum *trans*-Golgi-Apparat lokalisiert, unterscheidet sich aber grundlegend von der der N-Glykane. Hier werden die Monosaccharide einzeln und nacheinander an die Peptidkette angefügt, wobei jeder Transfer eines Zuckers von einer spezifischen Glykosyltransferase katalysiert wird. Die O-Glykane besitzen daher im Gegensatz zu den N-Glykanen keine gemeinsame Kernstruktur. Die O-Glykane können über N-Acetylgalactosamin, aber auch über Mannose oder Fucose mit Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin verknüpft sein (**Abb. 1.2**; Haltiwander und Lowe, 2004).



Galactose
Mannose
N-Acetylglucosamin
Glucose
Ailinsäure
O
Fucose
Dol-P
Dolicholpyrophosphat

Abb. 1.1: Biosynthese von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden (nach Kleene und Schachner, 2004). Im Cytosol und ER-Lumen wird aus Dolicholphosphat, einem Phosphatrest und UDP- bzw. GDP-Monosacchariden das Dolicholpyrophosphat-Oligosaccharid, bestehend aus drei Glucose-, neun Mannose- und zwei N-Acetylglucosamin-Resten, als Vorläufer synthetisiert. Dieser Vorläufer wird auf einen Asparaginrest innerhalb der Konsensussequenz der naszierenden Polypeptidkette durch die Oligosaccharyltransferase übertragen (Schritt 1). In mehreren enzymatisch katalysierten Reaktionen werden nacheinander die drei Glucosereste und ein Mannoserest entfernt (Schritt 2), nach Transport des glykosylierten Proteins zum cis-Golgi-Apparat werden von der Oligossacchridstruktur weitere Mannosereste abgespalten (Schritt 3), wobei oligomannosidische Glykane (high-mannose-type) entstehen. Durch Anheftung von mehreren N-Acetylglucosaminresten (Schritt 4 u. 5) entstehen im medialen Golgi-Apparat hybride Oligosaccharide (hybridtype). Eine endgültige Prozessierung zu komplexen Oligosacchariden (complex-type) findet im trans-Golgi-Kompartiment mit der Anheftung weiterer N-Acetylglucosamin-, Galactose-, Fucose- und Sialinsäureresten in verschiedenen Verknüpfungen statt (Schritt 6), so dass verschiedene mögliche Antennenstrukturen entstehen. N-Glykane des Nervensystems tragen häufig "bisecting" N-Acetylglucosamin oder Fucosereste an Kernoligosaccharid und Seitenarmen. Punktierte Verknüpfungen von Zuckern zeigen, dass diese Verknüpfungen in den beschriebenen Strukturen ab- oder anwesend sein können.



N-Acetylglucosamin VSer/Thr Polypeptidkette

Abb. 1.2: Biosynthese von O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden (nach Kleene und Schachner, 2004). Die Biosynthese beginnt im ER oder *cis*-Golgi-Apparat mit dem Transfer von N-Acetylgalactosamin (A, Schritt 1), Mannose (B, Schritt 1) oder Fucose (C, Schritt 1) auf die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin der Polypeptidkette. Im *trans*-Golgi-Kompartiment werden aufeinanderfolgend durch spezifische Glykosyltransferasen N-Acetylglucosamin, Galactose, Sialinsäure und Fucose in verschiedenen Verknüpfungen angefügt, so dass die unterschiedlichen Oligosaccharidstrukturen entstehen (A, B, C, Schritt 2 und 3). Die Struktur des Lewisx-Epitops ist farbig unterlegt. Punktierte Verknüpfungen von Zuckern zeigen, dass diese Verknüpfungen in den beschriebenen Strukturen ab- oder anwesend sein können. (C) Die Struktur der O-verknüpften Zucker, die auf EGF-Domänen von Notch identifiziert wurden, sind gezeigt (Haltiwanger und Lowe, 2004).

Neben der "klassischen" Verknüpfung über N-Acetylgalactosamin wurden in Säugetieren, bisher nur in Nervensystem und Muskeln, O-Mannose-verknüpfte Zuckerseitenketten beschrieben, für die im Nervensystem ein Anteil von fast 30 % der gesamten O-Glykosylierung angenommen wird (Wing et al., 1992; Chiba et al., 1997; Chai et al., 1999). Moleküle, für die diese O-Glykosylierung gezeigt werden konnte, sind  $\alpha$ -Dystroglycan, das Glykoprotein der EZM Tenascin-R und die Proteoglykane Phosphacan und Neurocan (Yuen et al., 1997; Chai et al., 1999). Auch die Verknüpfung der O-Glykane über Fucose wurde für zahlreiche Glykoproteine beobachtet, wie z.B. Notch und seine Liganden Delta und Serrate/Jagged (Wang et al., 2001; Haltiwanger, 2002). Durch die weitere aufeinanderfolgende Anheftung Zuckerresten durch spezifische von Glykosyltransferasen werden die Glykanketten weiter verlängert, und es entstehen unterschiedliche Zuckerketten, deren mögliche Strukturen in der Abbildung 1.2 dargestellt sind.

#### 1.1.2 Glykosylierung von Lipiden

Neben Proteinen tragen auch Lipide häufig Oligosaccharide und werden dann als **Glykolipide** bezeichnet. Sie sind essentielle Bestandteile von Membranen und ergeben sich aus der Anheftung verschiedener Monosaccharide wie Galactose, Glucose oder N-Acetylgalactosamin an Ceramid (**Abb. 1.3**). Durch weitere Anheftung von Monosacchariden und auch einer oder mehrerer Sialinsäuren entstehen die **Ganglioside**. Ein hoher Gehalt an Gangliosiden wird vor allem im Nervensystem von Säugetieren beobachtet, der dort fast zehnmal höher ist als in anderen Organen (Kottgen *et al.*, 2003).



Abb. 1.3: Biosynthese von Glykolipiden (nach Kleene und Schachner, 2004). Die Biosynthese beginnt mit der Synthese von Ceramid, das aus dem Aminoalkohol Sphingosin und einer variablen langkettigen Fettsäure entsteht. Durch die Anheftung von Galactose oder Glucose entstehen Galactocerebrosid bzw. Glucocerebrosid. Anheftung von Sulfatgruppen führt zu Sulfatiden. Lactosylceramid ist der Vorläufer der Glykosphingolipide. Durch weitere Anheftung von N-Acetylgalactosamin, Galactose und Sialinsäure entstehen die verschiedenen Ganglioside, deren Strukturen, die hauptsächlich im Nervensystem von Säugetieren vorkommen, hier dargestellt sind (Vyas *et al.*, 2002).

## 1.2 Funktionelle Bedeutung der Glykosylierung für das Nervensystem

Die funktionelle Bedeutung von Zuckerstrukturen für die Entwicklung, Funktion und Regeneration des Nervensystems konnte durch zahlreiche Studien gut belegt werden. Im Laufe der letzten Jahre ist es deutlich geworden, dass die Zuckerstrukturen an neuralen Zell-Zell-Interaktionen und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt sind. Die Zuckerstrukturen spielen dabei eine Rolle bei verschiedenen Prozessen, wie der Zellerkennung, Zellmigration, Axonfaszikulierung und – wachstum, der Synapsenbildung sowie bei der mit Lernen und Gedächtnis assoziierten synaptischen Plastizität (Jessell *et al.*, 1990; Lowe und Marth, 2003; Kottgen *et al.*, 2003; Haltiwanger und Lowe, 2004; Kleene und Schachner, 2004). Es lässt sich vermuten, dass die große Strukturdiversität der Zuckerstrukturen und auch die schnelle Modifikation der Glykosylierung einen Mechanismus darstellt, um Ligand-Rezeptor-Interaktionen zu vermitteln oder zu modulieren, und diese so eine wichtige Bedeutung für die Steuerung und Feinregulation dieser Prozesse haben (Schachner und Martini, 1995).

Besonders deutlich wird die Bedeutung der Glykosylierung allgemein durch angeborene Glykosylierungsstörungen (congenital disorders of glycosylation, **CDG**). Unter diesem Begriff werden zahlreiche Krankheitsbilder mit sehr variablem klinischen Spektrum zusammengefasst, die ihre Ursache in angeborenen Defekten der Glykosylierung von Proteinen und Lipiden haben. Bisher sind 11 verschiedene Defekte in der N-Glykosylierung von Proteinen bekannt, die auf Enzym- oder Transporterdefekten in der Biosynthese oder der nachfolgenden Modifizierung der N-glykosidisch verknüpften Zucker beruhen (Marguardt und Denecke, 2003). Sehr häufig sind bei den Patienten hier psychomotorische Retardierung und muskuläre Hypotonie zu beobachten. Neben zahlreichen anderen betroffenen Organen wurden als häufige neurologische Symptome Kleinhirnhypoplasie, Ataxie, häufige Krampfanfälle, kortikale Atrophie, verzögerte Myelinisierung und Läsionen in der weißen Substanz, periphere Neuropathie und Mikrozephalie beschrieben, die sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können (Marguardt und Denecke, 2003). Zahlreiche generierte Maus-Mutanten mit verschiedenen Defekten in der N-Glykosylierung stellen heute Tiermodelle für die verschiedenen menschlichen Erkrankungsbilder dar, die weiter zum Verständnis der molekularen Grundlagen beigetragen haben (Lowe und Marth, 2003). Die transgenen Mäuse zeigten auch, dass die Erkrankung einen sehr viel schwereren Verlauf hat, wenn die Biosynthese der N-Glykosylierung durch die auftretenden Defekte sehr früh gestört ist. Ebenso führen auch angeborene Defekte, die die O-Glykosylierung betreffen, zu verschiedenen Krankheitsbildern, hierzu zählen die muskuläre Dystrophie, die Muscle-Eye-Brain Erkrankung (MEB) und das Walker-

Warburg-Syndrom (WWS). Als Ursache konnten Defekte in der O-Mannosylierung von Proteinen, v.a.  $\alpha$ -Dystroglycan, identifiziert werden (Endo und Toda, 2003; Martin und Freeze, 2003). Die Muscle-Eye-Brain Erkrankung und das Walker-Warburg-Syndrom sind klinisch nah verwandt und zeigen zusätzlich zur muskulären Dystrophie Symptome wie Lissencephalie, Augenfehlbildungen, Hydrocephalus und psychomotorische Kleinhirnhypoplasie, Retardierung, verursacht durch Defekte der neuronalen Migration (Marquardt und Denecke, 2003). Als Ursache konnte im Fall des WWS eine Störung des initialen Schritts der O-Mannosylierung (Abb. 1.2 B, Schritt 1) und im Fall der MEB der darauffolgenden Anheftung des folgenden Monosaccharids (Abb. 1.2 B, Schritt 2) durch Mutationen in den entsprechenden Glykosyltransferasen gezeigt werden (Yoshida et al., 2001; Beltran-Valero et al., 2002; Marguardt und Denecke, 2003). Dies macht deutlich, dass die O-Mannose verknüpfte Glykosylierung eine Schlüsselrolle für die Migration von Neuronen und die Entwicklung des Nervensystems spielt. Auch eine Störung der O-Fucosylierung des Proteins Notch (Abb. 1.2 C, Schritt 1) führt zu schweren Fehlbildungen während der Embryonalentwicklung (Shi und Stanley, 2003).

Die Bedeutung der Glykosylierung für die Regulation von biologischen Prozessen wird auch daran deutlich, dass mit einigen Erkrankungen eine Veränderung der Glykosylierung assoziiert ist, wie z.B. bei der Tumorgenese und -metastasierung (Kottgen *et al.*, 2003) oder der Alzheimer'schen Krankheit (Espinosa *et al.*, 2001).

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass bestimmte Zuckerstrukturen eine funktionelle Bedeutung für die Entwicklung, Funktion und auch Regeneration des Nervensystems haben. Wichtige Glykanstrukturen, die untersucht wurden und denen wichtige Rollen, wie bei z.B. Zellmigration, Auswachsen und Verzweigung von Axonen und/oder synaptischer Plastizität, zugesprochen werden konnten, sind u.a.: Polysialinsäuren und Sialinsäuren (s. 1.2.1), das human natural killer cell Glykan HNK-1 (3´-sulfatierte Glucuronsäure, die an Lactosamin (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) über eine  $\beta$ 1,3-Verknüpfung gebunden ist), das Lewis<sup>x</sup>-Epitop (Struktur s. Abb. 1.2 A, B), oligomannosidische Zuckerstrukturen (s. 1.1.1.1 und **Abb. 1.1**) und Glykosaminoglykane (s. 1.1.1) (Kleene und Schachner, 2004).

#### 1.2.1 Sialinsäuren

Wie erwähnt, sind auch die Sialinsäuren an zahlreichen Prozessen während der Entwicklung und Funktion des Nervensystems beteiligt (Lowe und Marth, 2003). Die Sialinsäuren stellen eine Familie aus bis zu 40 Mitgliedern dar, die Derivate sind und sich durch verschiedene Substituenten der Neuraminsäure unterscheiden, wobei die N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) eine zentrale Rolle spielt (Kottgen et al., 2003). Die Sialinsäuren befinden sich in terminaler Position der Oligosaccharide von Proteinen oder Lipiden, wobei sie im Nervensystem hauptsächlich in einer  $\alpha 2,3$ -Verknüpfung und seltener in der  $\alpha 2,6$ -Verknüpfung vorliegen (Zamze *et al.*, 1998). Eine Besonderheit stellt die  $\alpha$ 2,8-Verknüpfung von Sialinsäuren dar, die in den Zuckerstrukturen der Ganglioside (s. 1.1.2) und der Polysialinsäure zu finden ist. Die Polysialinsäure (PSA) ist ein Homopolymer der Sialinsäuren. das ausschließlich auf N-Glykanen des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM (s. 1.3.1) identifiziert wurde (Finne et al., 1983). In der exponierten Position am Ende der Zuckerketten spielen die Sialinsäuren wichtige Rollen bei zellulären und molekularen Interaktionen über ihre Interaktionen mit spezifischen Lektinen, den Mitgliedern der siglec-Familie (sialic acid binding immunoglobulin like lectin; s. 1.3.3) und Selektinen (Kelm und Schauer, 1997). Das <u>myelin-associated glycoprotein</u> MAG, ein neurales Zelladhäsionsmolekül (s. 1.3.1) und ein Mitglied der siglec-Familie, zeigt eine spezifische Bindung von  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren (Kelm *et al.*, 1994; Crocker et al., 1998). MAG spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und Erhaltung von Myelin (Schachner und Bartsch, 2000) und hat einen inhibitorischen Effekt auf das Neuritenwachstum von postnatalen Kleinhirnneuronen, Hippocampusneuronen, Retinaneuronen und adulten Hinterwurzelganglienneuronen (deBellard et al., 1996; Filbin, 1996). Allerdings zeigte MAG einen fördernden Einfluss auf das Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen in sehr frühen Entwicklungsstadien (deBellard et al., 1996). Nach Entfernen von Sialinsäureresten auf Neuronen oder nach Mutation der Sialinsäure-Bindungsstelle in MAG wurde der inhibitorische MAGabhängige Effekt auf das Neuritenwachstum aufgehoben (deBellard et al., 1996; Tang et al., 1997; Vinson et al., 2001). MAG bindet die  $\alpha$ 2,3-verknüpften

Sialinsäuren auf komplexen Gangliosiden (s. auch **Abb. 1.3**). Eine funktionell bedeutende Interaktion von MAG mit den Gangliosiden GD1a und GT1b (s. 1.1.2) ist gezeigt worden, während MAG nicht an Ganglioside bindet, die keine terminalen  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäurereste tragen (Vinson *et al.*, 2001; Vyas *et al.*, 2002). Interessanterweise zeigen Mäuse, die aufgrund eines Enzymdefekts in der Biosynthese keine sialinsäuretragenden Ganglioside exprimieren, Defekte in der Myelinisierung im peripheren und Zentralen Nervensystem, eine progressive Neurodegeneration und eine Dysregulation der Expression von MAG (Sheikh *et al.*, 1999; Vyas und Schnaar, 2001; Sun *et al.*, 2004). Diese Studien zeigen eine Bedeutung der  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren für die Funktion und Entwicklung des Nervensystems. Auch eine Störung der Biosynthese von Sialinsäuren durch einen Enzymdefekt führt zu schweren Entwicklungsstörungen während der Embryogenese (Schwarzkopf *et al.*, 2002). Terminale Sialinsäuren sind auch von essentieller Bedeutung für die Interaktion der neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24, die in **Kapitel 1.3.3** beschrieben werden soll.

### 1.3 Neurale Zelladhäsionsmoleküle

Zu der Gruppe der neuralen Zelladhäsionsmoleküle gehören u.a. Integrine (Reichardt und Tomaselli, 1991; Hynes, 1992), kalziumabhängige Cadherine (Kemler *et al.*, 1989; Takeichi, 1991), Moleküle der extrazellulären Matrix (Sanes, 1989; Reichardt und Tomaselli, 1991) und Zelloberflächenproteine der Immunglobulin-Superfamilie (Williams und Barclay, 1988; Brummendorf und Rathjen, 1995), wobei diese im folgenden Kapitel näher beschrieben werden sollen.

#### 1.3.1 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie

Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin(Ig)-Superfamilie spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und im adulten Nervensystem, wobei für sie sowohl homophile als auch heterophile Bindungen und Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beschrieben wurden (Williams und

Barclay, 1988; Brummendorf und Rathjen, 1996; Crossin und Krushel, 2000; Rougon und Hobert, 2003). Die Ig-Superfamilie stellt eine der größten bisher identifizierten Proteinfamilien mit mehr als 100 Mitgliedern dar, die durch ein gemeinsames Strukturmotiv, der Immunglobulin(Ig)-Domäne, charakterisiert werden (Williams und Barclay, 1988). Diese Ig-Domänen wurden ursprünglich bei Antikörpern identifiziert (Edelman et al., 1969). Ein weiteres Strukturmerkmal neben der Ig-Domäne stellt die Fibronektin Typ III (FN)-Domäne dar, die bei vielen, jedoch nicht allen Mitgliedern der Ig-Superfamilie gefunden wurde (Crossin und Krushel, 2000). Diese FN-Domänen wurden erstmals im extrazellulären Matrixmolekül Fibronektin beschrieben (Kornblihtt et al., 1985). Die la-Superfamilie wird in weitere Subfamilien unterteilt (Edelman und Crossin, 1991), die in Abbildung 1.4 näher dargestellt sind. Das neural cell adhesion molecule NCAM ist eines der ersten identifizierten Mitglieder der Ig-Superfamilie (Cunningham et al., 1987). NCAM ist in zahlreiche Prozesse des Nervensystems, wie Zellmigration, Zellproliferation, Neuritenwachstum, Axonfaszikulierung und synaptische Plastizität involviert (Walsh und Doherty, 1997; Rougon und Hobert, 2003). Das Zelladhäsionsmolekül L1 (s. 1.3.1.1) findet sich in einer weiteren



Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Subfamilien der neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie (nach Crossin und Krushel, 2000). Die Ig-Superfamilie wird in weitere Subfamilien unterteilt, die sich nach der Anzahl der Ig- und FN-Domänen, nach Art der Verankerung in der Zellmembran und nach der Eigenschaft der zytoplasmatischen Domäne, Tyrosinkinase- oder Phosphatase-Aktivität zu besitzen, richtet.

Subfamilie, die auch als L1-Familie bezeichnet wird. Als weitere Mitglieder beinhaltet die L1-Familie u.a. CHL1 (*close homologue of L1*), Neuroglian, Neurofascin, NgCAM (*neuron-glia cell adhesion molecule*) und NrCAM (*neuronglia cell adhesion molecule related cell adhesion molecule*) (Brummendorf und Rathjen, 1996; Crossin und Krushel, 2000). Eine weitere Subfamilie stellen die in der Zellmembran <u>G</u>lykosylphosphatidylinositol(GPI)-verankerten Zelladhäsionsmoleküle dar (Crossin und Krushel, 2000). Mitglieder hier sind u.a. TAG-1 (Axonin-1; Furley *et al.*, 1990) und F3/Contactin (F11; Gennarini *et al.*, 1989). Für beide wurde gezeigt, dass sie eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion des Nervensystems spielen (Sonderegger, 1997; Falk *et al.*, 2002; Karagogeos, 2003).

#### 1.3.1.1 Das Zelladhäsionsmolekül L1

Das Zelladhäsionsmolekül L1 wurde vor mehr als 20 Jahren im Nervensystem entdeckt (Rathjen und Schachner, 1984) und als Mitglied der Ig-Superfamilie identifiziert (Moos *et al.*, 1988; **Abb. 1.5**). L1 wird als transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa während der Entwicklung und im adulten Nervensystem auf der Zelloberfläche von postmitotischen Neuronen und ihren Axonen und Wachstumskegeln exprimiert (Faissner *et al.*, 1984; Rathjen und Schachner, 1984). Im peripheren



Abb. 1.5: Schematische Darstellung des L1-Moleküls. Das L1-Molekül besteht aus sechs Ig-Domänen, fünf FN-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer kurzen hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne. Den Domänen werden unterschiedliche funktionelle Eigenschaften bei Zelladhäsion, Neuritenwachstum und homophiler Interaktion zugesprochen (Appel *et al.*, 1993; Zhao und Siu, 1995; Holm *et al.*, 1995; Appel *et al.*, 1995; Stallcup, 2000; Haspel *et al.*, 2000). Nervensystem konnte L1 zusätzlich auf nicht-myelinisierenden Schwannschen Zellen nachgewiesen werden (Martini und Schachner, 1986; Martini *et al.*, 1994).

Während der Entwicklung des Nervensystems und der Funktion des adulten Nervensystems ist L1 in zahlreiche wichtige Prozesse involviert. Dazu gehören Zelladhäsion (Rathjen und Schachner, 1984; Moos *et al.*, 1988; Grumet und Edelman, 1988) und Zellmigration (Lindner *et al.*, 1983), Auswachsen von Axonen (Fischer *et al.*, 1986; Lemmon *et al.*, 1989), Axonfaszikulierung (Rathjen *et al.*, 1987; Kunz *et al.*, 1998) und Axonwegfindung (Cohen *et al.*, 1998; Castellani *et al.*, 2000), Förderung des Zellüberlebens von Neuronen (Chen *et al.*, 1999; Loers *et al.*, 2005), Myelinisierung von Neuronen (Wood *et al.*, 1990) und eine Beteiligung an Vorgängen bei synaptischer Plastizität und Lern- und Gedächtnisprozessen (Lüthi *et al.*, 1994; Arami *et al.*, 1996; Law *et al.*, 2003; Saghatelyan *et al.*, 2004).

Diese beschriebenen Funktionen scheinen durch Interaktionen des L1-Moleküls mit verschiedenen Interaktionspartnern vermittelt zu werden (Abb. 1.6). Dazu gehören neurale Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie, neurale Zelladhäsionsmoleküle, die nicht zur Ig-Superfamilie gehören, einige EZM-Moleküle und Signaltransduktionsmoleküle (Haspel und Grumet, 2003). Diese Interaktionen werden über verschiedene Domänen des extrazellulären Teils des L1 vermittelt, während die intrazelluläre Domäne mit Komponenten des Zytoskeletts und Signaltransduktionsmolekülen interagiert (Kenwrick et al., 2000; Haspel und Grumet, 2003). Neben der homophilen L1-L1-Bindung (Lemmon et al., 1989; Moos et al., 1988) wurden die Mitglieder der Ig-Superfamilie NCAM (Kadmon et al., 1990a), TAG-1 (Kuhn et al., 1991), F3/Contactin (Brummendorf et al., 1993), der FGF-Rezeptor (FGF-R; Williams et al., 1994) und DM1-GRASP (DeBernardo und Chang, 1996) als heterophile Interaktionspartner nachgewiesen. Weitere Zelladhäsionsmoleküle, für die eine Interaktion mit L1 gezeigt werden konnte, sind einige Integrine (Treubert und Brummendorf, 1998; Blaess et al., 1998), CD9 (Schmidt et al., 1996) und CD24 (s. 1.3.3). Außerdem gehören Neuropilin-1 (Castellani et al., 2002) und Moleküle der EZM wie Laminin (Grumet et al., 1993) und die Proteoglykane Phosphacan (Milev et al., 1994) und Neurocan (Friedlander et al., 1994) zu den weiteren Bindungspartnern. Die funktionellen



Abb. 1.6: Interaktionen des L1-Moleküls (nach Kenwrick *et al.*, 2000). L1 zeigt eine homophile *trans*-Interaktion, die zur Initiierung des L1-abhängigen Neuritenwachstums über eine Aktivierung des FGF-Rezeptors (FGFR) führt (Doherty und Walsh, 1996). Weiterhin sind für die extrazelluläre Domäne des L1 heterophile Bindungspartner beschrieben und dargestellt. L1 ist auch ein Signal-transduzierender Rezeptor, die zytoplasmatische Domäne des L1 interagiert mit Komponenten des Zytoskeletts, wie Ankyrin und Aktin (Davis und Bennett, 1994; Dahlin-Huppe *et al.*, 1997), wobei Ankyrin die L1-L1-Bindung zu stabilisieren scheint. Die zytoplasmatische Domäne kann außerdem durch einige Kinasen phosphoryliert werden (Wong *et al.*, 1996; Zisch *et al.*, 1997). Dünne Pfeile zeigen eine mögliche Bindung an, dicke Pfeile einen biologischen Effekt.

Bedeutungen einiger Interaktionen sind in **Tabelle 1.2** beschrieben. Sowohl für die Interaktion von L1 mit CD24 (s. 1.3.3) als auch mit NCAM wurde eine Abhängigkeit von Oligosacchariden gezeigt. Die Bindung von L1 und NCAM ist abhängig von oligomannosidischen Zuckerstrukturen (s. 1.1.1.1 und **Abb. 1.1**) des L1, die von einer Bindungsdomäne innerhalb der 4. Ig-Domäne des NCAM erkannt und gebunden werden (Kadmon *et al.*, 1990a; Horstkorte *et al.*, 1993).

Besonders deutlich wird die Bedeutung des L1 für die Integrität des Nervensystems, da Mutationen im L1-Gen beim Menschen zu gravierenden neurologischen Krankheitsbildern, dem sogenannten L1-Syndrom, führen können. Es handelt sich um ein rezessives X-chromosomal gekoppeltes Krankheitsbild, das als Zusammenfassung von zunächst getrennt beschriebenen neurologischen Syndromen, wie HSAS (<u>hydrocephalus as result of stenosis of the aqueduct of Sylvius</u>), MASA (<u>mental retardation, aplasia, shuffling gait, adducted thumbs</u>), SP-

Molekül	Funktionelle Bedeutung der Interaktion mit L1
L1 (homophile Interaktion)	Initiation des L1-abhängigen Neuritenwachstums (Lemmon <i>et al.</i> , 1989) (s. auch Abb. 1.6).
NCAM	Unterstützung der L1-L1-Interaktion (" <i>cis-assisted homophilic binding</i> "), synergistischer Effekt auf L1-abhängige Funktionen (Kadmon <i>et al.</i> , 1990b; Horstkorte <i>et al.</i> , 1993) (s. auch Abb. 1.6).
TAG-1	Interaktion mit L1 führt zu Promotion von Neuritenwachstum und Neuritenfaszikulation, TAG-1 wird als Co-Rezeptor für L1 beschrieben (Kuhn <i>et al.</i> , 1991; Buchstaller <i>et al.</i> , 1996; Kunz <i>et al.</i> , 1998) (s. auch Abb. 1.6).
F3/Contactin	Interaktion mit L1 nachgewiesen (Olive <i>et al.</i> , 1995; Faivre-Sarrailh und Rougon, 1997), funktionelle Bedeutung bisher noch ungeklärt
Phosphacan, Neurocan	Kollaps von Wachstumskegeln (Grumet et al., 1993; Friedlander et al., 1994)
CD24	s. Kapitel 1.3.3
Neuropilin-1	Modulation der Interaktion von L1 und Semaphorin3A (Castellani <i>et al.</i> , 2000 und 2002).
FGF-Rezeptor	Aktivierung des FGF-Rezeptors durch L1-L1-Interaktion führt zu Promotion des Neuritenwachstums (Doherty und Walsh, 1996) (s. auch Abb. 1.6)

Tab. 1.2: Interaktionspartner	des	Zelladhäsionsmoleküls	L1	und	die	funktionelle	Bedeutung	ihrer
Bindung (Haspel und Grumet,	2003	3).						

1 (complicated spastic paraplegia type 1) und ACC (agenesis of corpus callosum), verstanden wird, da ihre gemeinsame Ursache Mutationen im L1 Gen darstellen (Fransen et al., 1995). Bisher sind über 100 verschiedene Mutationen im L1 Gen bekannt, die zu einem sehr variablen und komplexen Krankheitsbild führen können. Neben sehr häufig konsistent auftretender geistiger Unterentwicklung und einem Hydrocephalus werden als weitere Symptome Paraplegie der unteren Extremitäten, Hypoplasie des corticospinalen Traktes und Corpus callosum und/oder angewinkelte Daumen beschrieben, die sehr unterschiedlich ausgeprägt sein können (Weller und Gartner, 2001). Eine konsistente Genotyp-Phänotyp-Korrelation scheint zu fehlen. L1-defiziente Mäuse zeigen interessanterweise ganz ähnliche Defekte und stellen so ein geeignetes Tiermodell für das L1-Syndrom dar. Beschrieben wurden hier lokomotorische Defizite, reduzierte Lernleistungen, eine verringerte Lebensspanne und ein reduziertes Körpergewicht und als morphologische Defekte das Auftreten eines Hydrocephalus/Makrocephalus (in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mäuse) und eine Hypoplasie des corticospinalen Traktes, des Corpus callosum und des Vermis cerebelli (Dahme et *al.*, 1997; Fransen *et al.*, 1998; Kamiguchi *et al.*, 1998; Cohen *et al.*, 1998). Diese beschriebenen Defekte können durch Störungen in der Zellmigration, dem Axonwachstum und –faszikulierung erklärt werden. Außerdem haben einige *in vitro*-Studien gezeigt, dass durch klinisch relevante Mutationen die Bindung einiger Interaktionspartner (De Angelis *et al.*, 1999; De Angelis *et al.*, 2002), das L1-abhängige Neuritenwachstum (Cheng und Lemmon, 2004; Cheng *et al.*, 2005) und/oder die Zelloberflächenlokalisation des L1 (Moulding *et al.*, 2000; Rünker *et al.*, 2003) gestört sein können.

#### 1.3.2 Das Zelladhäsionsmolekül CD24

Das murine Zelladhäsionsmolekül CD24, auch bekannt unter den Bezeichnungen Nectadrin, p31 und <u>heat stable antigen</u> (HSA), ist ein kleines Protein mit nur 27 Aminosäuren (**Abb. 1.7**) und wurde ursprünglich in hämatopoetischen Zellpopulationen, hauptsächlich in B-Lymphozyten und Thymozyten gefunden

 $* \forall \forall \quad * \forall \quad \forall * \forall \forall$ CD24 (Maus)NQTSVAPFPGNQNISASPNPTNATTRG — GPI-Anker

Abb. 1.7: Aminosäuresequenz des murinen CD24 (Kay et al., 1990). Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Peptidkerns (*Swissprot accession number* P24807), mögliche N-Glykosylierungsstellen sind mit einem Stern, mögliche O-Glykosylierungsstellen mit einem Pfeil gekennzeichnet (s. auch 1.1.1.1 und 1.1.1.2).

(Kay *et al.*, 1990; Wenger *et al.*, 1991). Spätere Studien zeigten, dass CD24 auch im Nervensystem exprimiert wird (Rougon *et al.*, 1991; Kadmon *et al.*, 1992). Die Expression von CD24 im Nervensystem der Maus zeigt eine starke räumliche und zeitliche Veränderung im Laufe seiner Entwicklung (Calaora *et al.*, 1996). Auffallend ist seine starke Expression während der Entwicklung des Nervensystems mit einem Maximum zwischen dem embryonalen Tag E17 und dem postnatalen Tag P5 (Nedelec *et al.*, 1992), die anschließend abnimmt. Im adulten Nervensystem ist die Expression von CD24 nur sehr gering und auf Regionen der sekundären Neurogenese (z.B. subventrikulare Zone, Gyrus dentatus des Hippocampus) und den corticospinalen Trakt beschränkt (Calaora *et al.*, 1996). Diese zeitliche und räumliche Expression überlappt mit der Expression

von polysialyliertem NCAM (Calaora *et al.*, 1996). Eine starke Expression von CD24 ist auf postmitotischen Neuronen und wachsenden Axonen zu finden (Nedelec *et al.*, 1992; Shewan *et al.*, 1996; Calaora *et al.*, 1996). In Primärzellkulturen von Kleinhirnneuronen konnte CD24 vorzugsweise an Zellkontakten nachgewiesen werden (Kadmon *et al.*, 1992). Auch auf Astrozyten konnte CD24 detektiert werden (Kuchler *et al.*, 1989; Ennas *et al.*, 1992), dagegen gibt es bisher keine Hinweise auf eine Expression von CD24 auf Oligodendrozyten.

CD24 ist über einen GPI-Anker in der Zellmembran verankert und besitzt zahlreiche N- und O-Glykosylierungsstellen (s. 1.1.1 und Abb. 1.7), so dass der Peptidkern des CD24 sowohl N- als auch O-verknüpfte Zuckerseitenketten trägt (Kay et al., 1990). Durch die sehr hohe Glykosylierung wird der nur kleine Proteinkern mit scheinbaren Molekulargewichten beschrieben, die von 27 – 33 kDa im Nervensystem (Kleene et al., 2001) bis 40 - 70 kDa im Immunsystem *al.*, 1992) reichen. Diese Variationen des (Kadmon et scheinbaren Molekulargewichts des Proteins in den verschiedenen Zelltypen, die CD24 exprimieren, lassen sich durch unterschiedliche zelltypspezifische Glykosylierungsmuster erklären (Kay et al., 1990). Diese Beobachtungen weisen auf eine mögliche wichtige funktionelle Rolle der Glykosylierung des CD24 hin.

Die funktionelle Bedeutung von CD24 ist bisher weitgehend noch ungeklärt. Im Bereich der Immunologie wird CD24 als ein Markerprotein für die Ontogenese von B-Lymphozyten und Thymozyten verwendet (Kay *et al.*, 1990; Wenger *et al.*, 1991). Im Bereich der Onkologie gilt CD24 als ein diagnostischer Tumormarker, da eine Reihe von Tumorarten wie z. B. Ovarialkarzinom, Mamakarzinom und Pankreaskarzinom und auch Tumore des Zentralen Nervensystems eine hohe Expression von CD24 zeigen (Poncet *et al.*, 1996; Kristiansen *et al.*, 2004). Dem Protein wird weiter eine Rolle bei der Zelladhäsion, der Induktion von Apoptose von B-Lymphzyten und der Metastasierung von Tumoren zugesprochen (Kadmon *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; Kristiansen *et al.*, 2004). Im Nervensystem ist die funktionelle Bedeutung des CD24 bisher nicht vollständig aufgeklärt. CD24-defiziente Mäuse zeigen im Gegensatz zu L1-defizienten Mäusen (s. 1.3.1.1) keinen auffälligen Phänotyp in Bezug auf Entwicklung und

Funktion des Nervensystems (unveröffentlichte Ergebnisse). In adulten CD24defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Neurogenese in Regionen der sekundären Neurogenese beobachtet werden (Belvindrah et al., 2002). Vorangegangene Arbeiten haben auch gezeigt, dass CD24 in Abhängigkeit vom Zelltyp das Neuritenwachstum in vitro inhibieren oder fördern kann. Das Auswachsen von Neuriten von postnatalen Kleinhirnneuronen wird gefördert Das Neuritenwachstum (Kleene et al., 2001). von postnatalen Hinterwurzelganglien- oder Retinaganglienneuronen dagegen wird durch CD24 inhibiert, während das Neuritenwachstum von embryonalen Hinterwurzelganglienoder Retinaganglienneuronen nicht beeinflusst wird (Shewan et al., 1996; Kleene et al., 2001). Eine Rolle bei der Vermittlung der Zelladhäsion wurde CD24 auch im Nervensystem zugesprochen (Kadmon et al., 1995). Als ein Bindungspartner für CD24 im Nervensystem ist das Zelladhäsionsmolekül L1 bekannt (Kadmon et al., 1995). Die Interaktion wird in **Kapitel 1.3.3** weiter beschrieben werden.

#### 1.3.3 Die Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24

Frühere Studien haben gezeigt, dass CD24 die Zelladhäsion von Neuronen und B-Lymphozyten und die damit verbundene intrazelluläre Kalziumausschüttung vermittelt, wobei eine Interaktion mit L1 eine wichtige Rolle spielt (Kadmon *et al.*, 1995). Eine Co-Redistribution bzw. Co-Lokalisation von CD24 und L1 und auch NCAM konnte in *co-capping*-Experimenten gezeigt werden (Kadmon *et al.*, 1995). Mit gereinigten Proteinen L1 und CD24 konnte eine direkte Bindung der beiden Zelladhäsionsmoleküle nachgewiesen werden (Kadmon *et al.*, 1995; Sammar *et al.*, 1997). Da CD24 im corticospinalen Trakt exprimiert wird (s. 1.3.2), wäre es möglich, dass die Interaktion von CD24 und L1 in diesem Bereich eine funktionell wichtige Rolle bei der Steuerung der Kreuzung (Decussation) von Axonen spielen könnte, da bei L1-defizienten Mäusen Störungen in der korrekten Wegfindung von Axonen bei der Decussation nachgewiesen werden konnten (Cohen *et al.*, 1998; s. auch 1.3.1.1). Eine sehr ähnliche Bedeutung konnte bereits für die Interaktion des L1 mit Semaphorin3A und Neuropilin-1 gezeigt werden (Castellani *et al.*, 2000).

In einer neuen Studie wurde die L1-CD24-Interaktion und ihre funktionelle Bedeutung in vitro weiter untersucht (Kleene et al., 2001). Hier konnte für die Bindung von L1 und CD24 in Bindungsstudien gezeigt werden, dass die Bindung von der Glykosylierung des CD24 abhängig ist. Terminale Sialinsäuren (s. 1.2.1) des CD24 sind für seine Bindung an L1 essentiell. Im Gehirn der Maus konnten drei unterschiedliche Glykoformen mit scheinbaren Molekulargewichten von 27 kDa, 30 kDa und 33 kDa identifiziert werden, von denen die 30 kDa- und 33 kDa-Glykoformen terminale  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste tragen. Diese beiden Glykoformen konnten mit L1 co-immunpräzipitiert werden und scheinen sich in trans-Position (trans: Moleküle befinden sich auf gegenüberliegenden Membranen verschiedener Zellen) zum L1 zu befinden. Für die kleinste Glykoform hingegen konnte eine Anwesenheit von terminalen Sialinsäuren und eine Co-Immunpräzipitation mit L1 nicht gezeigt werden, außerdem scheint diese Glykoform in *cis*-Position (*cis*: Moleküle befinden sich auf der gleichen Membran in einer Ebene) zum L1 nachweisbar zu sein. Auch die von CD24 induzierten Effekte auf das Neuritenwachstum von postnatalen Kleinhirnneuronen und 1.3.2) Hinterwurzelganglienneuronen (s. sind abhängig von terminalen Sialinsäuren des CD24. Mit Neuraminidase behandeltes CD24, das keine terminalen Sialinsäuren trägt, beeinflusste das Neuritenwachstum der beiden Zelltypen nicht mehr, die Förderung des Neuritenwachstums der Kleinhirnneuronen und die Inhibition der Hinterwurzelganglienneuronen waren nicht mehr zu zeigen. Durch Primärkulturexperimente mit Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen von L1- bzw. CD24-defizienten Mäusen konnte weiter gezeigt werden, dass die CD24-abhängigen Effekte auf das Neuritenwachstum über eine von L1 vermittelte Signaltransduktion erfolgen. Die älteren beschriebenen Befunde sprechen für eine cis-Interaktion von L1 und CD24 (Kadmon et al., 1995), wobei allerdings die neueren Ergebnisse auch auf eine mögliche trans-Interaktion von funktioneller Bedeutung hinweisen (Kleene et *al.*, 2001).

Diese Ergebnisse, die eine große Bedeutung der terminalen Sialinsäuren des CD24 deutlich machen, weisen darauf hin, dass L1 möglicherweise ein sialinsäurebindendes Lektin darstellen kann (Kleene *et al.*, 2001). Spezifische

Seite 22

sialinsäurebindende Lektine sind in der *siglec*-Familie zusammengefasst worden (Kelm und Schauer, 1997; Crocker *et al.*, 1998). Mitglieder dieser Unterfamilie der Ig-Superfamilie sind u.a. Sialoadhesin, CD22, CD33, MAG (s. 1.2.1) und *Schwann cell myelin protein* (Kelm *et al.*, 1996). Für die Mitglieder der *siglec*-Familie konnte die spezifische Sialinsäure-Bindungsstelle innerhalb ihrer aminoterminalen Ig-Domäne um einen hochkonservierten Argininrest, der mit der negativ geladenen Carboxylgruppe der Sialinsäure reagiert, identifiziert werden (Vinson *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1997). Charakteristisch für eine spezifische Bindung von  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren scheint die kurze Aminosäuresequenz YXFR (X steht für eine beliebige Aminosäure) zu sein (**Abb. 1.8**), die auch in der 1. FN-Domäne des



Abb. 1.8: Identifizierung der putativen Sialinsäure-Bindungsstelle und Darstellung einer Konsensussequenz (nach Kleene *et al.*, 2001). Die als Sialinsäure-Bindungsstelle identifizierte Aminosäuresequenz der *siglecs* CD22, MAG, Sialoadhesin (Sn) und CD33 ist gezeigt. MAG, Sialoadhesin und CD33 mit dem Sequenzmotiv YXFR zeigen eine Präferenz,  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren (Neu5Ac) zu binden, während CD22, das  $\alpha$ 2,6-verknüpfte Sialinsäuren bindet, die Sequenz LXFR trägt (Vinson *et al.*, 1996). Sequenzvergleiche zeigen Ähnlichkeiten mit Mitgliedern der L1-Familie innerhalb ihrer 1. FN-Domäne. Hier zeigt sich eine Konsensussequenz mit einem hoch konservierten Argininrest. Die Konsensussequenz beinhaltet eine eingezeichnete  $\beta$ -Faltblattstruktur ( $\beta$ -sheet). Die Nummern zeigen die Positionen der Aminosäuren an. Identische Aminosäuren sind gelb, der konservierte Argininrest blau hinterlegt. *Swissprot accession number* ist in Klammern angegeben.

L1 identifiziert werden konnte (Kleene *et al.*, 2001). Dieses Sequenzmotiv ist zusammen mit flankierenden Aminosäuren innerhalb einer Konsensussequenz bei den Mitgliedern der L1-Familie (auch verschiedener Spezies) konserviert zu finden

(**Abb. 1.8**). Es ist daher möglich, dass dieses Motiv in der 1. FN-Domäne des L1 die Bindungsstelle für die  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren darstellt.

## 1.4 Aufgabenstellung

Für die Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24 und auch einige Zuckerstrukturen werden wichtige Rollen in der Funktion und Entwicklung des Nervensystems beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit soll die sialinsäureabhängige Interaktion der beiden Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24 und ihre funktionelle Bedeutung für das Nervensystem der Maus untersucht werden.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Bindungsstelle der Sialinsäuren des CD24, die sowohl für die Bindung an L1 als auch für das CD24-abhängige Neuritenwachstum essentiell sind, im L1-Molekül lokalisiert und charakterisiert werden. Ebenso sollen die Zuckerseitenketten des aus Maushirn aufgereinigten CD24 untersucht werden. Zum einen sollen die N- und O-verknüpften Glykane charakterisiert und zum anderen auf eine weitere Expression von interessanten Zuckerstrukturen untersucht werden. Anschließend sollen die so näher charakterisierten Glykane des CD24 auf eine funktionelle Bedeutung für das CD24-abhängige Neuritenwachstum Kleinhirnvon und Hinterwurzelganglienneuronen untersucht werden. Eventuell können die dann erhaltenen Ergebnisse auch zur Aufklärung der unterschiedlichen CD24abhängigen Effekte auf das Neuritenwachstum verschiedener neuronaler Zelltypen (Promotion des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen und Inhibition des Neuritenwachstums von Hinterwurzelganglienneuronen) beitragen.

## 2 Material

## 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von den folgenden Firmen bezogen:

- Invitrogen (Karlsruhe)
- Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe)
- VWR (Darmstadt)
- Serva (Heidelberg)
- Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Alle verwendeten Lösungen wurden mit sterilem, deionisiertem Wasser angesetzt.

## 2.2 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

(in alphabetischer Reihenfolge)

HBS	10 mM HEPES	
	150 mM NaCl	pH 7,4
Homogenisierungspuffer	50 mM Tris	pH 7,5
	1 mM CaCl <sub>2</sub>	
	1 mM MgCl <sub>2</sub>	
	0,32 M Saccharose	
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton	
	5 g Hefeextrakt	
	10 g NaCl	

	ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O	pH 7,5			
LB-Agar	wie LB-Medium, zusät	wie LB-Medium, zusätzlich			
	1 % (w/v) Agar				
PBS	8 g NaCl				
	0,2 g KCl				
	1,15 g Na₂HPO₄				
	0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				
	ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O	pH 7,4			
PBST	PBS				
	0,1 % Tween-20				
Resuspendierungspuffer A	50 mM Tris/HCI	pH 7,4			
	1 mM CaCl <sub>2</sub>				
	1 mM MgCl <sub>2</sub>				
Resuspendierungspuffer B	50 mM Tris/HCI	pH 7,4			
	1 mM CaCl <sub>2</sub>				
	1 mM MgCl <sub>2</sub>				
	0,1 % Triton X-100				
Ripa-Puffer	50 mM Tris				
	150 mM NaCl	pH 7,4			
	1 mM EDTA				
	1 % NP-40				
SDS-Probenpuffer	100 mM Tris/HCl	pH 6,8			
(4 x Laemmli-Puffer)	4 % (w/v) SDS				

	20 % Glycerol	
	0,0005 % (w/v) Bromp	henolblau
	+ 4 % (w/v) DTT	
TBS	50 mM Tris	
	150 mM NaCl	pH 7,4
TBST	TBS	
	0,05 % Tween-20	

#### 2.3 Zelllinien

Die folgende Tabelle 2.1 zeigt die verwendeten Zelllinien und ihre Charakteristika.

Zelllinie			Eigenschaften		Referenz
<u>C</u> hinese	<u>h</u> amster	<u>o</u> vary	Dehydrofolatreduktase	defiziente	ATCC CRL-9096 (Stanley
(CHO)			Hamsterzelllinie		und Siminovitch, 1977)
CHO-TAX			TAX-exprimierende, stabil	transfizierte	(Pavlou <i>et al.</i> , 2002)
			CHO-Zelllinie		
			Neomycin-Resistenz		
79-Hybridomazelllinie			anti-CD24-Antikörper 79 pro	oduzierende	(Kadmon <i>et al.</i> , 1992)
			Hybridomazelllinie		

#### Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften

Die stabil transfizierte, TAX (humanes Homolog zu TAG-1 der Maus) exprimierende CHO-Zelllinie wurde uns mit freundlicher Unterstützung von Dr. Domna Karagogeos (Institute of Molecular and Biotechnology, Heraklion, Greece) zur Verfügung gestellt. Transient transfizierte Zellen der CHO-Zelllinie, die F3/Contactin oder NCAM 120 exprimierten, wurden freundlicherweise von Nainesh Katagihallimath zur Verfügung gestellt. Die Antikörper-produzierende Hybridomazelllinie (mAk79, gerichtet gegen CD24) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Peter Altevogt (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

### 2.4 E. coli-Stämme

Eine Übersicht über die verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften gibt die **Tabelle 2.2**.

Tab. 2.2: Verwendete E. coli-Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp und relevanter Phänotyp	Herkunft / Referenz	
E. coli BL21(DE3)	$F^{-}$ , <i>omp</i> T, hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Novagen, Bad Soden	
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F`, proAB, lac <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tn10 (Tet <sup>I</sup> )]	Stratagene, La Jolla, USA	

### 2.5 Plasmide

Das den Expressionskonstrukten (s. 2.6) zugrunde liegende Plasmid und seine Eigenschaften sind in der folgenden **Tabelle 2.3** zu entnehmen.

Tab. 2.3: Verwendetes Plasmid und seine Eigenschaften

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pET31F1P (2731 bp)	Ampicillinresistenz	(Appel <i>et al.</i> , 1993)
accession number: X 62498	T7 Promoter	
# 2.6 Expressionskonstrukte

(Appel et al., 1993)

Eine Übersicht über die verwendeten Expressionskonstrukte des L1 der Maus gibt die folgende Tabelle (s. **Tab. 2.4**).

Insert	Spezies	Klonierungs-	Klonierungs-	Größe des	Kodierende Region im
		stelle (5`)	stelle (3`)	Inserts	L1-Molekül
lg I-VI	Maus	Bam HI	Bam HI	1855 bp	Aminosäuren 44-661
				(bp 62 – 1981)	
FN 1-5	Maus	Bam HI	Bam HI	1386 bp	Aminosäuren 631-1093
				(bp 1888 – 3274)	
FN 1-2	Maus	Bam HI	Bam HI	611 bp	Aminosäuren 631-826
				(bp 1888 – 2499)	
FN 1-2m	Maus	Bam HI	Bam HI	611 bp	Aminosäuren 631-826
				(bp 1888 – 2499)	Mutation R687A
FN 3-5	Maus	Bam HI	Bam HI	775 bp	Aminosäuren 828-1093
				(bp 2499 – 3274)	

Tab. 2.4: Verwendete Expressionskonstrukte und ihre Charakteristika

Die verwendeten Konstrukte für die L1-Proteinfragmente Ig I-VI, FN 1-5, FN 1-2 und FN 3-5 standen als Plasmide am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg zur Verfügung.

Das L1-Proteinfragment mit der Bezeichnung FN 1-2m wurde durch gerichtete Mutagenese hergestellt, die in **Kapitel 3.2.8** beschrieben wird.

# 2.7 Antibiotika

Als Antibiotikum wurde Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml verwendet.

Die Antibiotika wurden den Nährmedien vor Gebrauch aus steril filtrierten Stocklösungen zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Antibiotika dem Medium nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 40°C zugefügt.

# 2.8 Antikörper

## 2.8.1 Primäre Antikörper

Eine Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und ihre Charakteristika gibt die **Tabelle 2.5**.

Bezeichnung	Spezies	Epitop	Referenz
L1	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von murinem L1- Fc	Labor von M.Schachner
L1 555	Ratte	extrazelluläre Domäne von murinem L1, Aminosäuresequenz zwischen der 2. und 3. FN-Domäne	(Appel <i>et al.</i> , 1995)
79	Ratte	Peptidkern des murinen Glykoproteins CD24, C-terminale Region des Peptids	(Kadmon <i>et al.</i> , 1992)
F3	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von murinem F3	Labor von M.Schachner
TG-1	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von TAG-1 (Ratte)	(Dodd <i>et al.</i> , 1988)
L3	Ratte	oligomannosidische Zuckerstrukturen (N-glykosidisch gebunden)	(Schmitz <i>et al.</i> , 1993)
L4	Ratte	oligomannosidische Zuckerstrukturen (N-glykosidisch gebunden)	(Schmitz <i>et al</i> ., 1993)
L5	Ratte	Lewis <sup>x</sup> -Epitop	(Streit <i>et al.</i> , 1996)
412	Ratte	HNK-1-Epitop	(Kruse <i>et al.</i> , 1984)
NCAM 2B2	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von NCAM	(Kadmon <i>et al.</i> , 1990a)

#### Tab. 2.5: Verwendete Primärantikörper und ihre Charakteristika

Der polyklonale Antikörper gerichtet gegen TAG-1 wurde uns mit freundlicher Unterstützung von Dr. Domna Karagogeos (Institute of Molecular and Biotechnology, Heraklion, Greece) zur Verfügung gestellt.

## 2.8.2 Sekundäre Antikörper

Die Sekundärantikörper für die Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) und für ELISA-Experimente (s. 3.1.12) wurden von Dianova (Hamburg) bezogen.

Die verwendeten Antikörper sind mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horse<u>r</u>adish-<u>p</u>eroxidase*, HRP) gekoppelt und in einer Verdünnung von 1:10000 im Immunoblot und 1:5000 in ELISA-Experimenten eingesetzt.

# 2.9 Peptide

Alle aufgeführten Peptide wurden von Schafer-N (Kopenhagen, Dänemark) bezogen.

Eine Übersicht über die verwendeten Peptide gibt die Tabelle 2.6.

Die Peptide mit den Bezeichnungen Siabind und Siabind2 stellen Aminosäuresequenzen der 1. Fibronektindomäne des L1-Moleküls dar. Die Sequenz des Peptids Siabind präsentiert die  $\beta$ -Faltblattstruktur mit der angenommenen Bindungsstelle der  $\alpha$ 2,3-verknüpften terminalen Sialinsäurereste, die Peptide mit der Bezeichnung Siabind2 präsentieren zusätzlich noch weitere flankierende Aminosäuren. Durch die Derivatisierung mit einer Biotingruppe konnten die Peptide über ihre Bindung von Streptavidin nachgewiesen werden.

Das Peptid mit der Bezeichnung 5743 wurde von Dr. J. Franke am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg entwickelt. Es handelt sich um ein L-Fucose-Replika-Peptid.

Als Kontrollen dienten *scrambled*-Peptide mit einer willkürlichen Aminosäuresequenz.

Tab. 2.6: Verwendete Peptide und ihre Aminosäuresequenzen. Die für die spezifische Bindung von  $\alpha 2,3$ -verknüpften terminalen Sialinsäure charakteristische Aminosäuresequenz ist fett unterlegt.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
Siabind	H-LSPYVH <b>YTFR</b> VTAINKYG-OH
Siabind2	H-TSTTLKLSPYVH <b>YTFR</b> VTAINKYGPGEPSPVSESC-OH
Siabind2-biotinyliert	$\texttt{Biotin-TSTTLKLSPYVH \textbf{YTFR}VTAINKYGPGEPSPVSESC-NH_2}$
Siabind2-biotinyliert scrambled	$\verb Biotin-LEKNSHYSIPTSLRGTPAYEGVFTSPTVSKYVPTC-NH_2 $
5743	H-SSAWWSYWPPVAC-OH
5743 scrambled	H-VWPYSASWPSAWC-OH

# 2.10 Zucker

Alle verwendeten Zucker wurden von der Firma Dextra Laboratories LTD (Reading, UK) bezogen.

Die folgende Tabelle 2.7 zeigt die verwendeten Zucker.

Tab. 2.7: Verwendete Zucker und ihre Strukturen. Die Verknüpfungen der Monosaccharide sind fett dargestellt.

Name	Struktur
N-Acetyl-Neuraminsäure	Neu5Ac
N-Acetyllactosamin	Gal <b>β1-4</b> GlcNAc
3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin	Neu5Ac <b>α2-3</b> Gal <b>β1-4</b> GlcNAc
6'-Sialyl-N-Acetyllactosamin	Neu5Ac <b>α2-6</b> Gal <b>β1-4</b> GlcNAc
LS-Tetrasaccharid a	Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
LS-Tetrasaccharid b	Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc
Lewis <sup>a</sup>	Gal <b>β1-3(α4-1</b> Fuc)GlcNAc
Lewis <sup>x</sup>	Gal <b>β1-4</b> ( <b>α3-1</b> Fuc)GlcNAc

Name	Struktur
Lewis <sup>x</sup> -BSA	Lewis <sup>x</sup> -3Atom spacer-NH-Lysin-BSA
N-Acetyllactosamin-BSA	Gal <b>β1-4</b> GlcNAc-3Atom spacer-NH-Lysin-BSA
3´-Sialyl-N-Acetyllactosamin- BSA	Neu5Ac <b>α2-3</b> Gal <b>β1-4</b> GlcNAc-3Atom spacer-NH-Lysin-BSA

# 3 Methoden

# 3.1 Biochemische Methoden

## 3.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

## (Laemmli, 1970)

Zur Analyse und Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinen und Proteingemischen wurden diese eindimensional in SDS-Polyacrylamidgelen in Mini-Protean III Elektrophoresekammern (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers elektrophoretisch aufgetrennt.

Es wurden SDS-Polyacrylamidgele von 1 mm Dicke und einer Laufstrecke von ungefähr 0,5 cm im Sammelgel und 5 cm im Trenngel verwendet. Die Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen zeigt **Tabelle 3.1**. Es wurden 5 %ige Sammelgele und 10 %ige, 12,5 %ige oder 15 %ige Trenngele verwendet.

	Sammelgel	Trenngel	Trenngel	Trenngel
	5 %	10 %	12,5 %	15 %
30 % Polyacrylamid	0,83 ml	2,665 ml	3,335 ml	4 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	0,625 ml			
2 M Tris/HCl pH 8,8		1,49 ml	1,49 ml	1,49 ml
10 % SDS in $dH_2O$	50 µl	80 µl	80 µl	80 µl
dH <sub>2</sub> O	3,45 ml	3,74 ml	3,1 ml	2,4 ml
TEMED	5 µl	4 µl	4 µl	4 µl
10 % APS in $dH_2O$	40 µl	24 µl	24 μl	24 µl
Gesamtvolumen	5 ml	8 ml	8 ml	8 ml

#### Tab. 3.1: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen

Die zu analysierenden Proben wurden zuerst mit SDS-Probenpuffer (s. 2.2) versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Sie wurden zusammen mit einem Proteinmarker (*BenchMark<sup>TM</sup> Pre-stained Protein Ladder*, Invitrogen, Karlsruhe) als Größenvergleich auf das Gel aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS in dH<sub>2</sub>O) bei konstanter Spannung durchgeführt; zunächst für das Sammelgel bei 80 V, nach dem Übergang der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 130 V erhöht.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung können die Proteine direkt in dem SDS-Polyacrylamidgel mit Hilfe der Silberfärbung (s. 3.1.2) oder der Coomassie-Färbung (s. 3.1.3) angefärbt oder durch Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) spezifisch durch einen Antikörper nachgewiesen werden.

## 3.1.2 Silberfärbungen von SDS-Polyacrylamidgelen

## 3.1.2.1 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

(Heukeshoven und Dernick, 1988)

Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel (s. 3.1.1) für mindestens 30 min bei RT in Fixierungslösung (300 ml Ethanol, 100 ml Essigsäure, ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O) und daran anschließend 30 min bei RT oder ü.N. bei 4°C in der Inkubationslösung (75 ml Ethanol, 17 g Natriumacetat, 1,25 ml Glutaraldehyd (25 % w/v), 0,5 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, ad 250 ml dH<sub>2</sub>O) inkubiert. Alle Inkubations- und Waschschritte erfolgten unter leichtem Schütteln. Das Gel wurde dann dreimal für jeweils 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend für 20 min in der Silberlösung (0,5 g AgNO<sub>3</sub>, 50 µl Formaldehyd (37 % w/v)\*, ad 250 ml dH<sub>2</sub>O) inkubiert. Nach einem kurzen Waschschritt mit Wasser wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch Inkubation des Gels in der Entwicklungslösung (7,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 30 µl Formaldehyd (37 % w/v)\*, ad 300 ml dH<sub>2</sub>O, pH < 11,5) angefärbt. Die Reaktion dauerte in der Regel 5 – 10 min, während dieser Zeit wurde die Entwicklungslösung ausgetauscht. Die Reaktion wurde durch Austausch der

Entwicklungslösung durch die Stop-Lösung (1 % Glycin in dH<sub>2</sub>O) beendet. Anschließend wurde das Gel noch mehrmals mit Wasser gewaschen und aufbewahrt.

Für eine langfristige Aufbewahrung der Gele wurden diese in einem Geltrockner (GelAir Dryer, BioRad, München) nach Angaben des Herstellers zwischen Cellophanfolien getrocknet.

\* erst kurz vor Gebrauch zugeben

## 3.1.2.2 Silberfärbung nach Shevchenko

(Shevchenko et al., 1996)

Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel (s. 3.1.1) für 30 min in Fixierungslösung (50 ml Methanol, 5 ml Essigsäure, ad 100 ml dH<sub>2</sub>O) unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Alle weiteren Inkubations- und Waschschritte erfolgten bei RT unter leichtem Schütteln. Nach zwei kurzen Waschschritten (jeweils 2 min) mit Wasser wurde das Gel eine Stunde in Wasser gewaschen, anschließend 1 min in Sensibilisierungslösung (0,02 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O in dH<sub>2</sub>O) inkubiert und dann zweimal kurz mit Wasser gewaschen. Es folgte eine Inkubation des Gels in kalter Silberlösung (0,1 % AgNO<sub>3</sub> in dH<sub>2</sub>O) für 30 min bei 4°C. Danach wurde das Gel wiederum zweimal kurz mit Wasser gewaschen und in Entwicklungslösung (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in dH<sub>2</sub>O, 0,04 % Formaldehyd\*) so lange inkubiert bis die aufgetrennten Proteine im Gel sichtbar wurden. Die Entwicklungslösung wurde dabei 2 – 3 mal ausgetauscht, sobald die Lösung gelblich wurde. Zum Abstoppen der Anfärbung der Proteinbanden wurde die Entwicklungslösung entfernt und das Gel in 1 % Essigsäure inkubiert. In dieser Lösung wurde das Gel auch bei 4°C aufbewahrt.

Trocknung und Aufbewahrung der Gele s. 3.1.2.1

\* erst kurz vor Gebrauch zugeben

# 3.1.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel (s. 3.1.1) für mindestens 2 h oder bis eine hinreichende Färbung des Gels erreicht ist, in Coomassie Blau Lösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blau, 250 ml Ethanol, 50 ml Essigsäure, ad 500 ml dH<sub>2</sub>O) bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gel für mehrere Stunden in Entfärberlösung (350 ml Ethanol, 50 ml Essigsäure, ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O) bei RT wieder entfärbt, bis die angefärbten Proteinbanden im Gel gut sichtbar waren.

Trocknen und Aufbewahrung der Gele s. 3.1.2.1

# 3.1.4 Immunoblot-Analyse (Western blot)

(Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)

# 3.1.4.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

(Towbin *et al.*, 1979)

Bei der Immunoblot-Analyse werden die durch SDS-PAGE (s. 3.1.1) aufgetrennten Proteine nach der Gelelektrophorese auf eine Membran (Nitrocellulose bzw. PVDF) transferiert.

Für diesen elektrophoretischen Transfer der Proteine von SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (Protan® Nitrocellulosemembran BA 85, 0,45 μm, Schleicher & Schuell, Dassel) wurden MINI TRANSBLOT Apparaturen (BioRad, München) verwendet. Das Transfersandwich aus drei Gel-Blotting-Papieren (Schleicher & Schuell, Dassel), dem SDS-Gel, der Nitrocellulose-Membran und wieder drei Gel-Blotting-Papieren wurde nach Angaben des Herstellers unter Blotpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin in dH<sub>2</sub>O) zusammengebaut, wobei auch alle Bestandteile des Transfersandwiches zuvor in Blotpuffer eingeweicht wurden. Das Transfersandwich wurde gemäß den Angaben des Herstellers in die mit Blotpuffer gefüllte Blottingapparatur zusammen mit einer Eiskühlung eingesetzt.

Der Transfer wurde dann für 2 h bei einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt.

# 3.1.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

## (Ausubel et al., 1996)

Anschließend an den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen für eine Stunde bei RT in Blockierungslösung (4 % Magermilchpulver in PBST (s. 2.2)) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (verdünnt in Blockierungslösung) entweder für eine Stunde bei RT oder ü.N. bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle weiteren Inkubations und Waschschritte wurden bei RT durchgeführt. Nach vier Waschschritten à 10 min mit PBST wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Nach vier weiteren Waschschritten mit PBST à 10 min wurde die Nachweisreaktion (s. 3.1.4.3) angeschlossen.

Die verwendeten Primärantikörper sind der **Tabelle 3.2** zu entnehmen. Alle verwendeten Sekundärantikörper (s.2.8.2) wurden hier in einer Verdünnung von 1:10000 in PBST eingesetzt.

Bezeichnung	Spezies	Epitop	Eingesetzte Verdünnung
L1	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von murinem L1-Fc	1:4000
L1 555	Ratte	extrazelluläre Domäne von murinem L1, Aminosäuresequenz zwischen der 2. und 3. Fibronektindomäne	1:1000
79	Ratte	Peptidkern des Glykoproteins CD24, C- terminale Region des Peptids	0,5 μg/ml
F3	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von murinem F3	1:5000
TG-1	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von TAG-1 (Ratte)	1:5000

Tah	2 2.	Financotzto	Drimärant	tikörnor un/	1 ihra	Charaktoristi	ika
Tap.	J.Z.	Eingeseizie	Filliaran	ukorper und	, inne	Charakterist	Na

Bezeichnung	Spezies	Epitop	Eingesetzte Verdünnung
L3	Ratte	oligomannosidische Zuckerstrukturen	1:10
L4	Ratte	oligomannosidische Zuckerstrukturen	1:10
L5	Ratte	Lewis <sup>x</sup> -Epitop	1:100
412	Ratte	HNK-1-Struktur	10 µg/ml
NCAM 2B2	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von murinem NCAM	1:5000

## 3.1.4.3 Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz

Die Nachweisreaktion erfolgte über das an die verwendeten Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (<u>horseradish-peroxidase</u>, HRP), das chemilumineszente Substrate umsetzen kann.

Für die Nachweisreaktion wurden die Reagenzien *ECL<sup>™</sup> Western Blotting detection reagents* der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bzw. *Super Signal® West Dura Extended Duration Substrate* der Firma Perbio (Bonn) verwendet. Die enthaltenen Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Nitrocellulose-Membran gegeben und für 1 min inkubiert. Danach wurde die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Filmkassette gelegt. Die Auswertung erfolgte durch Belichtung eines Röntgenfilms (Kodak® BioMax Light Film, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) über verschiedene Zeiträume.

## 3.1.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen (BCA-Test)

(Smith et al., 1985)

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das *BCA Protein Assay Reagent Kit* (Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich) verwendet.

Die BCA-Lösung wurde aus den Reagenzien A und B hergestellt, die im Verhältnis 50+1 kurz vor Gebrauch gemischt wurden. Es wurden 10 µl der zu bestimmenden Probe mit 200 µl der BCA-Lösung in *96-well* Mikrotiter-Platten (Nunc-Immunomodule Maxisorb, Nunc, Roskilde, Dänemark) gemischt und bei

37°C für 30 min inkubiert. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Extinktion bei 560 nm gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen wurde zusammen mit den Proben eine Standardreihe mit BSA (0, 50, 100, 200, 500, 1000 und 2000 µg/ml BSA) wie beschrieben analysiert. Mittels dieser Standardreihe wurde durch lineare Regression anhand der gemessenen Extinktionswerte der Proben die jeweilige Proteinkonzentration ermittelt.

## 3.1.6 Proteinfällung nach Wessel

(Wessel und Flugge, 1984)

Die zu fällende Proteinlösung wurde mit vier Volumina Methanol und einem Volumen Chloroform versetzt und gut gemischt. Nach einer weiteren Zugabe von drei Volumina Wasser wurde wiederum gut gemischt und bei 13000 x g für 3 min zentrifugiert. Die methanollösliche obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne die Protein-enthaltende Interphase zu stören. Nach Zugabe von wiederum drei Volumina Methanol wurde der Ansatz gemischt und erneut bei 13000 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Protein-Sediment an der Luft getrocknet, in SDS-Probenpuffer (s. 2.2) aufgenommen und mittels der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) untersucht.

# 3.1.7 Aufreinigung monoklonaler Antikörper über Protein G

Monoklonale Antikörper können über Affinitätschromatographie durch ihre Bindung an Protein G aufgereinigt werden.

Für die Affinitätschromatographie wurde eine Säule mit *Protein G Sepharose 4 fast flow* (Amersham Biosciences, Freiburg) gepackt und verwendet. Diese wurde an eine Pumpe (Econo Pump) und Detektor (Econo UV Monitor) der Firma BioRad (München) angeschlossen.

Zunächst wurde die Protein G Säule mit zehn Gelvolumina PBS (s. 2.2) bei einer Flussrate von 0,25 - 0,5 ml/min gespült. Das steril filtrierte, Antikörper enthaltende Zellkulturmedium (s. 3.3.1.3) wurde mit einer Flussrate von 0,1 - 0,33 ml/min auf

die Protein G Säule gegeben. Um unspezifische Bindungen an die Säulenmatrix zu verhindern wurde danach mit 2 – 5 Gelvolumina PBS gewaschen. An diesen Waschschritt schloss sich die Elution des gebundenen Antikörpers an. Der Antikörper wurde mit Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 2,7 – 3,0) bei einer Flussrate von 0,25 ml/min von der Protein G Säule eluiert, wobei das Eluat sofort mit 1 M Tris/HCl, pH 8,8 neutralisiert wurde. Nach der Elution schlossen sich Waschschritte mit mindestens zehn Gelvolumina PBS und fünf Gelvolumina PBS mit 0,01 % Natriumazid an. Das Eluat wurde unter der Verwendung von Vivaspin Concentrators (Vivascience AG, Hannover) auf PBS umgepuffert und aufkonzentriert, anschließend durch Silberfärbung (s. 3.1.2) und Immunoblot-3.1.4) auf enthaltenen Antikörper überprüft Analyse (s. und die Proteinkonzentration bestimmt (s. 3.1.5).

## 3.1.8 Kopplung von Liganden an CNBr-aktivierte Sepharose 4B

Liganden wie der monoklonale Antikörper 79 (s. 2.8.1) wurden an CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gekoppelt und aufbewahrt.

## 3.1.9 Aufreinigung von CD24 aus Maushirn

## (Kleene et al., 2001)

Für die Aufreinigung von CD24 wurden eingefrorene Mausgehirne von 2 – 10 Tage alten Wildtyp-Mäusen des Stammes C57BL/6J auf Eis aufgetaut. Jeweils zwei Gehirne wurden in 3 ml eiskaltem Aceton (-20°C) in einem 10 ml Glashomogenisator durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Die Gewebesuspension wurde mit Hilfe eines G3 Glasfilters (VWR, Darmstadt) unter Vakuum filtriert. Der Rückstand wurde anschließend erneut in eiskaltem Aceton im Glashomogenisator homogenisiert und filtriert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das gewonnene Aceton-Gewebepulver wurde zweimal in 25 ml HBS (s. 2.2) für 15 min auf einem *headover-tail*-Rotor inkubiert und für 15 min bei 20000 x g zentrifugiert. Der so

gewaschene Rückstand wurde anschließend in 50 ml Inkubationspuffer (0,5 % Deoxycholsäure, 0,1 mM PMSF in HBS, pH 7,9) erneut homogenisiert und ü.N. auf einem head-over-tail-Rotor inkubiert. An diese Inkubation schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 100000 x g für 60 min an. Der Überstand wurde mit dem gegen CD24 gerichteten Antikörper mAk79 (s. 2.8.1), gekoppelt an CNBraktivierte Sepharose 4B (s. 3.1.8), wiederum ü.N. auf einem head-over-tail-Rotor inkubiert. Der Überstand wurde dann abgenommen und die Sepharose mit ca. zehn Gelvolumina Puffer A (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4, 2 % Triton X-100) und danach zehn Gelvolumina Puffer B (10 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,4, 0,1 % Triton X-100) jeweils in mindestens drei Schritten und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 200 - 500 x g gewaschen. Mit insgesamt 50 ml HBS wurde die Sepharose dann in eine 5 ml Säule (BioRad, München) überführt und an eine Pumpe (Econo Pump) und Detektor (Econo UV Monitor) der Firma BioRad (München) angeschlossen. Das an den Antikörper gebundene CD24 wurde mit Puffer C (50 mM Ethanolamin, 150 mM NaCl, pH 11,5, 0,2 % CHAPS) bei einer Flussrate von 0.25 ml/min in mehreren Fraktionen eluiert. Die Eluate wurden sofort mit 1 M Tris/HCl, pH 6,7 neutralisiert und mittels Silberfärbung (s. 3.1.2) und Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) auf CD24 überprüft. Die CD24 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert und umgepuffert auf TBS (s. 2.2) mit 0,2 % CHAPS mit Hilfe von Vivaspin Concentrators (Vivascience AG, Hannover). Die endgültige Probe CD24 wurde erneut mittels Silberfärbung und Immunoblot-Analyse überprüft.

# 3.1.10 Rekombinante Expression von L1-Proteinfragmenten in E. coli

# (Appel et al., 1993)

Chemokompetente Bakterien des *E. coli*-Stammes BL21 (DE3) (s. 2.4) wurden jeweils mit der Plasmid-DNS für die L1-Proteinfragmente FN 1-5, FN 3-5, Ig I-VI, FN 1-2 und FN 1-2m (s. 2.6) transformiert (s. 3.2.3). Nach der Kultivierung der LB-Platten ü.N. wurden am folgenden Tag positive Einzelkolonien für jedes L1-Proteinfragment gepickt und von den Agarplatten in 3 ml Flüssigkulturen mit LB-Medium (s. 2.2) mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin überimpft. Die Inkubation der

angeimpften Flüssigkulturen erfolgte bei 37°C und 225 rpm ü.N. in einem Schüttelinkubator. Von den angewachsenen Flüssigkulturen wurde am wiederum folgenden Tag 1 ml in eine 250 ml Flüssigkultur mit LB-Medium mit Ampicillin überimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Protein-Synthese durch Zugabe von 125 µl 1 M IPTG-Lösung (in dH<sub>2</sub>O, steril filtriert) induziert und die Kulturen weitere vier Stunden bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation der Kulturen bei 5000 x g und 4°C für 15 min wurden die sedimentierten Bakterien in jeweils 10 ml PBS (s. 2.2) resuspendiert und auf Eis für 3 min mit Ultraschall behandelt. Die rekombinanten Proteine wurden anschließend durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 10000 x g und 4°C für 10 min als inclusion bodies sedimentiert und in PBS aufgenommen. Diese Proben wurden auf Expression des jeweiligen L1-Proteinfragmentes mit Hilfe einer Coomassie-Färbung (s. 3.1.3) oder Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) überprüft. Diese Proben der L1-Proteinfragmente wurden dann aufgereinigt (s. 3.1.11).

## 3.1.11 Aufreinigung der rekombinanten L1-Proteinfragmente

Die rekombinanten L1-Proteinfragmente wurden durch Elektroelution aufgereinigt.

Die Proben der L1-Proteinfragmente (*inclusion bodies*) (s. 3.1.10) wurden zunächst jeweils eindimensional in präparativen SDS-Polyacrylamidgelen in Protean® II xi Elektrophoresekammern (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers elektrophoretisch aufgetrennt (s. auch 3.1.1). Es wurden jeweils 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die jeweilige Probe (entsprechend 2 mg Gesamtprotein) wurde mit SDS-Probenpuffer (s. 2.2) gemischt und ohne Aufkochen auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei konstanter Stromstärke von 40 mA, dann bei einer konstanten Spannung von 130 V – 150 V durchgeführt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im *Whole Gel Eluter* der Firma BioRad (München) nach Angaben des Herstellers aus dem SDS-Polyacrylamidgel eluiert. Der *Whole Gel Eluter* wurde nach Angaben des Herstellers zusammengebaut, die Kammern wurden mit Elutionspuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin in dH<sub>2</sub>O) gefüllt.

Die Elution der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel wurde bei einer konstanten Stromstärke von 225 mA für 25 min durchgeführt. Nach einer Umpolung der Spannungsquelle für 20 s, um eine Adhäsion der eluierten Proteine an der Cellophanfolie zu vermeiden, konnten die Fraktionen aus der Elutionskammer mit Hilfe der Absaugvorrichtung nach Angaben des Herstellers unter Vakuum abgesaugt und gesammelt werden. Diese Fraktionen wurden anschließend mittels Silberfärbung (s. 3.1.2) und Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) auf das jeweilige L1-Proteinfragment überprüft. Die das entsprechende L1-Proteinfragment enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert und umgepuffert mit Hilfe von Vivaspin Concentrators (Vivascience AG, Hannover). Für die verschiedenen L1-Proteinfragmente wurden hier unterschiedliche Puffer verwendet: Für die L1-Proteinfragmente Ig I-VI und FN 1-5 wurde 20 mM Tris/HCI, pH 8,5 verwendet, für das Fragment FN 3-5 20 mM Essigsäure, pH 5,5, und für die L1-Proteinfragmente FN 1-2 und FN 1-2m PBS (s. 2.2). Die endgültigen Proben der L1-Proteinfragmente FN 1-5, FN 1-2, FN 1-2m, FN 3-5 und Ig I-VI wurden erneut mittels Silberfärbung überprüft und die Proteinkonzentration bestimmt (s. 3.1.5).

# 3.1.12 <u>Enzyme-Linked Immunos</u>orbent <u>Assay</u> (ELISA)

## (Kleene et al., 2001)

Aus Mausgehirn aufgereinigtes CD24 (s. 3.1.9) oder N-deglykosyliertes CD24 (s. 3.1.13.1) wurden auf der Polyvinylchlorid-beschichteten Oberfläche von *96-well* Mikrotiter-Platten (Nunc-Immunomodule Maxisorb, Nunc, Roskilde, Dänemark) beschichtet. Dazu wurden die Proteine in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml, verdünnt in TBS (s. 2.2) oder dH<sub>2</sub>O, ü.N bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert (50  $\mu$ l/*well*). Als Negativkontrolle diente TBS bzw. dH<sub>2</sub>O. Alle beschriebenen Waschschritte wurden mit 100  $\mu$ l/*well* und alle Inkubationsschritte mit 50  $\mu$ l/*well* durchgeführt. Nicht gebundenes CD24 wurde in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit TBS entfernt. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungen durch eine Inkubation mit Blockierungslösung (1 % BSA in TBS) (100  $\mu$ l/*well*) für 60 min bei RT auf einem Schüttler abgesättigt. Nach drei

Waschschritten mit TBST (s. 2.2) wurde das immobilisierte CD24 mit verschiedenen Konzentrationen der potentiellen Bindungspartner, L1 Proteinfragmente (s. 3.1.10 und 3.1.11) bzw. L1-Peptide (s. 2.9), für 2 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Bindungspartner wurden in Puffer A (1 % BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> in TBST) gelöst. Nach dieser Inkubation wurden die Platten erneut dreimal mit TBST gewaschen.

Der Nachweis der Bindung der putativen Bindungspartner an immobilisiertes CD24 wird im Folgenden beschrieben. Im Falle der L1-Proteinfragmente wurde der polyklonale anti-L1-Antikörper (s. 2.8.1) in einer Verdünnung von 1:2000 in Puffer A verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden die Platten fünfmal mit TBST gewaschen und eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (s. 2.8.2) in einer Verdünnung von 1:5000 in Puffer A angeschlossen. Im Falle der biotinylierten L1-Peptide wurden die Platten nach der Inkubation mit den L1-Peptiden und fünf Waschschritten mit TBST mit Streptavidin-HRP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Verdünnung von 1:10000 in Puffer A für 60 min inkubiert. In beiden Fällen wurden die Platten anschließend dreimal mit TBST und einmal mit TBS gewaschen.

Der Nachweis des gebundenen Anteils der putativen Bindungspartner erfolgte mit Hilfe einer durch die Meerrettich-Peroxidase (<u>horseradish-peroxidase</u>, HRP) katalysierten Farbreaktion. Das Enzym HRP setzt das ABTS in der Färbelösung\* (250  $\mu$ l 2 % ABTS (in dH<sub>2</sub>O), 3,5  $\mu$ l 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4,75 ml 0,1 M Natriumacetat, pH 5,0) in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um, so dass eine Farbvertiefung entsteht. Die Absorption des Farbstoffs wurde abhängig von der Intensität nach verschiedenen Zeitpunkten bei 405 nm im ELISA-Reader (Micronaut Skan, Labsystems, Finnland) gemessen. Die Farbintensität korreliert mit dem gebundenen Teil des Bindungspartners.

Für die Spezifität der zuckerabhängigen Interaktion zwischen CD24 und L1 wurden Bindungsexperimente in An- und Abwesenheit von putativ kompetitiven Zuckerstrukturen (s. **Tab. 3.3**) durchgeführt. Hier wurde das L1-Proteinfragment FN 1-2 in einer konstanten Konzentration von 50 nM zunächst mit verschiedenen Konzentrationen der Zucker bei RT 2 h inkubiert; sowohl das L1-Proteinfragment

als auch die Zucker wurden in Puffer B (1 % BSA, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> in TBS) verdünnt. Anschließend wurden diese Ansätze mit immobilisiertem CD24 wie beschrieben inkubiert und weiterbearbeitet. Allerdings wurden alle Waschschritte bei diesen Kompetitionsexperimenten mit TBS durchgeführt.

\* frisch vor Gebrauch ansetzen

Name	Struktur	Eingesetzte
		Konzentrationen
		[mM]
Neuraminsäure	Neu5Ac	0,2
		0,5
		1,0
N-Acetyllactosamin	Gal <b>β1-4</b> GlcNAc	0,2
		0,5
		1,0
3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin	Neu5Ac <b>α2-3</b> Gal <b>β1-4</b> GlcNAc	0,2
		0,5
		1,0
6´-Sialyl-N-Acetyllactosamin	Neu5Ac <b>α2-6</b> Gal <b>β1-4</b> GlcNAc	0,2
		0,5
		1,0
LS-Tetrasaccharid a	Neu5Ac <b>α2-3</b> Gal <b>β1-3</b> GlcNAc <b>β1-3</b> Gal <b>β1-4</b> Glc	0,2
		0,5
		1,0
LS-Tetrasaccharid b	Neu5Ac <b>α2-6</b> Gal <b>β1-3</b> GlcNAc <b>β1-3</b> Gal <b>β1-4</b> Glc	0,2
		0,5
		1,0

Tab. 3.3: Eingesetzte Zucker in Bindungsstudien und ihre Konzentrationen (s. auch 2.10)

## 3.1.13 Enzymatische Behandlung von aufgereinigtem CD24

Zur Analyse des Glykosylierungsmusters von CD24 wurde dieses mit N-Glycosidase F, O-Glycosidase, Neuraminidase und O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase behandelt, um anschließend das Glykosylierungsmuster mit zuckerspezifischen Antikörpern (s. 2.8.1) und spezifischen Lektinen (s. 3.1.14) zu überprüfen und mit unbehandeltem CD24 und untereinander zu vergleichen.

## 3.1.13.1 Verdau von aufgereinigtem CD24 mit N-Glycosidase F

Die verwendete N-Glycosidase F (PNGase F), kloniert von *Flavobacterium menigosepticum* und exprimiert in *E. coli*, wurde von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Enzym spaltet an Asparagin gebundene N-Glykane, wobei die gesamte N-verknüpfte Zuckerseitenkette abgespalten wird (s. auch 1.1.1.1).

Zum Entfernen der N-verknüpften Zuckerstrukturen des CD24 wurden 10 µg des aufgereinigten CD24 (s. 3.1.9) zunächst mit 10 % SDS-Lösung versetzt (Endkonzentration SDS: 1 %) und bei 95°C für 5 min denaturiert. Nach Abkühlung wurden die Ansätze mit Inkubationspuffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, 0,6 % CHAPS, optional 10 mM EDTA) verdünnt, und 1-2 U der N-Glycosidase F wurden hinzugefügt. Ein Kontrollansatz ohne Enzymlösung wurde parallel bearbeitet. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (s. 2.2) und Denaturierung für 5 min bei 95°C beendet. Die Proben wurden dann mittels Immunoblot-Analyse (s 3.1.4) und Lektinen (s. 3.1.14) untersucht.

Zur N-Deglykosylierung von CD24 für ELISA-Experimente (s. 3.1.12) und Primärkultur-Experimente (s. 3.3.2) wurden 100 µg aufgereinigtes CD24 ohne vorherige Denaturierung mit Inkubationspuffer versetzt und mit 50 U N-Glycosidase F für 24 h bei 37°C inkubiert. Ein Kontrollansatz ohre Enzymlösung wurde parallel bearbeitet. Um das Enzym zu entfernen, wurden nach der Inkubation beide Ansätze mit dem gegen CD24 gerichteten Antikörper mAk79 (s. 2.8.1), an CNBr-aktivierte Sepharose 4B gekoppelt (s. 3.1.8) (ca. 1000 µl), ü.N. bei 4°C auf einem *head-over-tail*-Rotor inkubiert. Die Überstände wurden

abgenommen und die Sepharose jeweils zweimal mit 1000 µl PBS (s. 2.2) und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 200 - 500 x g und 4°C gewaschen. Das an den Antikörper gebundene CD24 wurde jeweils mit Puffer C (s. 3.1.9) in drei Fraktionen à 1000 µl eluiert. Die Eluate wurden sofort mit 400 µl 1 M Tris/HCl, pH 6,7 neutralisiert und mit Hilfe der Silberfärbung (s. 3.1.2) und Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) auf CD24 überprüft. Die CD24 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert und auf TBS (s. 2.2) mit 0,2 % CHAPS umgepuffert mit Hilfe von *Vivaspin Concentrators* (Vivascience AG, Hannover). Die endgültigen Proben CD24 wurden erneut mittels Silberfärbung und Immunoblot-Analyse überprüft.

# 3.1.13.2 Verdau von aufgereinigtem CD24 mit O-Glycosidase und Neuraminidase

Die verwendete O-Glycosidase aus Diplococcus pneumoniae wurde von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen und nach Angaben des Herstellers Bindung an Serin oder Threonin von O-verknüpften Glykanen (s. auch 1.1.1.2). Weitere Substituenten an diesem Disaccharid wie Sialinsäuren verhindern eine Reaktion der O-Glycosidase, daher wurde eine Kombination mit Neuraminidase, die vorhandene Sialinsäuren abspaltet, eingesetzt. Die verwendete Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* wurde auch von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Neuraminidase spaltet terminale Sialinsäuren in  $\alpha 2,3$ -,  $\alpha 2,6$ - und  $\alpha 2,8$ -Verknüpfungen auf Oligosacchariden und Polysacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden ab.

Hier wurden 10 µg des aufgereinigten CD24 (s. 3.1.9) zunächst mit 10 % SDS-Lösung versetzt (Endkonzentration SDS: 1 %) und bei 95°C für 5min denaturiert. Nach Abkühlung wurden die Ansätze mit Inkubationspuffer (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,2, 0,6 % CHAPS, optional 10 mM EDTA) verdünnt, und 2,5 mU der O-Glycosidase und 2 mU der Neuraminidase wurden hinzugefügt. Ein Kontrollansatz ohne Enzymlösungen wurde parallel bearbeitet. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (s. 2.2) und Denaturierung für 5 min bei 95°C beendet. Die Proben wurden dann mittels Immunoblot-Analyse (s 3.1.4) und Lektinen (s. 3.1.14) untersucht.

# 3.1.13.3 Verdau von aufgereinigtem CD24 mit O-Sialoglykoprotein Endopeptidase

Die verwendete O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase (OSGE), aufgereinigt aus *Mannheimia haemolytica*, wurde von der Firma Cedarline (Hornby, Ontario, Kanada) bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet. Die OSGE spaltet Glykoproteine, die sialinsäuretragende O-Glykane tragen.

10 μg des aufgereinigten CD24 (s. 3.1.9) wurden in 50 mM HEPES, pH 7,4 (Endvolumen: 40 μl) verdünnt, mit 40 μl des Enzyms versetzt und für 4 h oder ü.N. bei 37°C inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne Enzymlösung wurde parallel bearbeitet. Die Enzymreaktion wurde nach der Inkubationszeit durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (s. 2.2) und Denaturierung für 5 min bei 95°C beendet. Die Proben wurden dann mittels Immunoblot-Analyse (s 3.1.4) und Lektinen (s. 3.1.14) untersucht.

## 3.1.14 Charakterisierung von Glykoproteinen mittels Lektinen

Zur Charakterisierung von Glykoproteinen wurde das *DIG Glycan Differentiation Kit* der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Charakterisierung von Glykoproteinen wurden diese zunächst durch SDS-PAGE (s. 3.1.1) aufgetrennt und elektrophoretisch auf Nitrocellulose-Membranen transferiert (s. 3.1.4.1). Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen ü.N. bei 4°C in Blockierungslösung (Blockierungslösung (10 x) im Kit enthalten; 1 ml Blockierungsreagenz ad 10 ml TBS (s. 2.2)) unter leichtem Schütteln inkubiert. Alle weiteren Inkubations- und Waschschritte wurden bei RT durchgeführt. Nach zwei Waschschritten à 10 min mit TBS und einem Waschschritt à 10 min mit Puffer 1 (1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub> in TBS, pH 7,5) wurde die Membran für 1 h mit den Digoxigenin-konjugierten Lektinen (s. **Tab. 3.4**), verdünnt in Puffer 1 nach Angaben des Herstellers, inkubiert. Nach drei anschließenden Waschschritten à 10 min mit TBS wurde die Membran mit polyklonalem anti-Digoxigenin-Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, in TBS 1 h inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS erfolgte die Nachweisreaktion mit NBT/X-Phosphat-Lösung in Puffer 2 (0,1 M Tris/HCI, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M NaCl, pH 9,5) ohne weiteres Schütteln. Positive Banden wurden durch Präzipitation dunkel angefärbt. Zur Beendigung der Reaktion wurde die Membran in Wasser gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

Bezeichnung	Abkürzung	Spezifität
Maackia amurensis Agglutinin	MAA	terminale $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäure auf
		Galactose in N-Glykanen und O-Glykanen
Datura stramonium Agglutinin	DSA	$\mbox{Gal}\beta\mbox{1-4GlcNAc}$ in N-Glykanen des hybriden und
		komplexen Typs
		Gal <pre> β1-4GlcNAc</pre> in O-Glykanen
		GIcNAc in O-Glykanen

Tab. 3.4: Verwendete Lektine und ihre Spezifität

# 3.1.15 Herstellung eines Gehirnhomogenats, eines "17000 x g-Sedimentes" und "17000 x g-Überstandes" aus Gesamtgehirn

Als Versuchstiere für die Fraktionierung wurden 6 – 8 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekaptierung, und das Gehirn wurde entnommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Ein entnommenes Gehirn wurde in 500 µl Homogenisierungspuffer (s. 2.2) in einem Glashomogenisator durch zehnmaliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Um Zellkerne und Zelltrümmer abzutrennen, wurde das Homogenat für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand des Gesamthirnhomogenats wurde weiterverwendet.

Zur Herstellung des "17000 x g-Sedimentes und -Überstandes" wurde der Überstand des Gesamthirnhomogenats für 20 min bei 17000 x g zentrifugiert. Sediment und Überstand wurden getrennt und das Sediment wurde resuspendiert.

Diese Fraktionen dienten als Ausgangsproben für Immunpräzipitationen (s. 3.1.17).

# 3.1.16 Identifizierung putativer Bindungspartner mit Hilfe von *Pull-down*-Experimenten

Die *Pull-down*-Experimente dienten zur Identifizierung möglicher Bindungspartner des Lewis<sup>x</sup>-Epitops (s. 2.10).

Die Versuche wurden mit magnetischen Dynabeads® M-270 Epoxy der Firma Dynal (Hamburg) durchgeführt.

## 3.1.16.1 Kopplung von Liganden an Epoxy-Beads

Die kovalente Kopplung der Liganden an Epoxy-Beads der Firma Dynal wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Als Liganden wurden Lewis<sup>x</sup>-BSA, N-Acetyllactosamin-BSA (s. 2.10) und BSA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Konzentration von 80 µg verwendet.

## 3.1.16.2 Isolierung möglicher Bindungspartner mit Epoxy-Beads

Als Ausgangsprobe wurde das Zellpellet transfizierter CHO-Zellen einer Kulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) bei einer ca. 90 – 100 %igen Konfluenz verwendet (s. 3.3.1.1). Das Zellpellet wurde in Resuspendierungspuffer A (s. 2.2) resuspendiert und in einem Glashomogenisator durch mehrmaliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Nach einer Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C für

10 min wurde der resultierende Überstand als weitere Probe verwendet. Die mit den verschiedenen Liganden beschichteten Epoxy-Beads (s. 3.1.16.1) (50 µl Beads pro Ansatz) wurden mit diesen Proben (150 – 200 µl pro Ansatz) ü.N. bei 4°C auf einem *head-over-tail*-Rotor inkubiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die beschichteten Epoxy-Beads dreimal mit 1000 μl Resuspendierungspuffer A und dreimal mit Resuspendierungspuffer B (s. 2.2) gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer (s. 2.2) aufgenommen. Die Proben wurden bei 95°C für 5 min deraturiert, so dass sich die Proteine im Überstand befinden, der dann mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) untersucht wurde.

## 3.1.17 Immunpräzipitation

Für Immunpräzipitationsexperimente wurden mit Protein G gekoppelte, magnetische Beads (*MagnaBind Protein G Beads*) der Firma Perbio (Bonn) verwendet.

Die Protein G gekoppelten, magnetischen Beads wurden zunächst dreimal mit Resuspendierungspuffer A (s. 2.2) gewaschen. Membranfraktionen wie das "17000 x g-Sediment" (s. 3.1.15) wurden in Resuspendierungspuffer B (s. 2.2) resuspendiert und mit 50 µl Beads bei 4°C für 60 min auf einem head-over-tail-Rotor inkubiert (preclearing). Die Beads wurden mit Hilfe eines Magneten aus der Probe entfernt. 10 µg des anti-CD24-Antikörpers 79 (s. 2.8.1), aufgereinigt über Protein G (s. 3.1.7), wurden zur Probe hinzugefügt und eine Inkubation für 2 h bei 4°C auf einem *head-over-tail*-Rotor angeschlossen. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich ein Ansatz ohne Antikörper bearbeitet. Anschließend wurden 50 µl Beads zu jeder Probe hinzugefügt und ü.N. weiter bei 4°C auf einem head-overtail-Rotor inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Beads dreimal mit Resuspendierungspuffer A und dreimal mit Resuspendierungspuffer В gewaschen. Anschließend wurden die Beads mit 40 µl Elutionspuffer (0,1 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 2-3) 10 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, der Überstand wurde abgenommen, sofort mit 1 M Tris/HCl pH 8,8 neutralisiert und ebenso wie die Beads in SDS-Probenpuffer (s. 2.2) aufgenommen und bei 95°C für 5min denaturiert. Diese Proben wurden dann mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) untersucht.

# 3.2 Molekularbiologische Methoden

## 3.2.1 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*

Für die Stammhaltung und Kultivierung wurde LB-Medium (s. 2.2) verwendet.

Im Fall von rekombinanten *E. coli*-Stämmen wurde dem LB-Medium (s. 2.2) das entsprechende Antibiotikum (s. 2.7) zugesetzt.

## 3.2.1.1 Stammhaltung

Für die Stammhaltung von *E. coli* über einen längeren Zeitraum wurden Glycerin-Stocks angelegt. Für ihre Herstellung wurde eine sich in der stationären Phase befindliche Übernachtkultur im Verhältnis 1:1 mit Glycerin (80 %(w/v)) gemischt und anschließend bei –80°C gelagert.

Unter anderem wurden auch Stammkulturen auf LB-Agar (s. 2.2), im Falle rekombinanter Stämme versetzt mit den entsprechenden Antibiotika, angelegt. Diese wurden ü.N. bei 37°C inkubiert und bei 4°C bis zu 8 Wochen gelagert.

## 3.2.1.2 Kultivierung

Zum Beimpfen von Flüssigkulturen wurden Stammkulturen auf LB-Agar (s. 3.2.1.1) angelegt.

Für die folgende Anzucht in Übernachtkulturen von 2,5 – 10 ml Flüssigkulturen in LB-Medium (s. 2.2) wurden Einzelkolonien auf den Agarplatten in Flüssigkulturen überimpft. Im Fall von rekombinanten Stämmen wurde dem LB-Medium das entsprechende Antibiotikum zugefügt. Die Inkubation der angeimpften Flüssigkulturen erfolgte bei 37°C und 225 rpm ü.N. in einem Schüttelinkubator.

## 3.2.2 Herstellung von kompetenten Bakterien

Zur Herstellung chemokompetenter Bakterien der *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) und XL1-Blue (s. 2.4) wurden in 100 ml vorgewärmtem LB-Medium (s. 2.2) 1 ml einer Übernachtkultur (s. 3.2.1.2) angeimpft und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,4 bis 0,5 bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

Nach Abkühlung der Kultur für 10 min auf Eis wurden die Bakterien mit 4000 x g bei 4°C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann vorsichtig in 30 ml kaltem TFB I-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin, pH 5,8 (Einstellung mit 0,2 N Essigsäure), steril filtrieren) resuspendiert und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut abzentrifugiert (4000 x g, 4°C, 10 min) und anschließend in 4 ml kaltem TFB II-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin, pH 8,0 (Einstellung mit KOH), steril filtrieren) aufgenommen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 100 µl Aliquots bei –80°C eingefroren und gelagert.

## 3.2.3 Transformation von Bakterien

(Sambrook und Gething, 1989)

Zur chemischen Transformation der *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) und XL1-Blue (s. 2.4) wurden 100  $\mu$ l einer langsam aufgetauten Suspension der chemisch kompetenten Bakterien (s. 3.2.2) mit 10 - 100 ng Plasmid-DNS oder 20  $\mu$ l eines PCR-Produktes (s. 3.2.7) versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock bei 42°C für 2 min und Abkühlung auf Eis für 2 min wurden 900  $\mu$ l LB-Medium (s. 2.2) zugegeben und der Ansatz bei 37°C 30 min inkubiert. Die Zellen wurden in den verbliebenen 200  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Agar (s. 2.2) (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausgestrichen und ü.N. bei 37°C kulfviert.

# 3.2.4 Plasmidisolation aus 3 ml Bakterienkulturen

Die Plasmidisolierung aus 3 ml Bakterienkulturen (s. 3.2.1) erfolgte mit Hilfe des  $GFX^{TM}$  Micro Plasmid Prep Kit (Macherey und Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers.

# 3.2.5 Restriktionsverdau von DNS

(Sambrook und Gething, 1989)

Die Restriktion von DNS erfolgte unter den vom Hersteller empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen.

Für analytische Zwecke wurde einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 μl nach Angaben des Herstellers pro μg DNS 1 U Restriktionsendonuklease hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend durch gelelektrophoretische Auftrennung (s. 3.2.6) analysiert.

Verwendete Restriktionsendonukleasen:

*Bam*HI 10 U/μI (New England Biolabs, Frankfurt/M.)

*Dpn* I 10 U/μI (Stratagene, La Jolla, USA)

# 3.2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

(Sambrook und Gething, 1989)

Zur Analyse von DNS-Fragmenten, erhalten durch Restriktionsspaltungen, wurden diese durch Elektrophorese in horizontalen Agarosegelen (SubCell®GT Elektrophoresekammern, BioRad, München) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,0, 2 mM EDTA in dH<sub>2</sub>O) aufgetrennt. Die Agarosegele wurden durch Lösung von 1 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer hergestellt.

Die zu analysierenden Proben wurden mit 5 x DNS-Auftragspuffer (50 % Glycerin, 1 Spatelspitze Orange G in TAE-Puffer) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNS-Marker (DNS-Leiter 1kb, Gibco BRL, Karlsruhe) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 80 – 100 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in TAE-Puffer) gefärbt und mit Hilfe eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB, Wiesloh) unter UV-Licht analysiert und fotografiert.

# 3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis et al., 1986)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden DNS-Abschnitte amplifiziert.

Dazu werden die folgenden Reagenzien zusammenpipettiert und die DNS je nach Anwendung mit Hilfe der *Taq*-Polymerase oder der *Pfu*-Polymerase vervielfältigt.

DNS	x ng
Oligonukleotid 1	10 pmol
Oligonukleotid 2	10 pmol
dNTP	10 nmol je Nukleotid
10 x PCR/ <i>Pfu</i> -Puffer	5 μΙ
Polymerase	2,5 U
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Die Reaktion erfolgte nach reaktionsspezifischen Temperaturprofilen in MJ Research PTC-200 Thermocyclern (Biozym, Hess. Oldendorf).

# 3.2.8 Gerichtete DNS-Mutagenese

Zur Einführung einer gezielten Mutation innerhalb eines DNS-Fragmentes wurde das *Quickchange® Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Als Template diente der pET-Vektor mit dem Expressionskonstrukt für das L1-Proteinfragment FN 1-2 (s. 2.6), in dem die Aminosäure Arginin (Position 687 der Aminosäuresequenz des murinen L1) in der angenommenen Bindungsstelle der

Seite 57

α2,3-verknüpften Sialinsäuren zu Alanin ausgetauscht werden sollte. Die Primer L1mut FN1-up und L1mut FN1-dn für die Polymerase-Kettenreaktion (s. 3.2.7) enthielten die gewünschte Mutation. Die Primer und die entsprechende L1-Aminosäuresequenz mit der gerichteten Mutation sind in Anhang (s. 9.1 und 9.2) angefügt. Für die PCR-Reaktion ist es entscheidend, die Konzentrationen der Primer im Überschuss vorzulegen, daher wurden drei Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen des Templates bei einer konstanten Primer-Konzentration verwendet: Template-DNS 10 ng, 25 ng, 60 ng

L1mut FN1-up	10 pmol
L1mut FN1-dn	10 pmol
dNTP	10 nmol je Nukleotid
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	5 μΙ
<i>Pfu</i> -Polymerase	2,5 U
ddH₂O	ad 50 µl

Die Ansätze wurden im Thermocycler nach dem folgenden Programm inkubiert:

1) initiale Denaturierung	95°C	30 s
2) Denaturierung	95°C	30 s
3) Annealing	55°C	60 s
4) Synthese	72°C	8 min
5) Pause	4°C	$\infty$

Die Schritte 2) – 4) wurden 18mal wiederholt. Im Anschluss wurden alle Ansätze auf eine ausreichende Amplifikation durch DNS-Gelelektrophorese (s. 3.2.6) überprüft. Angeschlossen wurde ein Restriktionsverdau der PCR-Ansätze mit 10 U *Dpn* I für 2 h bei 37°C (s.3.2.5), um die parentale, methylierte, nicht-mutierte DNS zu verdauen. Chemisch kompetente Bakterien des *E. coli*-Stammes XL1-Blue (s. 2.4) wurden anschließend mit diesen Ansätzen wie beschrieben transformiert (s 3.2.3), positive Klone am folgenden Tag in 4 ml Flüssigkulturen in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (s. 3.2.1.2) überimpft und wiederum am folgenden Tag die Plasmid-DNS isoliert (s. 3.2.4). Die isolierte Plasmid-DNS

wurde nochmals durch einen Restriktionsverdau mit *Bam* HI (s. 3.2.5 und 3.2.6) überprüft, anschließend sequenziert (s. 3.2.10) und so auf Richtigkeit der eingeführten Mutation überprüft. Die mutierte Plasmid-DNS wurde als L1-FN 1-2m bezeichnet und für die rekombinante Proteinexpression (s. 3.1.10) verwendet.

## 3.2.9 DNS-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit von DNS wurden mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Gemessen wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm. Die Absorption bei 260 nm sollte für die Konzentrationsbestimmung zwischen 0,1 und 0,6 liegen, das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 zeigt eine ausreichende Reinheit an.

## 3.2.10 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNS erfolgte in der Sequenzierabteilung des ZMNH. Hierzu wurden 1  $\mu$ g DNS in 7  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst und mit 1  $\mu$ l des entsprechenden Sequenzierprimers (10 pM) versetzt.

# 3.3 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CQ-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. Die für die Kultivierung der Zellen benötigte Plastikware wurde von der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) bezogen.

## 3.3.1 Kultivierung und Langzeitlagerung der Zelllinien

## 3.3.1.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Für die Kultivierung der *chinese hamster ovary* (CHO)-Zelllinie (s. 2.3) wurde <u>*Glasgow*'s <u>*Minimal Essential Medium*</u> (GME-Medium) der Firma PAA Laboratories (Cölbe) verwendet. Dem Basalmedium GMEM wurden die in **Tabelle 3.5** aufgeführten Zusätze zugefügt.</u>

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
<u>G</u> lasgow`s <u>M</u> inimal <u>E</u> ssential <u>M</u> edium (GME-	- 1 x	PAA Laboratories (Cölbe)
Medium)		
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10 %	PAA Laboratories (Cölbe)
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories (Cölbe)
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin	2 %	PAA Laboratories (Cölbe)
(10 mg/ml) (100 x)		
non essential amino acids (100 x)	1 x	PAA Laboratories (Cölbe)
Glutamat / Aspartat (100 x)	1 x	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nucleoside (50 x)	1 x	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Tab. 3.5: Zusammensetzung des Kulturmediums der CHO-Zelllinie

Für die Kultivierung wurden Kulturflaschen in einer Größe von 75 cm<sup>2</sup> verwendet.

Die Passage der Zellen wurde bei ungefähr 90 %iger Konfluenz der Zellen durchgeführt. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen einmal mit 10 ml Hank's gepufferter Salz-Lösung (HBSS, PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche erfolgte bei RT durch eine Inkubation von 2 – 5 min mit 3 ml Versen (1:5000) (Invitrogen, Karlsruhe). Nach einer Zugabe von weiteren 7 ml HBSS wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und vereinzelt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in

10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 ausgesät.

Eine Selektion stabil transfizierter CHO-Zellen erfolgte durch Zugabe von G418 (PAA Laboratories, Cölbe) in einer Konzentration von mindestens 0,5 mg/ml zum Kulturmedium.

## 3.3.1.2 Kultivierung von Hybridomazellen

Für die Expansion der Hybridomazellen (s. 2.3) wurde RPMI-Medium (PAA Laboratories, Cölbe) verwendet. Diesem Basalmedium wurden die in **Tabelle 3.6** aufgeführten Zusätze zugefügt.

#### Tab. 3.6: Zusammensetzung des Expansionsmediums der Hybridomazellen

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
RPMI-Medium	1 x	PAA Laboratories (Cölbe)
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10 %	PAA Laboratories (Cölbe)
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories (Cölbe)
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	2 %	PAA Laboratories (Cölbe)

Für die Expansion der Hybridomazellen wurden Kulturflaschen in einer Größe von 75 cm<sup>2</sup> verwendet.

Die Passage der nicht adhärenten Zellen erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt bei 1000 x g für 5 min. Die Zellen wurden dann in Expansionsmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 erneut ausgesät.

## 3.3.1.3 Produktion monoklonaler Antikörper mit Hybridomazellen

Für die Produktion des monoklonalen Antikörpers 79 der Hybridomazellen wurde serumfreies Hybridoma SFM Medium der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Diesem Medium wurden Zusätze zugefügt (s. **Tab. 3.7**).

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
Hybridoma SFM	1 x	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	2 %	PAA Laboratories (Cölbe)
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	2 %	PAA Laboratories (Cölbe)

Für die Produktion des Antikörpers der Hybridomazellen wurden Kulturflaschen in einer Größe von 150 cm<sup>2</sup> verwendet.

Um die Hybridomazellen von Expansion (s. 3.3.1.2) auf Produktion umzustellen, wurden die Zellen nach dem Zentrifugationsschritt bei 1000 x g in Produktionsmedium resuspendiert und in 50 ml Produktionsmedium in einer Kulturflasche (150 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Nach 3 – 4 Tagen in Kultur wurde die Zellsuspension bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in frischen 50 ml Produktionsmedium resuspendiert und erneut ausgesät. So konnten die Zellen bis zu sechs Wochen in der Produktionskultur gehalten werden. Der Überstand mit dem enthaltenen Antikörper wurde nach der Zentrifugation gesammelt, mit Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) auf den enthaltenen Antikörper überprüft und bis zur Aufreinigung über Protein G (s. 3.1.7) bei –20°C aufbewahrt.

# 3.3.1.4 Langzeitlagerung der Zelllinien

Für die Langzeitlagerung der Zelllinien wurden die Zellen einer konfluenten Kulturflasche, wie in **Kapitel 3.3.1.1** und **3.3.1.2** beschrieben, im Anschluss an

den Zentrifugationsschritt in 1 – 2 ml des entsprechenden Einfriermediums (s. **Tab. 3.8**) resuspendiert.

Zelllinie	Zusammensetzung des Einfriermediums
CHO-Zellen	70 % Ham`s F12
	20 % Fötales Kälberserum
	10 % DMSO
Hybridomazellen	70 % RPMI Medium
	20 % Fötales Kälberserum
	10 % DMSO

Tab. 3.8: Zusammensetzung der Einfriermedien der verwendeten Zelllinien

Aliquots der einzufrierenden Zellen wurden in Isopropanol in speziellen Einfrierbehältern auf –80°C gekühlt, die Lagerung der Zellen erfolgte bei –80°C bzw. in flüssigem Stickstoff.

## 3.3.2 Primärzellkultur

## 3.3.2.1 Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin

Die Deckgläschen (VWR, Darmstadt) mit einem Durchmesser von 15 mm wurden 30 min in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler mit Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen in drei Waschschritten mit Wasser gewaschen, um das Aceton zu entfernen. Die Beschichtung der Deckgläschen mit poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) erfolgte dann ü.N. bei 4°C. Die Deckgläschen wurden dazu in einer 0,01 %igen Lösung von poly-L-Lysin (PLL) in PBS (s. 2.2) auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten wiederum drei Waschschritte mit Wasser. Im Anschluss wurden die Deckgläschen unter der Sterilbank in einer zuvor mit Alufolie ausgelegten und mit UV-Licht bestrahlten Wanne einzeln ausgelegt und getrocknet. Die getrockneten Deckgläschen wurden anschließend 15 min mit UV-Licht bestahlt und unter sterilen Bedingungen bei RT aufbewahrt.

## 3.3.2.2 Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen

(Chen et al., 1999; Loers et al., 2005)

Die Präparation der Kleinhirnneuronen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Loers durchgeführt.

Für die Präparation der Kleinhirnneuronen wurden 6 – 8 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

Die Präparation der Kleinhirne erfolgte auf Eis. Die Tiere wurden durch Dekaptierung getötet. Das Gehirn wurde entnommen und das Kleinhirn präpariert, welches dann in eiskalte HBSS-Lösung (PAA Laboratories, Cölbe) gegeben wurde. Mit Hilfe eines Stereomikroskops wurden vom Kleinhirn assoziierte Blutgefäße und die Hirnhaut entfernt, das Kleinhirn in frische eiskalte HBSS-Lösung überführt und mit einer feinen Schere in drei Teile geteilt. Die Gewebestücke wurden mit eiskalter HBSS-Lösung gewaschen (5 ml HBSS / drei Kleinhirne) und anschließend mit Trypsin/DNase I-Lösung (0,2 g Trypsin, 20 mg DNase I, 200 µl MgCl<sub>2</sub> (80 mM) ad 20 ml HBSS, pH 7,8), (1 ml / drei Kleinhirne) 15 min bei RT inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschschritte mit HBSS. Nach Zugabe der DNase I-Lösung (10 mg DNase I, 50 mg Glucose ad 20 ml BME-Medium), (1 ml / drei Kleinhirne) wurden die Gewebestücke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit abgerundeten Pasteurpipetten (drei Pasteurpipetten mit abnehmendem Durchmesser) homogenisiert. Nach Zugabe von HBSS-Lösung (5 ml / drei Kleinhirne) wurde die Zellsuspension 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 100 x g und 4°C zentrifugiert. Kam es nach der Inkubation auf Eis zu einer Sedimentation von Gewebestücken, wurde lediglich der Überstand weiterverwendet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und die Kleinhirnneuronen in vorgewärmtem Medium X-1 (Zusammensetzung s. Tab. 3.9) resuspendiert.

Seite 64

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
BME-Medium	1 x	Invitrogen, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	2,2 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM	PAA Laboratories (Cölbe)
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin	2 %	PAA Laboratories (Cölbe)
(10 mg/ml) (100 x)		
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories (Cölbe)
BSA	0,1 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Insulin	10 µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Thyroxin	4 nM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Transferrin	100 µg/ml	Calbiochem, Bad Soden
Aprotinin	0,027 TIU/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumselenit	30 nM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Tab. 3.9: Zusammensetzung des X-1 Mediums für die Kultivierung der primären Kleinhirnneurone

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit Medium X-1 entsprechend verdünnt. Für die Analyse des Neuritenwachstums der Kleinhirnneuronen wurden die Zellen in einer Zelldichte von 1x10<sup>5</sup> Zellen/ml und 2x10<sup>5</sup> Zellen/ml auf ein gewaschenes, mit PLL beschichtetes Deckgläschen (s. 3.3.2.1) ausgesät.

Für die Analyse des CD24-abhängigen Neuritenwachstums wurden PLLbeschichtete Deckgläschen (s. 3.3.2.1) unter sterilen Bedingungen mit CD24, aufgereinigt aus Mausgehirn (s. 3.1.9), oder N-deglykosyliertem CD24 (s. 3.1.13.1) in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml (gelöst in HBSS oder dH<sub>2</sub>O) ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen, die Deckgläschen in ein *12well* überführt und mit 1 ml HBSS gewaschen. Vor dem Aussäen der Kleinhirnneuronen wurde die HBSS-Lösung abgenommen und 1 ml der Zellsuspension in den angegebenen Zellzahlen ausgesät. Als Negativkontrolle dienten PLL beschichtete Deckgläschen, als Positivkontrolle wurden mit 1  $\mu$ g/ml Laminin (Sigma, Taufkirchen) beschichtete Deckgläschen verwendet. Für die
Analyse des zuckerabhängigen Neuritenwachstums der Kleinhirnneurone wurden die Glykan-BSA-Konjugate N-Acetyllactosamin-BSA, 3´-Sialyl-N-Acetyllactosamin-BSA und Lewis<sup>×</sup>-BSA (s. 2.10) in Konzentrationen von 20, 50 und 100 µg/ml verwendet. Um die Effekte auf das Neuritenwachstum von Kombinationen der Glykan-BSA-Konjugate zu untersuchen, wurden folgende Kombinationen hergestellt: 100 µg/ml N-Acetyllactosamin-BSA und 100 µg/ml 3´-Sialyl-N-Acetyllactosamin-BSA, 100 µg/ml N-Acetyllactosamin-BSA und 20 µg/ml Lewis<sup>×</sup>-BSA, 100 µg/ml 3´-Sialyl-N-Acetyllactosamin-BSA und 20 µg/ml Lewis<sup>×</sup>-BSA. Es wurden die Konzentrationen verwendet, bei denen ein maximaler Effekt auf das Neuritenwachstum zu beobachten war. Die hergestellten Kombinationen der Glykan-BSA-Konjugate wurden zunächst für 2 h bei RT inkubiert und anschließend auf die PLL-beschichteten Deckgläschen gegeben und ü.N. bei 4°C beschichtet.

Zur Untersuchung des Neuritenwachstums in An- und Abwesenheit verschiedener Zucker, Antikörper und Peptide wurden diese etwa erst 60 min nach dem Aussäen der Kleinhirnneurone zugegeben, um eine Beeinflussung der initialen Adhäsion der Zellen zu vermeiden. Eine Übersicht über die verwendeten Zucker, Antikörper und Peptide und ihre eingesetzten Konzentrationen geben die **Tabellen 3.10**, **3.11** und **3.12**. Nach 20 – 24 h in Kultur wurden die Kleinhirnneurone zur Analyse des Neuritenwachstums fixiert und gefärbt (s. 3.3.2.4).

Tab.	3.10:	Eingesetzte	Zucker	in	Einzelzellkulturen	von	Kleinhirnneuronen	und
Hinterwurzelganglienneuronen (s. auch 2.10). Die Verknüpfungen der Monosacharide sind fett unterlegt.								

Name	Struktur	Endkonzentration
3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin	Neu5Ac <b>α2-3</b> Gal <b>β1-4</b> GlcNAc	100 μM
6'-Sialyl-N-Acetyllactosamin	Neu5Ac <b>α2-6</b> Gal <b>β1-4</b> GlcNAc	100 μM
Lewis <sup>a</sup>	Gal <b>β1-3</b> ( <b>α4-1</b> Fuc)GlcNAc	10 µM
Lewis <sup>x</sup>	Gal <b>β1-4</b> ( <b>α3-1</b> Fuc)GlcNAc	10 µM

Bezeichnung		Endkonzentration
NCAM 2B2	Antiserum, über Protein A aufgereinigt	5 μg/ml
F3 рс	Antiserum	1:1000
TG-1	Antiserum	1:1000
L5	Zellkulturüberstand	1:100
412	über Protein G aufgereinigt	1 μg/ml

Tab.3.11:EingesetzteAntikörperinEinzelzellkulturenvonKleinhirnneuronenundHinterwurzelganglienneuronen (s. auch 2.8.1)

Tab.3.12:EingesetztePeptideinEinzelzellkulturenvonKleinhirnneuronenundHinterwurzelganglienneuronen (s. auch 2.9)

Bezeichnung		Endkonzentration
5743	Stocklösung 100 μg/μl in DMSO	100 μg/ml
5743 scrambled	Stocklösung 100 μg/μl in DMSO	100 µg/ml

### 3.3.2.3 Einzelzellkulturen von Hinterwurzelganglienneuronen

Die Präparation der Hinterwurzelganglienneurone wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Loers durchgeführt.

Für die Präparation der Hinterwurzelganglienneurone wurden 6 – 8 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

Die Präparation der Hinterwurzelganglien erfolgte auf Eis. Die Tiere wurden durch Dekaptierung getötet und das Rückgrat der Tiere entnommen, welche dann in eiskalte Ham's F12 Lösung (PAA Laboratories, Cölbe) gegeben wurden. Das Rückgrat wurde anschließend auf einer Silikon-ähnlichen Oberfläche, überschichtet mit eiskalter Ham's F12 Lösung, mit feinen Nadeln fixiert. Das Rückgrat wurde dann mit einer feinen Schere in der Mitte aufgeschnitten, ohne das darunter liegende Rückenmark zu verletzen. Das Rückenmark wurde so freigelegt, und die Hinterwurzelganglien konnten mit feinen Pinzetten unter einem Stereomikroskop präpariert werden. Diese wurden dann in frische Ham's F12 Lösung überführt, nochmals mit 10 ml Ham's F12 Lösung gewaschen und anschließend mit Trypsin/Collagenase-Lösung (0,25 % Trypsin, 0,1 % Collagenase (Typ XI, >1200 CDU/mg) in Ham's F12) 35 – 40 min bei 37°C inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit 10 ml Ham's F12 Lösung, wobei nach jedem Waschschritt eine Zentrifugation bei 1000 x g für 2 min und 4°C angeschlossen wurde. Nach Zugabe der DNase I-Lösung (0,01 % DNase I in Ham's F12) wurden die Hinterwurzelganglien durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit abgerundeten Pasteurpipetten (drei Pasteurpipetten mit abnehmendem Durchmesser) homogenisiert. Nach Zugabe von 10 ml Ham's F12 Lösung wurde die Zellsuspension 5 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in vorgewärmtem DRG-Medium (Zusammensetzung s. **Tab. 3.13**) resuspendiert.

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
DMEM / Ham`s F12 1:1	1 x	PAA Laboratories (Cölbe)
Insulin	50 μg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Transferrin	50 μg/ml	Calbiochem, Bad Soden
Natriumselenit	30 nM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Triiodothyroxin	30 nM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Hydrocortison	10 nM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Putrescin	100 μM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Progesteron	20 nM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
BSA	100 μg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
non essential amino acids (100 x)	1 x	PAA Laboratories (Cölbe)
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin	2 %	PAA Laboratories (Cölbe)
(10 mg/ml) (100 x)		
L-Glutamin (100 x, 200 mM)	1 %	PAA Laboratories (Cölbe)
B27 Supplement	1 x	Gibco, Karlsruhe

Tab.3.13:ZusammensetzungdesDRG-MediumsfürdieKultivierungderprimärenHinterwurzelganglienneurone

Bezeichnung	Konzentration	Herkunft
7S nerve growth factor (NGF)	100 ng/ml	Calbiochem, Bad Soden

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit DRG-Medium weiter verdünnt. Für die Analyse des Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneurone wurden die Zellen in einer Zelldichte von 1000 Zellen/ml auf ein gewaschenes, mit PLL beschichtetes Deckgläschen (s. 3.3.2.1) ausgesät.

Für die Analyse des CD24-abhängigen Neuritenwachstums wurden PLL beschichtete Deckgläschen (s. 3.3.2.1) unter sterilen Bedingungen mit CD24, aufgereinigt aus Mausgehirn (s. 3.1.9), oder N-deglykosyliertem CD24 (s. 3.1.13.1) in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml (gelöst in HBSS (PAA Laboratories (Cölbe) oder dH<sub>2</sub>O) ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen, die Deckgläschen in ein *12well* überführt und mit 1 ml HBSS gewaschen. Vor dem Aussäen der Hinterwurzelganglienneurone wurde die HBSS-Lösung abgenommen und 1 ml der Zellsuspension in der angegebenen Zellzahl ausgesät. Als Negativkontrolle dienten PLL beschichtete Deckgläschen, als Positivkontrolle wurden mit 1  $\mu$ g/ml Laminin (Sigma, Taufkirchen) beschichtete Deckgläschen verwendet.

Zur Untersuchung des Neuritenwachstums in An- und Abwesenheit verschiedener Zucker, Antikörper und Peptide wurden diese etwa erst 60 min nach dem Aussäen der Hinterwurzelganglienneurone zugegeben, um eine Beeinflussung der initialen Adhäsion der Zellen zu vermeiden. Eine Übersicht über die verwendeten Zucker, Antikörper und Peptide und ihre eingesetzten Konzentrationen geben die **Tabellen 3.10, 3.11** und **3.12** (s. 3.3.2.2). Nach 20 – 24 h in Kultur wurden die Hinterwurzelganglienneurone zur Analyse des Neuritenwachstums fixiert und gefärbt (s. 3.3.2.4).

# 3.3.2.4 Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen

Für die Neuritenwachstums Kleinhirn-Analyse des der und Hinterwurzelganglienneurone wurden die Zellen nach 20 – 24 h in Kultur durch die Zugabe von 25 % Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5 %) zum Kulturmedium fixiert. Nach einer Inkubation von 45 – 60 min wurde das Medium abgenommen und die Deckgläschen zweimal mit 1 ml dH<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Färbung der Zellen wurden die Deckgläschen 60 min in Färbelösung (1 % Toluidinblau, 1 % Methylenblau, 1 % Borax in dH<sub>2</sub>O) inkubiert. Nach drei anschließenden Waschschritten mit Wasser wurden die Deckgläschen an der Luft getrocknet und mit Hilfe von Eukitt (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) eingebettet. Die Objektträger wurden dann bei RT gelagert.

Die Auswertung des Neuritenwachstums der Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneurone erfolgte mit Hilfe des IBAS Image Analysis System (Kontron, Zeiss) und dem Programm "Carl Zeiss Vision KS 400 V2.0".

Für die Auswertung des Neuritenwachstums der Kleinhirnneurone wurde pro Versuchsansatz die totale Neuritenlänge von mindestens 100 Zellen gemessen. Für die Auswertung des Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneurone wurde pro Versuchansatz die Neuritenlänge der drei längsten Neuriten einer Zelle von mindestens 50 Zellen gemessen.

### 3.3.3 Aufarbeitung von Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

Für die Aufarbeitung von Zellen der Primärkultur (s. 3.3.2.2 und 3.3.2.3) bzw. Zellen der CHO-Zelllinien (s. 3.3.1.1) wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit kaltem PBS (s. 2.2) oder HBSS (PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Die Zellen wurden in PBS oder Ripa-Puffer (s. 2.2) abgeschabt, eingefroren und wieder aufgetaut und evtl. mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Um Zellkerne zu entfernen wurde das Zelllysat 10 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde weiterverwendet. Dieser Überstand wurde direkt mit SDS-Probenpuffer (s. 2.2) versetzt und mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) untersucht oder zunächst durch eine Proteinfällung nach Wessel (s. 3.1.6) ankonzentriert.

# 4 Ergebnisse

Neurale Zelladhäsionsmoleküle, wie L1 und CD24, und auch verschiedene Zuckerstrukturen spielen wichtige Rollen in der Entwicklung und Funktion des Zentralen Nervensystems (s. 1.2 und 1.3). Das Zelladhäsionsmolekül L1 ist für die Integrität des Zentralen Nervensystems von großer Bedeutung (s. 1.3.1.1), die durch das Krankheitsbild des L1-Syndroms, das durch Mutationen in dem für L1 kodierenden Gen hervorgerufen wird, deutlich wird (Fransen *et al.*, 1995). Ein bekannter Interaktionspartner des L1-Moleküls ist das Zelladhäsionsmolekül CD24 (Kadmon *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der beiden Zelladhäsionsmoleküle zuckerabhängig ist, für die Bindung von CD24 and L1 sind terminale Sialinsäuren des CD24 essentiell (Kleene *et al.*, 2001; s. auch 1.3.3). Es gibt Hinweise, dass verschiedene Zuckerstrukturen Protein-Protein-Interaktionen modulieren und so für die Feinabstimmung von Interaktionen wichtig sein können (Schachner und Martini, 1995). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion der beiden Zelladhäsionsmoleküle zelladhäsionsmoleküle und ihre Bedeutung im Nervensystem näher untersucht.

Um Hinweise auf die sialinsäureabhängige Bindungsstelle des CD24 im L1-Molekül zu erhalten, wurden Bindungsstudien zur Lokalisation und Spezifität der Bindungsstelle durchgeführt (s. 4.2 und 4.3). Neben einer Charakterisierung der Glykanstrukturen des CD24, aufgereinigt aus Maushirn, und ihrer Bedeutung für die Interaktion mit L1 (s. 4.5 und 4.6.1) wurde die funktionelle Bedeutung der zuckerabhängigen L1-CD24-Interaktion für das CD24-abhängige Neuritenwachstum analysiert (s. 4.4, 4.6.2, 4.7, 4.8 und 4.9).

### 4.1 Aufreinigung von CD24 aus Maushirn

Aufgrund der großen Bedeutung seiner Glykosylierung war es essentiell, für die geplanten Arbeiten natives CD24 zu verwenden. Daher wurde in einem ersten Schritt das CD24 für die folgenden Experimente aus Maushirn aufgereinigt (Kleene *et al.*, 2001).



Abb. 4.1: Nachweis von aus Maushirn aufgereinigtem CD24. Mittels Silberfärbung (A) und Immunoblot-Analyse (B) unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 79, gerichtet gegen CD24, wurde die CD24-Präparation (A und B: Spur 1) im SDS-Gel aufgetrennt und die enthaltenen Proteine nachgewiesen (s. 3.1.9). Da das Protein im Zeitraum nach der Geburt eine hohe Expression zeigt (s. 1.3.2), wurde das Protein aus Gehirnen von 2 - 10 Tage alten Wildtyp-Mäusen wie beschrieben aufgereinigt (s. 3.1.9). Nach der Aufarbeitung des Gewebes folgte eine Immunaffinitätschromatographie mit dem monoklonalen Antikörper 79, der gegen CD24 gerichtet ist, zur Aufreinigung des Proteins. Die nach der Immunaffinitätschromatographie und weiterer Ankonzentrierung und Pufferaustausch erhaltene CD24-Präparation mittels Silberfärbung eines SDSwurde Polyacrylamidgels (s. 3.1.2) und Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) auf Integrität und Reinheit untersucht. Das Protein CD24 konnte durch die Silberfärbung (Abb. 4.1 A) und den spezifischen Nachweis durch die Immunoblot-

Analyse unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 79 (**Abb. 4.1 B**) nachgewiesen werden. Die CD24-Präparation zeigte die erwarteten Banden auf der Höhe des scheinbaren Molekulargewichts von 27 kDa bis 33 kDa. Allerdings wurde CD24 durch die Silberfärbung aufgrund des nur kleinen Proteinkerns und der hohen Glykosylierung nur sehr gering angefärbt. Die Silberfärbung zeigte eine zusätzliche Bande auf einer Höhe von etwa 50 kDa, die auch in der Immunoblot-Analyse zu detektieren war. Hierbei handelte es sich um co-eluierten Antikörper der verwendeten Antikörpersäule, da diese Bande auch in der Immunoblot-Analyse nur durch den sekundären Antikörper nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Das aus Mausgehirn aufgereinigte CD24 wurde für die Bindungsstudien und Primärkulturexperimente verwendet.

# 4.2 Identifizierung der Sialinsäure-Bindungsstelle im L1

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass für die Interaktion der neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24 terminale Sialinsäuren am CD24 essentiell sind (Kleene *et al.*, 2001). Durch Sequenzvergleiche mit sialinsäurespezifischen Lektinen der *siglec*-Familie (Kelm und Schauer, 1997) konnte eine mögliche Bindungsstelle in der 1. FN-Domäne des L1 identifiziert werden (s. 1.3.3).

Zur ersten Eingrenzung der Sialinsäure-Bindungsstelle im L1 wurden im Rahmen dieser Arbeit rekombinante L1-Proteinfragmente, die unterschiedliche Domänen des L1 umfassen, verwendet (s. 4.2.1) und ihre Bindung an CD24 überprüft (s. 4.2.2). Zur weiteren Analyse wurde in der angenommenen Bindungsstelle durch gerichtete Mutagenese eine hochkonservierte Aminosäure ausgetauscht. Die Bindung des mutierten L1-Proteinfragments an CD24 wurde in Bindungsstudien analysiert (s. 4.2.3). Um die Bindungsstelle noch genauer lokalisieren zu können, wurden Bindungsstudien mit Peptiden (s. 2.9), die die angenommene Bindungsstelle präsentieren, durchgeführt (s. 4.2.4).

# 4.2.1 Expression und Aufreinigung der rekombinanten L1-Proteinfragmente

Zur Eingrenzung der Sialinsäure-Bindungsstelle im L1 wurden folgende rekombinante L1-Proteinfragmente, die verschiedene Domänen umfassen, ausgewählt: L1-Ig I-VI, L1-FN 1-5, L1-FN 1-2 und L1-FN 3-5 (**Abb. 4.2**). Die Proteinfragmente wurden so gewählt, dass zwei Proteinfragmente (L1-FN 1-5 und L1-FN 1-2) die putative Bindungsstelle in der 1. FN-Domäne enthalten, und zwei der Proteinfragmente (L1-FN 3-5 und L1-Ig I-VI) als Negativkontrollen verwendet wurden. Diese bakteriell exprimierten Proteine wurden bereits in einer Reihe von Studien eingesetzt (Appel *et al.*, 1993; Appel *et al.*, 1995) und sind in **Kapitel 2.6** beschrieben.

Die vier L1-Proteinfragmente wurden wie beschrieben bakteriell exprimiert (s. 3.1.10) und durch Elektroelution (s. 3.1.11) aufgereinigt.





Abb. 4.2: Schematische Darstellung des L1-Moleküls und der verwendeten L1-Proteinfragmente. L1 besitzt 6 Ig-Domänen und 5 FN-Domänen verbunden mit einer Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne. Die verwendeten L1-Proteinfragmente sind durch senkrechte Pfeile an der entsprechenden Struktur des L1 1. gekennzeichnet. Die FN-Domäne mit der angenommenen Bindungsstelle ist grau eingefärbt.

Die Integrität und Reinheit der aufgereinigten Proteine wurden durch Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels (s. 3.1.2) und Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers überprüft (**Abb. 4.3**). Für die



Abb. 4.3: Nachweis der rekombinanten L1-Proteinfragmente. Mittels Silberfärbung (A) und Immunoblot-Analyse (B) unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers wurden die aufgereinigten Proteinfragmente L1-Ig I-VI (A und B: Spur 1), L1-FN 1-5 (A und B: Spur 2), L1-FN 3-5 (A und B: Spur 3) und L1-FN 1-2 (A und B: Spur 4) im SDS-Gel aufgetrennt und nachgewiesen.

verwendeten L1-Proteinfragmente wurden folgende Molekulargewichte, abgeschätzt durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen, beschrieben (Appel et al., 1993): Für L1-lg I-VI 75 kDa, für L1-FN 1-5 58 kDa, für L1-FN 1-2 30 kDa und für L1-FN 3-5 34 kDa. Alle vier L1-Proteinfragmente konnten auf der Höhe der abgeschätzten Molekulargewichte mit ausreichender Reinheit (Abb. 4.3 A) und mit Hilfe des polyklonalen anti-L1-Antikörpers (Abb. 4.3 B) detektiert werden. Sie konnten damit für die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Bindungsstudien verwendet werden.

### 4.2.2 Bindung der L1-Proteinfragmente an CD24

Um nun die Bindungsstelle von CD24 im L1-Molekül näher eingrenzen zu können, wurde die Bindung der im vorigen Kapitel beschriebenen rekombinanten L1-Proteinfragmente Ig I-VI, FN 1-5, FN 1-2 und FN 3-5 an CD24 untersucht (s. 3.1.12).

Dafür wurde aus Maushirn aufgereinigtes CD24 (s. 4.1) als Substrat auf Mikrotiterplatten beschichtet und die Bindung der L1-Proteinfragmente bestimmt. Sowohl für das Fragment L1-Ig I-VI als auch für das Fragment L1-FN 3-5 konnte hier keine Bindung an substratbeschichtetes CD24 nachgewiesen werden (**Abb. 4.4**). Für die Fragmente L1-FN 1-2 und L1-FN 1-5 konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an CD24 gezeigt werden, wobei allerdings die





Abb. 4.4: Bindung der L1-Proteinfragmente Ig I-VI, FN 1-5, FN 1-2 und FN 3-5 an immobilisiertes CD24. Mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit L1-Proteinfragmenten Ig I-VI, FN 1-5, FN 1-2 und FN 3-5 in steigenden Konzentrationen von je 0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM und 200 nM inkubiert (s. 3.1.12). Die Bindung der L1-Fragmente wurde unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers nachgewiesen. Werte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei unabhängigen Experimente.

Bindungskurven der beiden Fragmente unterschiedlich verliefen. Die Bindungskurve des L1-FN 1-2 zeigte einen konzentrationsabhängigen und sättigbaren Verlauf, während die Bindungskurve des Fragmentes L1-FN 1-5 eher linear mit einer geringeren Steigung verlief (**Abb. 4.4**). Der Unterschied der Affinität der beiden L1-Fragmente FN 1-2 und FN 1-5 zu immobilisiertem CD24 könnte durch Unterschiede in der Konformation der L1-Fragmente erklärt werden. Die vermutete Bindungsstelle könnte daher im größeren der beiden Fragmente schlechter zugänglich sein.

Dieses Ergebnis bestätigte als ersten Hinweis die Hypothese, dass die putative Bindungsstelle des CD24 im L1 in der 1. FN-Domäne lokalisiert ist, da für die L1-Proteinfragmente, die die 1. FN-Domäne enthalten (L1-FN 1-2 und L1-FN 1-5), eine Bindung an CD24 nachgewiesen werden konnte, während die beiden anderen L1-Proteinfragmente ohne die angenommene Bindungsstelle (L1-FN 3-5 und L1-Ig I-VI) keine Bindung zeigten. Die Bindungsstelle konnte so zunächst auf das Proteinfragment mit der 1. und 2. FN-Domäne eingegrenzt werden.

# 4.2.3 Gerichtete Mutagenese in der putativen Sialinsäure-Bindungsstelle des L1

Die in **Kapitel 4.2.2** beschriebenen Ergebnisse untermauerten die Hypothese, dass die Sialinsäure-Bindungsstelle im L1 innerhalb der 1. FN-Domäne lokalisiert zu sein scheint. Die Aminosäuresequenz, die durch Sequenzvergleich mit Mitgliedern der *siglec*-Familie als mögliche Bindungsstelle identifiziert wurde (s. 1.3.3), wurde daher näher untersucht. Für die Mitglieder der *siglec*-Familie wurde gezeigt, dass ein hochkonservierter Arginin-Rest von entscheidender Bedeutung für die spezifische Bindung der Sialinsäuren ist, wobei die positiv geladene Seitenkette des Arginins in Wechselwirkung tritt mit der negativ geladenen Carboxylgruppe der Sialinsäure (Vinson *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1997).

Daher wurde die Bedeutung des ebenfalls hochkonservierten Argininrests in der angenommenen Bindungsstelle des L1 für die sialinsäureabhängige Bindung durch gerichtete Mutagenese überprüft. Hierzu wurde das Proteinfragment L1-FN 1-2 verwendet, das eine Bindung an CD24 zeigte (s. 4.2.2). Innerhalb dieses Proteinfragments wurde der konservierte Argininrest (Position 687 in der Aminosäuresequenz des murinen L1) durch gerichtete Mutagenese zu Alanin ausgetauscht (s. 3.2.8). Die Mutagenese wurde durch Sequenzierung der DNS (s. 3.2.10) auf den Austausch des Basentripletts CGG (kodierend für Arginin) zu GCG (kodierend für Alanin) überprüft. Ein Ausschnitt der entsprechenden L1-Aminosäuresequenz mit der gerichteten Mutation ist im Anhang (s. 9.2) angefügt.

Ein die Mutation tragendes Plasmid wurde für die rekombinante Proteinexpression verwendet, das rekombinante Protein wurde mit L1-FN 1-2m bezeichnet. Parallel dazu wurde auch das Fragment L1-FN 1-2 noch einmal exprimiert. Beide wurden parallel, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, bakteriell exprimiert und durch Elektroelution aufgereinigt. Die Integrität und Reinheit der beiden aufgereinigten Proteinfragmente L1-FN 1-2 und L1-FN 1-2m wurden durch Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels (s. 3.1.2) und Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers überprüft. Beide L1-Proteinfragmente konnten mit ausreichender Reinheit auf der Höhe des abgeschätzten Molekulargewichts von 30 kDa detektiert werden (Abb. 4.5 A; Appel et al., 1993). Für die weitere Verwendung der beiden L1-Fragmente war es von Bedeutung, dass der polyklonale anti-L1-Antikörper beide Fragmente gleicherweise detektiert. Dies konnte durch die Immunoblot-Analyse (Abb. 4.5 B)



**Abb. 4.5:** Nachweis und Vergleich der Proteinfragmente L1-FN 1-2 und L1-FN 1-2m. Mittels Silberfärbung (**A**) und Immunoblot-Analyse (**B**) unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers wurden die aufgereinigten L1-Proteinfragmente L1-FN 1-2 (A und B: Spur 1) und L1-FN 1-2m (A und B: Spur 2) im SDS-Gel aufgetrennt und nachgewiesen. (**C**) Mit aufgereinigtem L1-FN 1-2, L1-Fn 1-2m oder BSA in einer Konzentration von 5 μg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit polyklonalem anti-L1-Antikörper in verschiedenen Verdünnungen von 1:16000, 1:8000, 1:2000, 1:1000 und 1:500 inkubiert (s. 3.1.12). Die Bindung des anti-L1-Antikörpers wurde unter Verwendung des HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

und die ELISA-Experimente (**Abb. 4.5 C**), die vor allem zur Überprüfung der strukturellen Integrität des L1-FN 1-2m im Vergleich zum nicht mutierten Fragment dienten, gezeigt werden. In beiden Ansätzen zeigten sich keine Unterschiede in der Detektion des mutierten und nicht mutierten L1-Proteinfragments durch den anti-L1-Antikörper.

Als nächster Schritt wurde die Bindung des mutierten Proteinfragmentes L1-FN 1-2m an CD24 überprüft und mit der Bindung des nicht mutierten L1-FN 1-2 verglichen. Diese Bindungsstudien (s. 3.1.12) zeigten Unterschiede in der Bindung der beiden L1-Proteinfragmente an substratbeschichtetes CD24 (**Abb. 4.6**). Das Protein L1-FN 1-2m zeigte eine schlechtere Bindung an CD24 als das nicht



Abb. 4.6: Bindung der L1-Proteinfragmente FN 1-2 und FN 1-2m an immobilisiertes CD24. Mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit L1-Proteinfragmenten FN 1-2 und FN 1-2m in steigenden Konzentrationen von 0 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM für L1-FN 1-2 und von 0 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM und 500 nM für L1-FN 1-2m inkubiert (s. 3.1.12). Die Bindung der L1-Fragmente wurde unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers nachgewiesen. Werte von drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei unabhängigen Experimente.

mutierte Proteinfragment L1-FN 1-2, die Bindung war um etwa 30 % reduziert. Die beiden Bindungskurven wiesen unterschiedliche Steigungen auf, wobei die

Steigung der Bindungskurve des Proteins L1-FN 1-2m geringer war, was auf eine geringere Affinität zu CD24 hinweisen könnte.

Die Mutation des konservierten Argininrests führte zu anderen Bindungseigenschaften des L1-Proteinfragments FN 1-2m, der Arginin-Rest ist daher für die Bindung von CD24 an L1 von Bedeutung, ist aber nicht allein entscheidend. Das Ergebnis der unterschiedlichen Bindung der beiden Fragmente L1-FN 1-2 und L1-FN 1-2m war ein weiterer Hinweis darauf, dass sich die Bindungsstelle in der angenommenen Region befindet.

### 4.2.4 Bindung der L1-Peptide an CD24

Wie in den vorigen Kapiteln gezeigt wurde, konnte die Sialinsäure-Bindungsstelle im L1 innerhalb des L1-Proteinfragments FN 1-2 lokalisiert werden. Eine weitere Eingrenzung der Bindungsstelle war mit Hilfe der L1-Peptide mit den Bezeichnungen Siabind (s. 2.9) möglich. Diese Peptide präsentieren die als Bindungsstelle angenommene Konsensussequenz (s. 1.3.3) innerhalb der 1. FN-Domäne des L1-Moleküls (**Abb. 4.7**).

	β-sheet −
L1 (Maus)aa678	LSPYVH <b>YTFR</b> VTAINKYG
Siabind	H-LSPYVH <b>YTFR</b> VTAINKYG-OH
Siabind2	Biotin-TSTTLKLSPYVH <b>YTFR</b> VTAINKYGPGEPSPVSESC-NH <sub>2</sub>
Siabind2- <i>scr</i>	Biotin-LEKNSHYISPTSLRGTPAYEGVFTSPTVSKYVPTC-NH2

**Abb. 4.7: Aminosäuresequenzen der L1-Peptide und ihre Lokalisierung im L1-Molekül.** Darstellung der putativen Sialinsäure-Bindungsstelle innerhalb der 1. FN-Domäne des L1 als Auschnitt (*Swissprot accession number* P11627) und der verwendeten L1-Peptide. Die Nummer zeigt die Position der Aminosäure an. Die enthaltene  $\beta$ -Faltblattstruktur ( $\beta$ -*sheet*) innerhalb der Konsensussequenz ist gekennzeichnet. Das putative Bindungsmotiv ist fett unterlegt.

In Bindungsstudien (s. 3.1.12) wurde die Bindung der verschiedenen Peptide an substratbeschichtetes C24 überprüft.

Das Peptid Siabind wurde mit einer Biotingruppe derivatisiert, zeigte aber keine Bindung an CD24 (Daten nicht gezeigt). Das Peptid Siabind2 präsentierte zusätzlich noch weitere flankierende Aminosäuren (s. 2.9 und **Abb. 4.7**) und konnte durch die Derivatisierung mit einer Biotingruppe über die Bindung von Streptavidin nachgewiesen werden. Dieses Peptid zeigte eine konzentrationsabhängige und sättigbare Bindung an immobilisiertes CD24 (**Abb. 4.8**), wobei die Sättigung bei einer Konzentration des Peptids von 25 μg/ml erreicht wurde. Als Kontrolle wurde das Peptid Siabind2-*scrambled* (*scr*), das auch mit einer Biotingruppe derivatisiert war, verwendet. Für dieses Peptid mit der willkürlichen Aminosäuresequenz konnte keine spezifische Bindung an CD24 nachgewiesen werden (**Abb. 4.8**).



**Abb. 4.8: Bindung der biotinylierten L1-Peptide Siabind2 und Siabind2-***scrambled (scr)* an **immobilisiertes CD24.** Mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 in einer Konzentration von 5 μg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit biotinylierten L1-Peptiden Siabind2 und Siabind2-*scr* in steigenden Konzentrationen von 5 μg/ml, 6,25 μg/ml, 10 μg/ml, 15 μg/ml, 20 μg/ml, 25 μg/ml und 50 μg/ml für Siabind2-*scr* inkubiert (s. 3.1.12). Die Bindung der L1-Peptide wurde mit Hilfe von Streptavidin nachgewiesen. Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der unabhängigen Experimente.

Durch diese Ergebnisse war es möglich, die Sialinsäure-Bindungsstelle im L1 weiter einzugrenzen. Diese Bindungsstudien bestätigten die Hypothese, dass die Sialinsäure-Bindungsstelle innerhalb der angenommenen Konsensussequenz der 1. FN-Domäne des L1-Moleküls lokalisiert ist, da das Peptid, das diese Struktur präsentierte, eine spezifische Bindung an CD24 zeigte, während für das Kontrollpeptid keine spezifische Bindung nachweisbar war. Die nicht nachweisbare Bindung des Peptids Siabind an immobilisiertes CD24 kann auf die

kurze Aminosäuresequenz des Peptids zurückgeführt werden, anscheinend sind weitere flankierende Aminosäuren, wie sie im Peptid Siabind2 vorhanden sind, für die dreidimensionale Struktur und für die Bindung der Peptide an CD24 von Bedeutung.

### 4.3 Spezifität der Sialinsäure-Bindungsstelle im L1

Für die Mitglieder der *siglec*-Familie konnte eine Spezifität für die Bindung von terminalen Sialinsäureresten in Abhängigkeit von ihrer Verknüpfung gezeigt werden (Kelm *et al.*, 1994). Um eine mögliche Spezifität der Sialinsäure-Bindungsstelle im L1 zu überprüfen, wurden Kompetitionsexperimente durchgeführt. Dazu wurde die Bindung des L1-Proteinfragments L1-FN 1-2 an substratbeschichtetes CD24 in An- und Abwesenheit verschiedener Zucker mit unterschiedlichen Verknüpfungen der terminalen Sialinsäuren und der folgenden Monosaccharide untersucht (s. 3.1.12).

Wie die **Abbildung 4.9** zeigt, hatte die Anwesenheit von Neuraminsäure (Neu5Ac) oder N-Acetyllactosamin (Galß1-4GlcNAc) kaum Einfluss auf die Bindung des Fragments L1-FN 1-2 an substratbeschichtetes CD24, die nur geringfügig reduziert war. In Anwesenheit von Zuckern, die terminale Sialinsäuren in einer  $\alpha$ 2,3-Verknüpfung tragen, wie 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) und LS-Tetrasaccharid a (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc), kam es aber zu einer Reduktion der Bindung um 30 – 40 %. Diese Reduktion konnte Anwesenheit 6´-Sialyl-N-Acetyllactosamin (Neu5Acα2-6Galβ1bei 4GlcNAc) und LS-Tetrasaccharid b (Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc), die beide eine a2,6-Verknüpfung der Sialinsäuren aufweisen, nicht beobachtet werden. Der Effekt dieser Zucker war vergleichbar mit den Effekten von Neuraminsäure und N-Acetyllactosamin. Die der terminalen Sialinsäure folgenden Monosaccharide und ihre Verknüpfungen hatten keinen Einfluss auf die Kompetition der Bindung, da sich z.B. keine signifikanten Unterschiede der Werte von 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin und LS-Tetrasaccharid a zeigten, die sich in der weiteren Zusammensetzung und Verknüpfung der Monosaccharide unterscheiden. Auch mit höheren molekularen Überschüssen der einzelnen

Zuckerstrukturen ließ sich keine weitere Kompetition der Interaktion von L1-FN 1-2 und CD24 erreichen (Daten nicht gezeigt). Es ist daher möglich, dass sich die



Abb. 4.9: Bindung des L1-FN 1-2 an CD24 in Anwesenheit verschiedener Zucker. 50 nM L1-FN 1-2 wurde mit 200 nM Neuraminsäure (Neu5Ac), 200 nM N-Acetyllactosamin (Galβ1-GlcNAc), 500 nΜ 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin (Neu5Acα2-3Galβ1-4GlcNAc), 500 nΜ 6'-Sialyl-N-Acetyllactosamin (Neu5Aca2-6Galß1-4GlcNAc), 1 mM LS-Tetrasaccharid a (Neu5Acα2-3Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4Glc) oder 1 mΜ LS-Tetrasaccharid b (Neu5Acα2-6Galβ1-3GlcNAc<sub>b1-3</sub>Gal<sub>b1-4</sub>Glc) vorinkubiert und mit mit 5 µg/ml aufgereinigtem CD24 beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert (s. 3.1.12). Die Bindung des L1-FN 1-2 wurde unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antiköprers nachgewiesen. Als Kontrolle gilt der Wert ohne Zusatz eines Zuckers, Werte in % von drei unabhängigen Experimente sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei unabhängigen Experimente. Farblich hervorgehoben und fett dargestellt sind die Verknüpfungen der terminalen Sialinsäuren.

terminalen Sialinsäuren der hier verwendeten Zuckerstrukturen in einem Kontext der folgenden Monosaccharide befinden, der nicht den Zuckerseitenketten des CD24 entspricht, und daher keine vollständige Kompetition möglich ist.

Durch die Kompetition der Bindung des L1-Fragmentes FN 1-2 an CD24 durch die Zuckerstrukturen, die  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren tragen, konnte aber geschlossen werden, dass die angenommene Sialinsäure-Bindungsstelle des L1 spezifisch für  $\alpha$ 2,3-verknüpfte terminale Sialinsäuren ist.

# 4.4 Bedeutung der α2,3-verknüpften Sialinsäuren für das CD24-abhängige Neuritenwachstum

Das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen wird durch CD24 in Abhängigkeit vom Zelltyp gefördert bzw. inhibiert (Kleene *et al.*, 2001). Das Neuritenwachstum der beiden Zelltypen ist in der **Abbildung 4.10** exemplarisch auf verschiedenen beschichteten Substraten gezeigt.



Abb. 4.10: Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen auf verschiedenen Substraten. Kleinhirnneurone (A, B, C) und Hinterwurzelganglienneurone (D, E, F) wurden als Einzelzellkulturen auf mit poly-L-Lysin (B, E), einer Kombination von poly-L-Lysin mit Laminin (A, D) oder mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 (C, F) beschichteten Deckgläschen ausgesät (s. 3.3.2). Die Zellen wurden 24 h kultiviert, fixiert und mit Toluidinblau gefärbt. Der eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 25 μm.

Die Effekte des CD24 auf das Neuritenwachstum der beiden Neuronentypen sind abhängig von terminalen Sialinsäuren des CD24. Es konnte gezeigt werden, dass CD24, was zuvor mit Neuraminidase behandelt wurde, keinen Effekt mehr auf das Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen zeigte (Kleene *et al.*, 2001; s. 1.3.3). Da, wie in **Kapitel 4.3** beschrieben, die α2,3-Verknüpfung der Sialinsäuren für die Interaktion von CD24 und L1 entscheidend ist, wurde ihre Bedeutung für das CD24-abhängige Neuritenwachstum untersucht. Auf dieser Grundlage wurde der Einfluss von 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin und 6'-

Sialyl-N-Acetyllactosamin, für die unterschiedliche Effekte in den Kompetitionsexperimenten der CD24-L1-Interaktion nachgewiesen wurden (s. 4.3), auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum (s. 3.3.2.4) von Kleinhirnneuronen (s. 3.3.2.2) und Hinterwurzelganglienneuronen (s. 3.3.2.3) untersucht.

Kleinhirnneurone zeigten auf substratbeschichtetem CD24 ein gefördertes Neuritenwachstum im Vergleich zum Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (**Abb. 4.11 A**), während die Neuritenlänge der Hinterwurzelganglienneurone auf immobilisiertem CD24 im Vergleich zu poly-L-Lysin um etwa 30 – 35 % reduziert war (**Abb. 4.11** 



Abb. 4.11: Effekte von sialinsäuretragenden Zuckern auf CD24-Neuritenwachstum. abhängiges Kleinhirnneurone (**A**) und Hinterwurzelganglienneurone **(B)** wurden als Einzelzellkulturen auf poly-L-Lysin (PLL) oder einer Kombination von poly-L-Lysin mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 (CD24) beschichteten Deckgläschen ausgesät (s. 3.3.2). Die Zellen wurden 24 h in Anbzw. Abwesenheit von 100 µM 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin (Neu5Aca2-3Galß1-4GlcNAc) oder 100 µM 6'-SialyI-N-Acetyllactosamin (Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAc) kultiviert. Nach Fixieren und Färben der Zellen wurden totale Neuritenlängen pro Zelle der Kleinhirnneuronen (A) und Längen der 3 längsten Neuriten pro Zelle der Hinterwurzelganglienneurone **(B)** bestimmt und in Prozent dargestellt. Der Ansatz auf poly-L-Lysin in Abwesenheit eines Zusatzes diente als Kontrolle und wurde als 100 % festgelegt. Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der unabhängigen Experimente. \*\* p<0,01 (bezogen auf Kontolle PLL oder CD24)

**B**). Anwesenheit von 6'-Sialyl-N-Acetyllactosamin (Neu5Acα2-6Galβ1-In 4GlcNAc) konnten keine signifikanten Unterschiede im Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen auf CD24 im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle ohne Zusatz eines Zuckers detektiert werden (Abb. 4.11 A und **B**). Im Gegensatz dazu beeinflusste die Anwesenheit von 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) das CD24-abhängige Neuritenwachstum beider Zelltypen. Die Neuritenlänge der Kleinhirnneurone auf immobilisiertem CD24 war in Anwesenheit von 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin auf das Niveau der Neuritenlänge auf poly-L-Lysin reduziert (Abb. 4.11 A). Die Neuriten der Hinterwurzelganglienneuronen dagegen waren auf CD24 in Anwesenheit von 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin signifikant länger als in Anwesenheit von 6'-Sialyl-N-Acetyllactosamin oder in Abwesenheit der beiden Zucker (Abb. 4.11 B). Auch hier erreichte das Neuritenwachstum das Niveau der poly-L-Lysin-Kontrolle. Zusätzlich wurden in An- und Abwesenheit von 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin und 6'-Sialyl-N-Acetyllactosamin keine signifikanten Unterschiede in der Neuritenlänge von beiden Zelltypen auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin beobachtet (Abb. 4.11 A und B), so dass toxische oder inhibitorische Effekte der beiden Zucker ausgeschlossen werden konnten. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass das CD24-abhängige Neuritenwachstum der beiden untersuchten Neuronentypen spezifisch durch α2,3-verknüpfte Sialinsäuren des CD24 vermittelt wird.

### 4.5 Charakterisierung der Zuckerseitenketten des CD24

Vorangegangene Arbeiten (s. 1.3.2) und die schon beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass die Glykosylierung des CD24 von großer Bedeutung zu sein scheint. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Glykosylierungsmuster des aus Maushirn aufgereinigten CD24 näher untersucht. In Gehirnhomogenaten von Mäusen konnten drei Hauptglykoformen des CD24 mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 33, 30 und 27 kDa nachgewiesen werden, wobei die 30 kDa- und 33 kDa-Glykoformen  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste trugen, die 30 kDa-Glykoform vom *Datura stramonium agglutinin* detektiert wurde und terminale Mannosereste durch das *Galanthus nivalis agglutinin* nicht nachgewiesen werden konnten (Kleene *et al.*, 2001). Es konnte auch gezeigt werden, dass in einigen hämatopoetischen Zelltypen CD24 das HNK-1-Epitop trägt (Sammar *et al.*, 1994).

Zur Analyse des Glykosylierungsmusters wurde untersucht, ob aus Maushirn aufgereinigtes CD24 neben  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren weitere funktionell wichtige Glykanstrukturen (s. 1.2), wie das HNK-1-Epitop, oligomannosidische Strukturen oder auch das Lewis<sup>x</sup>-Epitop, trägt, und ob sich die gefundenen Strukturen auf N- oder O-verknüpften Glykanen befinden. Für die Analyse wurde aus Maushirn aufgereinigtes CD24 (s. 4.1) mit N-Glycosidase F, um N-verknüpfte Glykane zu entfernen (s. 3.1.13.1), O-Glycosidase und Neuraminidase (s. 3.1.13.2) und O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase (s. 3.1.13.3) behandelt, die sialinsäuretragende O-Glykan-reiche Glykoproteine spaltet. Anschließend wurde das Glykosylierungsmuster mit zuckerspezifischen Antikörpern (s. 3.1.4) und spezifischen Lektinen (s. 3.1.14) überprüft und mit unbehandeltem CD24 und untereinander verglichen.

In der nicht behandelten Kontrolle detektierte der anti-CD24-Antikörper 79 (αdie drei beschriebenen Glykoformen mit einem CD24) scheinbaren Molekulargewicht von 27, 30 und 33 kDa (Abb. 4.12, Spur 1). Nach der Behandlung mit N-Glycosidase F (PNGase F) wurden durch diesen Antikörper drei Banden bei etwa 28, 25 und 24 kDa detektiert (Abb. 4.12, Spur 2), was für eine N-Glykosylierung aller drei Glykoformen spricht. Eine Behandlung von CD24 mit O-Glycosidase und in einer Kombination mit Neuraminidase zeigte keinen Molekulargewichtsshift, die detektierten Banden waren mit der unbehandelten Kontrolle identisch (Daten nicht gezeigt). Die O-Glycosidase scheint daher auch nach vorheriger Entfernung der terminalen Sialinsäuren durch Neuraminidase, die O-verknüpften Zuckerseitenketten des CD24 nicht zu spalten. Dies lässt sich durch die Spezifität der O-Glycosidase für das unsubstituierte Disaccharid Gal
<sup>β</sup>1,3GalNAc erklären. Da so eine Abspaltung der O-verknüpften Glykane des CD24 nicht möglich war, wurde O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase (OSGE) verwendet. Nach Behandlung von CD24 mit der OSGE dagegen war mit dem anti-CD24-Antikörper nur noch die 27 kDa-Glykoform nachzuweisen (Abb. 4.12, Spur 3). Diese Glykoform scheint keine sialinsäuretragenden O-Glykane zu tragen und war daher kein Substrat für die Endopeptidase. Dies wurde bestätigt, da das Lektin *Maackia amurensis agglutinin* (MAA), das spezifisch  $\alpha$ 2,3-verknüpfte



**Abb. 4.12: Analyse des Glykosylierungsmusters von aufgereinigtem CD24.** Aus Maushirn aufgereinigtes CD24 (Kontrolle; Spur 1, 4, 7, 10 und 13), aufgereinigtes CD24 behandelt mit N-Glycosidase F (PNGase F; Spur 2, 5, 8, 11 und 14) und aufgereinigtes CD24 behandelt mit O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase (OSGE; Spur 3, 6, 9, 12 und 15) wurden durch Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) unter Verwendung des anti-CD24- Antikörpers 79 ( $\alpha$ -CD24; Spur 1, 2 und 3), des Antikörpers 412, gerichtet gegen HNK-1, ( $\alpha$ -HNK-1; Spur 10,11 und 12) und des Antikörpers L5, gerichtet gegen Lewis<sup>x</sup>, ( $\alpha$ -Lewis<sup>x</sup>; Spur 13, 14 und 15) oder durch Lektine (s. 3.1.14) wie *Maackia amurensis agglutinin* (MAA; Spur 4,5 und 6) und *Datura stramonium agglutinin* (DSA; Spur 7,8 und 9) untersucht. Die Positionen der verschiedenen Glykoformen des CD24 sind durch Pfeile markiert.

Sialinsäuren erkennt, in der unbehandelten Kontrolle lediglich die 33 kDa- und 30 kDa- Glykoformen detektierte (**Abb. 4.12**, Spur 4) und nicht die 27 kDa-Glykoform. Nach Behandlung mit PNGase F wurden zwei Banden bei 28 und 25 kDa durch das Lektin MAA erkannt (**Abb. 4.12**, Spur 5), während nach OSGE-Behandlung keine Bande mehr nachgewiesen werden konnte (**Abb. 4.2**, Spur 6). Durch das Lektin *Datura stramonium agglutinin* (DSA) konnte in der unbehandelten Probe die 30 kDa-Glykoform nachgewiesen werden (**Abb. 4.12**, Spur 7), nach Behandlung mit PNGase F (**Abb. 4.12**, Spur 8) oder OSGE (**Abb. 4.12**, Spur 9) zeigte das Lektin aber keine Reaktivität mehr. Der gegen das HNK-1-Epitop gerichtete Antikörper ( $\alpha$ -HNK-1) erkannte in der unbehandelten Kontrolle die 30 kDa- und 33 kDa-Glykoformen (**Abb. 4.12**, Spur 10) und nach PNGase F-Behandlung die 28 kDa- und 25 kDa-Glykoformen (**Abb. 4.12**, Spur 11). Der

gegen das Lewis<sup>x</sup>-Epitop gerichtete Antikörper ( $\alpha$ -Lewis<sup>x</sup>) dagegen detektierte nur die 33 kDa-Glykoform des unbehandelten CD24 (Abb. 4.12, Spur 13) und die 28 kDa-Glykoform nach PNGase F-Behandlung (Abb. 4.12, Spur 14). Keiner der beiden Antikörper detektierte noch eine Bande nach Behandlung von CD24 mit OSGE (Abb. 4.12, Spur 12 und 15). Die Antikörper, die oligomannosidische Zuckerstrukturen erkennen (L3, L4; s. 2.8.1), detektierten keine der drei Glykoformen des unbehandelten CD24 (Daten nicht gezeigt) und unterstützen so die oben beschriebenen Ergebnisse des Galanthus nivalis agglutinins, dass auf den Zuckerseitenketten des CD24 keine oligomannosidischen Zucker nachzuweisen sind,

Zusammenfassend folgte daraus, dass die 33 kDa-Glykoform des CD24 das Lewis<sup>x</sup>-Epitop, das HNK-1-Epitop und  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste auf O-Glykanen trägt, während die 30 kDa-Glykoform das HNK-1-Epitop und  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren auf O-Glykanen trägt. Die 27 kDa-Glykoform dagegen scheint keine  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, kein Lewis<sup>x</sup>-Epitop oder HNK-1-Epitop auf O-Glykanen zu tragen. Alle drei der beschriebenen Glykoformen tragen N-verknüpfte Glykane, wobei diese aber keine detektierbaren Mengen des Lewis<sup>x</sup>-Epitops, HNK-1-Epitops und  $\alpha$ 2,3-verknüpfter Sialinsäuren zu tragen scheinen.

### 4.6 Funktionelle Bedeutung der O-Glykane des CD24

Wie im vorigen Kapitel gezeigt wurde, sind wichtige Zuckerepitope, wie das Lewis<sup>x</sup>-Epitop, das HNK-1-Epitop und  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, auf den O-Glykanen des CD24 detektierbar. Um zu untersuchen, ob die O-Glykane und/oder die N-Glykane für die Eigenschaften des CD24 entscheidend sind, wurde die funktionelle Rolle der Glykosylierung im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Bindung an L1 (s. 4.6.1) und für das CD24-abhängige Neuritenwachstum (s. 4.6.2) untersucht. Um die Bedeutung der O-Glykane des CD24 zu untersuchen, wurde aufgereinigtes CD24 mit N-Glycosidase F behandelt (s. 3.1.13.1), um die N-verknüpften Zuckerseitenketten abzuspalten, und wurde in Bindungsstudien und Neuritenwachstumsexperimenten eingesetzt und mit nicht deglykosyliertem CD24 verglichen. Komplementäre Experimente mit CD24, das nach enzymatischer Behandlung N-Glykane aber keine O-Glykane trägt, sind nicht möglich. Gründe hierfür sind die schon in **Kapitel 4.5** beschriebenen Schwierigkeiten mit der verwendeten O-Glycosidase. Auch CD24, das mit O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase (OSGE) behandelt wurde, kann in diesem Zusammenhang nicht verwendet werden, da durch die Behandlung mit OSGE keine Zuckerseitenketten abgespalten werden, sondern Peptidfragmente entstehen, die weiterhin O-glykosidisch verknüpfte Zucker tragen. Daher werden in den folgenden Unterkapiteln nur die Experimente nach Behandlung des CD24 mit N-Glycosidase F beschrieben.

### 4.6.1 Bedeutung der O-Glykane des CD24 für die Bindung an L1

Das durch Behandlung mit N-Glycosidase F (PNGase F) N-deglykosylierte CD24 wurde mit nicht deglykosyliertem CD24 in Bindungsstudien (s. 3.1.12) verglichen. Beide Ansätze wurden als Substrate auf Mikrotiterplatten beschichtet, und die Bindung des Proteinfragments L1-FN 1-2 an die beiden Substrate wurde überprüft.

Hier zeigte sich, dass das L1-Proteinfragment L1-FN 1-2 sowohl an nicht deglykosyliertes CD24, das als Kontrollansatz parallel nur ohne Zugabe von Enzym behandelt wurde, als auch an das mit PNGase F behandelte CD24 bindet. Die beiden Bindungskurven zeigten einen nahezu identischen, dosisabhängigen und sättigbaren Verlauf (**Abb. 4.13**). Das Ergebnis war ein Hinweis darauf, dass die O-Glykane des CD24 die Bindung an L1-FN 1-2 vermitteln und die N-Glykane für diese Bindung nicht entscheidend zu sein scheinen.



Abb. 4.13: Bindung des Proteinfragments L1-FN 1-2 an immobilisiertes N-deglykosyliertes CD24. Mit aus Mausgehirn aufgereinigtem kontrollbehandletem CD24 (CD24 – PNGase F) oder N-deglykosyliertem CD24 (CD24 + PNGase F) (s. 3.1.13.1) in einer Konzentration von 5 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit L1-FN 1-2 in steigenden Konzentrationen von 0 nM, 25 nM, 75 nM, 200 nM, 300 nM und 500 nM inkubiert (s. 3.1.12). Die Bindung des L1-FN 1-2 wurde unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers nachgewiesen. Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der drei unabhängigen Experimente.

### 4.6.2 Bedeutung der O-Glykane des CD24 für das CD24-abhängige Neuritenwachstum

Ebenso wie für die Bindung an L1 wurde auch die Bedeutung der O-Glykane des CD24 für das CD24-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen untersucht. Auch hier wurden die N-verknüpften Glykane des CD24 durch Behandlung mit N-Glycosidase F (s. 3.1.13.1) abgespalten. Dieses N-deglykosylierte CD24 wurde wie ein Kontrollansatz, der parallel gleicherweise behandelt wurde, allerdings ohne Zugabe von Enzym, und unbehandeltem CD24 in Primärkulturexperimenten der beiden Zelltypen (s. 3.3.2.2 und 3.3.2.3) eingesetzt und das Neuritenwachstum ermittelt (s. 3.3.2.4).



Abb. 4.14: Effekt der N-Glykosylierung des CD24 auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum. Kleinhirnneurone (**A**) und Hinterwurzelganglienneurone (**B**) wurden als Einzelzellkulturen auf poly-L-Lysin (PLL), einer Kombination von poly-L-Lysin mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 (CD24), mit kontrollbehandeltem CD24 (CD24 – PNGase F) oder mit N-deglykosyliertem CD24 (CD24 + PNGase F) beschichteten Deckgläschen ausgesät und 24 h in Kultur gehalten (s. 3.3.2). Nach Fixieren und Färben der Zellen wurden totale Neuritenlängen pro Zelle der Kleinhirnneuronen (**A**) und Längen der 3 längsten Neuriten pro Zelle der Hinterwurzelganglienneurone (**B**) bestimmt und in Prozent dargestellt. Der Ansatz auf poly-L-Lysin in Abwesenheit eines Zusatzes diente als Kontrolle und wurde als 100 % festgelegt. Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der unabhängigen Experimente. \* p<0,5, \*\* p<0,01 (bezogen auf Kontrolle PLL)

Das Neuritenwachstum der Kleinhirnneurone war auf substratbeschichtetem CD24 im Vergleich zum Kontrollsubstrat poly-L-Lysin erhöht (Abb. 4.14 A). Ebenso wie das unbehandelte CD24 (CD24) förderten auch das CD24 des Kontrollansatzes (CD24 - PNGase F) und das N-deglykosylierte CD24 (CD24 + PNGase F) das Neuritenwachstum der Kleinhirnneurone im Vergleich zur Kontrolle des poly-L-Lysins. Die Neuritenlängen auf dem Kontrollansatz (CD24 -PNGase F) und N-deglykosyliertem CD24 (CD24 + PNGase F) waren nahezu identisch und zeigten wie auf unbehandeltem CD24 signifikante Unterschiede zur 4.14 Neuritenlänge auf poly-L-Lysin (Abb. **A**). Die Neuriten der Hinterwurzelganglienneurone dagegen waren auf immobilisiertem unbehandeltem CD24 (CD24) signifikant kürzer als auf poly-L-Lysin (Abb. 4.14 B). Diese Inhibition des Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneurone konnte ebenso auf dem Kontrollansatz (CD24 – PNGase F) und N-deglykosyliertem CD24 (CD24 + PNGase F) beobachtet werden, beide zeigten die gleiche Inhibition des Neuritenwachstums um etwa 30 %, die sich auch auf unbehandeltem CD24 (CD24) zeigte (**Abb. 4.14 B**). Für beide Neuronentypen zeigte sich hier, dass eher die O-Glykane als die N-Glykane des CD24 für die vermittelten Effekten auf das beschriebene Neuritenwachstum von Bedeutung sind.

# 4.7 Bedeutung des Lewis<sup>x</sup>-Epitops für das CD24-abhängige Neuritenwachstum

Wie die Charakterisierung der Zuckerseitenketten des CD24 zeigte, trägt aus Maushirn aufgereinigtes CD24 neben  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren auch das Lewis<sup>x</sup>-Epitop und das HNK-1-Epitop (s. 4.5). Da diese funktionell wichtigen Epitope alle auf O-Glykanen detektiert werden konnten und die O-Glykane des CD24 für die CD24-vermittelten Effekte auf das untersuchte Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen von Bedeutung sind (s. 4.6.2), wurde untersucht, ob neben  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren (s. 4.4) auch das Lewis<sup>x</sup>-Epitop und/oder das HNK-1-Epitop das CD24-abhängige Neuritenwachstum beeinflussen. Daher wurde CD24-abhängige das Neuritenwachstum (s. 3.3.2.4) von Kleinhirnneuronen (s. 3.3.2.2) und Hinterwurzelganglienneuronen (s. 3.3.2.3) in Anwesenheit von Lewis<sup>x</sup> (s. 2.10) und den glykanspezifischen Antikörpern gerichtet gegen Lewis<sup>x</sup> oder HNK-1 (s. 2.8.1) untersucht.

Wie schon in **Kapitel 4.4** und **4.6.2** beschrieben, zeigten auch hier Kleinhirnneurone auf substratbeschichtetem CD24 ein gefördertes Neuritenwachstum im Vergleich zum Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (**Abb. 4.15 A**), während die Neuritenlänge der Hinterwurzelganglienneurone auf CD24 im Vergleich zu poly-L-Lysin um etwa 30 – 35 % reduziert war (**Abb. 4.15 B**). In Anwesenheit von Lewis<sup>x</sup> war weder die Förderung (**Abb. 4.15 A**) noch die Inhibition (**Abb. 4.15 B**) des CD24-abhängigen Neuritenwachstums der Kleinhirnbzw. der Hinterwurzelganglienneurone nachzuweisen. Die Neuriten beider



Abb. 4.15: Effekte des Lewis<sup>x</sup>-Epitops und des HNK-1-Epitops auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum. Kleinhirnneurone (**A**) und Hinterwurzelganglienneurone **(B)** wurden als Einzelzellkulturen auf poly-L-Lysin (PLL) oder einer Kombination von poly-L-Lysin mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 (CD24) beschichteten Deckgläschen ausgesät (s. 3.3.2). Die Zellen wurden 24 h in Anbzw. Abwesenheit von 10 μM Lewisx, 10 μM Lewisa, des monoklonalen gegen Lewisx gerichteten Antikörper (L5), α- Lewis<sup>x</sup>, oder des gegen HNK-1 gerichteten Antikörper (412), α-HNK-1, kultiviert. Nach Fixieren und Färben der Zellen wurden totale Neuritenlängen pro Zelle der Kleinhirnneuronen (A) und Längen der 3 längsten Neuriten pro Zelle der Hinterwurzelganglienneurone (B) bestimmt und in Prozent dargestellt. Der Ansatz auf poly-L-Lysin in Abwesenheit eines Zusatzes diente als Kontrolle und wurde als 100 % festgelegt. Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der unabhängigen Experimente. \*\* p<0,01 (bezogen auf Kontolle PLL oder CD24)

Zelltypen zeigten in Anwesenheit von Lewis<sup>x</sup> etwa gleiche Längen wie auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin und signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Neuritenlängen auf CD24 ohne Zusatz von Lewis<sup>x</sup>. Als Kontrolle diente die Anwesenheit von Lewis<sup>a</sup>, das sich in den Verknüpfungen der Monosaccharide von Lewis<sup>x</sup> unterscheidet. Weder die Neuritenlängen der Kleinhirnneurone (Abb. 4.15 A) noch die der Hinterwurzelganglienneurone (Abb. 4.15 B) waren bei Anwesenheit von Lewis<sup>a</sup> im Vergleich zur Kontrolle auf immobilisiertem CD24 ohne Zusatz eines Zuckers signifikant verändert. Die Anwesenheit des gegen Lewis<sup>x</sup> gerichteten Antikörpers ( $\alpha$ -Lewis<sup>x</sup>) beeinflusste ebenso wie die Anwesenheit von Lewis<sup>x</sup> das CD24-abhängige Neuritenwachstum

Die Neuriten der Kleinhirnneurone der beiden Zelltypen. zeigten auf substratbeschichtetem CD24 in Anwesenheit des anti-Lewis<sup>x</sup>-Antikörpers eine Länge vergleichbar mit der auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (Abb. 4.15 A), die Förderung des Neuritenwachstum durch CD24 war nicht mehr nachzuweisen. Die Inhibition des Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneurone, die durch CD24 vermittelt wird, wurde durch die Anwesenheit des anti-Lewis<sup>x</sup>-Antikörpers ebenso aufgehoben. Die Neuritenlänge auf immobilisiertem CD24 erreichte in Anwesenheit des Antikörpers das Niveau der Neuritenlänge auf poly-L-Lysin (Abb. 4.15 B). Im Gegensatz dazu waren die Neuritenlängen der Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneurone auf CD24 in Anwesenheit des gegen HNK-1 gerichteten Antikörpers (a-HNK-1) im Vergleich zur Kontrolle auf CD24 ohne Zusatz des Antikörpers nicht verändert (Abb. 4.15 A und B). Dieser Antikörper zeigte unter den gewählten und untersuchten Bedingungen keinen Einfluss auf das CD24-abhängige Neuritenwachstum beider Zelltypen. Zusätzlich beeinflusste keine der zugegebenen Komponenten (Lewis<sup>x</sup>, Lewis<sup>a</sup>, anti-Lewis<sup>x</sup>-Antikörper oder anti-HNK-1-Antikörper) das Neuritenwachstum auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (Daten nicht gezeigt), so dass unspezifische und toxische Effekte ausgeschlossen werden konnten. Die Ergebnisse machen deutlich, dass neben  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren auch das Lewis<sup>x</sup>-Epitop eine Bedeutung für das CD24-abhängige Neuritenwachstum hat.

# 4.7.1 Einfluss eines L-Fucose-Replika-Peptids auf das CD24-abhängige Neuritenwachstum

Sowohl Lewis<sup>x</sup> als auch der gegen Lewis<sup>x</sup> gerichtete Antikörper beeinflussten das CD24-abhängige Neuritenwachstum Kleinhirnvon und Hinterwurzelganglienneuronen in der Weise, dass die durch CD24-vermittelten Effekte der Förderung bzw. Inhibition jeweils aufgehoben werden (s. 4.7). Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurde der Einfluss eines L-Fucose-**Replika-Peptids** auf das Neuritenwachstum der Kleinhirnund Hinterwurzelganglienneuronen untersucht. Dieses Peptid, bezeichnet als 5743 (s.

2.9), stellt ein L-Fucose mimikrierendes Peptid dar (Franke, 2004) und ist damit dem Lewis<sup>x</sup>-Epitop, das einen L-Fucose-Rest trägt, ähnlich.

Das Neuritenwachstum der Kleinhirnneurone wurde auf substratbeschichtetem CD24 im Vergleich zur Kontrolle auf poly-L-Lysin gefördert (**Abb. 4.16 A**). In Anwesenheit des Peptids 5743 wurde das Neuritenwachstum nicht so stark gefördert wie in Abwesenheit des Peptids, allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 4.16 A**). Die Neuritenlänge der Kleinhirnneurone war dagegen noch weiter in Anwesenheit des Peptids 5743 *scrambled (scr)* 



Abb. 4.16: Effekte eines L-Fucose-Replika-Peptids auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum. Kleinhirnneurone (A) Hinterwurzelganglienneurone und (**B**) wurden als Einzelzellkulturen auf poly-L-Lysin (PLL) oder einer Kombination von poly-L-Lysin mit aus Mausgehirn CD24 (CD24) aufgereinigtem beschichteten Deckgläschen ausgesät (s. 3.3.2). Die Zellen wurden 24 h in An- bzw. Abwesenheit von 100 µg/ml Peptid 5743 oder 100 µg/ml Peptid 5743 scr kultiviert. Nach Fixieren und Färben der Zellen wurden totale Neuritenlängen pro Zelle der Kleinhirnneuronen (A) und Längen der 3 längsten Neuriten pro Zelle der Hinterwurzelganglienneurone **(B**) bestimmt und in Prozent dargestellt. Der Ansatz auf poly-L-Lysin in Abwesenheit eines Zusatzes diente als Kontrolle und wurde als 100 % festgelegt. Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der unabhängigen Experimente. \* p<0,05, \*\* p<0,01 (bezogen auf Kontolle PLL oder CD24)

reduziert, hier konnten auch signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 4.16 **A**). Dieses Peptid 5743 scr mit seiner willkürlichen Aminosäureseguenz wurde als Kontrolle verwendet, zeiate aber einen ausgeprägteren Effekt auf das CD24-abhängige Neuritenwachstum als das L-Fucose mimikrierende Peptid 5743. Beide Peptide zeigten aber keine Effekte auf das Neuritenwachstum der Kleinhirnneuronen auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (Abb. 4.16 A). Die Hinterwurzelganglienneuronen zeigten ein signifikant inhibiertes Neuritenwachstum auf immobilisiertem CD24 (Abb. 4.16 B). In Anwesenheit des Peptids 5743 war eine Reduzierung der Inhibition nachzuweisen, die Neuriten waren signifikant länger als in Abwesenheit des Peptids (Abb. 4.16 B). Allerdings war der gleiche Effekt in Anwesenheit des Kontrollpeptids 5743 scr mit einer großen Streuung der Werte nachzuweisen. Ebenso wie für die Neuritenlängen der Kleinhirnneuronen konnte für die Hinterwurzelganglienneuronen kein spezifischer Effekt des L-Fucose mimikrierenden Peptids gezeigt werden, da auch hier das Kontrollpeptid 5743 scr einen Einfluss auf das CD24-abhängige Neuritenwachstum zeigte. Zusätzlich beeinflussten beide Peptide die Neuritenlängen der Hinterwurzelganglienneurone auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (Abb. 4.16 B). Die Neuritenlängen waren im Vergleich zur Kontrolle in Abwesenheit der Peptide reduziert, aufgrund der hohen Streuung der Werte waren aber keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Diese Beeinflussung des Neuritenwachstums auf poly-L-Lysin war ein weiterer Hinweis auf unspezifische Effekte der beiden Peptide 5743 und 5743 scr. Die Eigenschaft des Peptids, L-Fucose zu mimikrieren, war unter den hier gewählten Bedingungen nicht ausreichend, um das CD24-abhängige Neuritenwachstum zu modulieren. Basierend auf diesen Ergebnissen ist eine eindeutige Aussage über die Bedeutung des L-Fucose mimikrierenden Peptids 5743 auf das CD24abhängige Neuritenwachstum nicht möglich, die Ergebnisse der Bedeutung des Lewis<sup>x</sup> für das CD24-abhängige Neuritenwachstum, die in Kapitel 4.7 beschrieben wurden, konnten so nicht bestätigt werden.

# 4.8 Bedeutung von α2,3-verknüpften Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup> für das Neuritenwachstum der Kleinhirnneuronen

Es konnte gezeigt werden, dass das CD24-abhängige Neuritenwachstum von  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren abhängig ist (s. 4.4). Ebenso scheint auch das Lewis<sup>x</sup>-Epitop für das Neuritenwachstum von Bedeutung zu sein (s. 4.7). Auf dieser Grundlage wurde überprüft, ob diese Glykanstrukturen schon für die Vermittlung der Effekte auf das Neuritenwachstum ausreichend sind. Daher wurde das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen (s. 3.3.2.2) auf substratbeschichteten Glykan-BSA-Konjugaten (s. 2.10) untersucht und mit CD24-abhängigen Neuritenwachstum verglichen.

Die Kleinhirnneurone zeigten das CD24-abhängige geförderte Neuritenwachstum im Vergleich zum Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (**Abb. 4.17**). Sowohl das 3'-Sialyl-



Abb. 4.17: Effekte des 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin-BSA-Konjugats und Lewisx-BSA-Konjugats auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen. Kleinhirnneurone wurden als Einzelzellkulturen auf poly-L-Lysin (PLL), einer Kombination von poly-L-Lysin mit aus Mausgehirn aufgereinigtem 5 µg/ml CD24 (CD24), mit 100 mg/ml 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin-BSA (Neu5Aca2-3Gal-GlcNAc-BSA), mit 20 µg/ml Lewis×-BSA oder einer Kombination aus 100 mg/ml 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin-BSA (Neu5Aca2-3Gal-GlcNAc-BSA) und 20 µg/ml Lewisx-BSA beschichteten Deckgläschen ausgesät und 24 h in Kultur gehalten (s. 3.3.2). Nach Fixieren und Färben der Zellen wurden totale Neuritenlängen pro Zelle der Kleinhirnneuronen bestimmt und in Prozent dargestellt. Der Ansatz auf poly-L-Lysin diente als Kontrolle und wurde als 100 % festgelegt. Werte von zwei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der unabhängigen Experimente. p<0,5 (bezogen auf Kontrolle PLL)

Seite 98

N-Acetyllactosamin-BSA-Konjugat (Neu5Aca2-3Galß1-4GlcNAc-BSA) als auch Lewis<sup>x</sup>-BSA-Konjugat hatten jeweils keinen Einfluss auf die Neuritenlängen der Kleinhirnneurone. Die ermittelten Neuritenlängen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu der Neuritenlänge auf poly-L-Lysin. Eine Kombination von 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin-BSA-Konjugat und Lewis<sup>x</sup>-BSA-Konjugat führte auch zu Förderung des Neuritenwachstums der Kleinhirnneurone, keiner die Neuritenlänge war vergleichbar mit der auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (Abb. 4.17). Auch weitere eingesetzte Konzentrationen der BSA-Konjugate zeigten keine anderen Effekte (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung von N-Acetyllactosamin-BSA diente als Kontrolle und zeigte keine Beeinflussung des Neuritenwachstums (Daten nicht gezeigt). Die Zuckerstrukturen 3'-Sialyl-N-Acetvllactosamin und Lewis<sup>x</sup> scheinen daher allein jeweils nicht ausreichend zu sein, um das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen zu beeinflussen. Da auch die Kombination der beiden Glykan-BSA-Konjugate keine Effekte zeigte, könnte auch die räumliche Anordnung der beiden Zuckerepitope zueinander von Bedeutung sein, um Effekte auf das Neuritenwachstum der Kleinhirnneuronen haben zu können.

### 4.9 Rezeptoren des Lewis<sup>x</sup>-Epitops

Wie die in den vorigen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse deutlich machen, sind Sialinsäuren Lewis<sup>x</sup>-Epitop α2,3-verknüpfte und das des CD24 von entscheidender Bedeutung für das CD24-abhängige Neuritenwachstum der Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen. Die Effekte des CD24 auf das Neuritenwachstum der beiden Neuronentypen wurden in Anwesenheit eines Kompetitionspartners wie 3'-Sialyl-N-Acetyllactosamin (s. 4.4) aufgehoben, ebenso wenn das immobilisierte CD24 keine terminalen Sialinsäuren mehr trug (Kleene et al., 2001). Als Bindungspartner für die Sialinsäuren konnte das Zelladhäsionsmolekül L1 identifiziert werden, das für das CD24-abhängige Neuritenwachstum auch von Bedeutung ist (s. 1.3.3). Ebenso scheint auch das Lewis<sup>x</sup>-Epitop des CD24 für das CD24-abhängige Neuritenwachstum von Bedeutung zu sein, da sowohl durch die Anwesenheit von Lewis<sup>x</sup> als

Kompetitionspartner als auch die des gegen das Lewis<sup>x</sup>-Epitop gerichteten Antikörpers jeweils die CD24-vermittelten Effekte auf das Neuritenwachstum der Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen aufgehoben wurden (s. 4.7). Für das CD24-abhängige Neuritenwachstum der beiden Zelltypen sind daher die gleichen Komponenten, wie das Zelladhäsionsmolekül L1, α2,3-verknüpfte Sialinsäuren und das Lewis<sup>x</sup>-Epitop des CD24, von entscheidender Bedeutung. Allerdings ist Erklärung der unterschiedlichen Effekte der SO eine Kleinhirnund Hinterwurzelganglienneuronen wie die Förderung bzw. Inhibition des CD24abhängigen Neuritenwachstums bisher nicht möglich. Eine Erklärungsmöglichkeit für die Förderung des CD24-abhängigen Neuritenwachstums der Kleinhirnneuronen und die Inhibition des CD24-abhängigen Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneuronen ist, dass noch weitere Proteine zusätzlich zu L1 und CD24 an den CD24-vermittelten Effekten beteiligt sein könnten und dass diese Proteine für die verschiedenen Zellantworten der beiden Neuronentypen von Bedeutung sind. Vorstellbar wären hier Proteine, die mit Lewis<sup>x</sup> interagieren, da auch Lewis<sup>x</sup> das CD24-abhängige Neuritenwachstum beeinflusst. Daher wurden Experimente zur Identifizierung eines möglichen Lewis<sup>x</sup>-Rezeptors (s. 4.9.1, 4.9.2 und 4.9.3), seine mögliche Verbindung zu CD24 (s. 4.9.4) und mögliche Beeinflussung des CD24-abhängigen Neuritenwachstums (s. 4.9.5) durchgeführt.

### 4.9.1 Identifizierung putativer Lewis<sup>x</sup>-Rezeptoren

Als erster Schritt wurden Sequenzvergleiche mit Lektinen, die Spezifität für die Bindung von fucosetragenden Oligosacchariden oder Lewis<sup>x</sup> zeigen, und neuralen Zelladhäsionsmolekülen durchgeführt (R. Kleene).

Hier konnten Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen zwischen einigen fucosespezifischen Pflanzenlektinen mit den neuralen Zelladhäsionsmolekülen TAG-1 und F3/Contactin gezeigt werden (R. Kleene, unveröffentlichte Ergebnisse). Sequenzähnlichkeiten waren für das *Ulex europaeus* Lektin II und das *Pisum sativum* Agglutinin nachzuweisen (**Abb. 4.18 A**). Ebenso waren Ähnlichkeiten für das *Cytisus sessilifolius* Lektin I, *Laburnum alpinum* Lektin I und

Α			
TAG-1	39	PVFEEOPVGLLEPEESAEDOVTLACRARASPPATYRWKMNGTEMN 83	
F3	41	PIFEEOPINTIYPEESLEGKVSLNCRARASPFPVYKWRMNNGDVD 85	
Pea	115	PV-DTKP-QTGGGYLGVF-NSAEYDKTTQTVAV-EFDTFYNAAWDPS 158	
UEA	97	PANSQIPSGSSAGMFGLFCSSNDSKSSNQIIAV-EFDTYFGKTYN-PW-DPD 145	
TAG-1	84	LEPGSRHQLMGGNLVIMSPT-KAQDAGVYQCLASNPVGTVVSKEAVLRFG 132	
F3	86	LTN-DRYSMVGGNLVINNPD-KQKDAGVYYCLASNNYGMVRSTEATLSFG 133	
Pea	159	NRDRHIGIDVNSIKSVNT-KSWKLQNGEEANVVIAFNAATNVLTVSLTYP 210	
UEA	146	FKHIGIDVNSIKSIKTVK-WDWRNGEVADVVITYRAPTKSLTVSLSYP 192	
B			
LTA	1	VSFNYTEFKDDGSLILQGDAKIWTDGRLAMPTDPLV-NNP-KT	41
TAG-1	46	VGLLFPEESAEDKVTLACRARASPPATYRWKMNGTEMNLEPGSRHQLMGGNLVISNPVK-	104
F3	48	INTIYPEESLEGKVSLNCRARASPFPVYKWRMNNGDVDLTND-RYSMVGGNLVINNPDK-	105
LTA	42	TRSAGRALYATPVPIWDSATGNVASFVISFN	72
TAG-1	105	AKDAGSYQCVASNPVGTVVSKEAVLRFGFLQEFSKEERDPVKTHEGWGVMLPCNPPAHYP	164
F3	106	<u>O</u> KDAGVYYCLASNNYGMVRSTEATLSFGYLDPFPPEERPEVKVKEGKGMVLLCDPPYHFP	165
LTA	73	FLFVIRELK-YTPTDGLVFFLAPVGTEIPSGSTGGFLGIFDGSNGF	117
TAG-1	165	-GLSYRWLLNEFPNFIPTDGRHFVSQTTGNLYIARTNASDLGNYSCLATSHLDFSTKSVF	223
F.3	166	DDF2AKMFFWFF.5AF.1.IWDKIKKFA2Ö.INGUFATUUAF22DKGUA2CFA22522F-ltK2AF	223
LTA	118	NQFVAVEFDSYHN-IWDPKSLRSSHVGIDVNSIMS-LKAVNWNRVSGSLE	165
TAG-1	224	SKFAQLNLAAEDARLFAPSIKARFPPETYALIGQQVTLECFAFGNPVPQIKWRKVDGSLS	284
F3	224	SKE TERTETERI IKEIEADI AAĞEKDI AIMMGÖNALPECEYPENDAKMKKAREAME	283
LTA	166	KATIIYDSQTNILSVVMTSQNGQITTIYGTID-LKTVLP	203
TAG-1	285	POWLSSEPLEHIOSVDF-EDEGTYECEAENSKGRDIVO-GRII-IHAQPEWLKVISD	331
гJ	284	2145 21264Arvfth16rfnf6r1fcfyfu1k6knku8-ykfth66456MAFHIUD	339
LTA	204	EKVSVGFS-ATTGNPEREKHDIYSWSFTSTLK-EPEEQA	240
TAG-1 E3	338	TEADIGSDLKWSCVASGKPRPMVRWLRNGEPLASONRVEVLAGDLRFS-KLNLEDSG	393 396
гJ	540	TRANTARNTACHYTAVETETTVMPVNATSTUVAENVIIThAItERNYAMITK/HENY	ンプロ

Abb. 4.18: Sequenzvergleich von TAG-1 und F3/Contactin mit fucosespezifischen Lektinen (R. Kleene). (A) Die Sequenzen der 1. lg-Domäne von murinem TAG-1 (*Swissprot accession number* Q61330) und F3 (*Swissprot accession number* P12960) sind gezeigt. Sequenzvergleiche zeigen Ähnlichkeiten mit Pflanzenlektinen wie *Ulex europaeus* Lektin II (UEA; *Swissprot accession number* P22973) und *Pisum sativum* Agglutinin (Pea; *Swissprot accession number* P02867). Die Nummern zeigen die Positionen der Aminosäuren an. Identische Aminosäuren sind dunkelgrau hinterlegt. (B) Die Sequenzen der ersten vier Ig-Domänen von murinem TAG-1 und F3 und des *Lotus tetragonolobus* Lektins (LTA; *Swissprot accession number* P19664) sind gezeigt. Die Nummern zeigen die Positionen der Aminosäuren an. Identische Aminosäuren sind dunkelgrau hinterlegt. Umrahmte Aminosäuren in Sequenzen von TAG-1 oder F3 zeigen Unterschiede in der Aminosäuresequenz des einen Zelladhäsionsmoleküls während das andere identische (dunkelgrau hinterlegt) oder ähnliche (hellgrau hinterlegt) Aminosäuren im Vergleich zur Lektinsequenz trägt. Regionen mit hoher Ähnlichkeit sind zusätzlich durch einen Balken oberhalb der Sequenzen markiert.
*Lathyrus ochrus* Lektin β1 und β2 zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Für diese Lektine konnte gezeigt werden, dass sie eine Bindung von fucosetragenden Oligosacchariden zeigen (Konami *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992; Sokolowski *et al.*, 1997). Die Sequenzähnlichkeiten der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mit den verschiedenen Lektinen waren bei beiden Proteinen innerhalb der 1. Ig-Domäne zu finden (**Abb. 4.18 A**). Ein weiterer Sequenzvergleich der ersten vier Ig-Domänen des TAG-1 und F3/Contactins mit der vollständigen Aminosäuresequenz des *Lotus tetragonolobus* Lektins zeigte zusätzlich signifikante Ähnlichkeiten (**Abb. 4.18 B**; N. Katagihallimath und R. Kleene, unveröffentlichte Ergebnisse). Für das *Lotus tetragonolobus* Lektin wurde eine Bindung von Lewis<sup>x</sup>-tragenden Glykanen beschrieben (Cheng *et al.*, 1998). Hier zeigte das Zelladhäsionsmolekül TAG-1 einen höheren Grad an Homologie mit dem *Lotus tetragonolobus* Lektin als F3/Contactin, besonders in zwei Regionen, in denen die Sequenz des F3/Contactin Unterschiede zu der Lektinsequenz aufwies (**Abb. 4.18 B**).

Die GPI-verankerten neuralen Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin gehören wie L1 zur Ig-Superfamilie, und Interaktionen der beiden mit L1 wurde beschrieben (s. 1.3.1). Beide Proteine können aufgrund ihrer Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zu den beschriebenen Lektinen mögliche Bindungspartner für das Lewis<sup>x</sup>-Epitop sein.

#### 4.9.2 Vorkommen der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin in Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen

Da gezeigt werden konnte, dass die GPI-verankerten Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mögliche Bindungspartner für Lewis<sup>x</sup> darstellen können (s. 4.9.1), stellte sich die Frage, ob die beiden Proteine einen Einfluss auf das unterschiedliche CD24-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen (Förderung bzw. Inhibition) haben können. Für die beiden Proteine ist eine Expression in postnatalen Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen beschrieben worden (Karagogeos *et al.*, 1991; Theveniau *et al.*, 1992; Bizzoca *et al.*, 2003). Durch Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4)

wurde überprüft, ob die Proteine F3/Contactin und TAG-1 von Kleinhirn- bzw. Hinterwurzelganglienneuronen unter den Bedingungen der bisher durchgeführten Neuritenwachstumsexperimente *in vitro* (s. 3.3.2) exprimiert werden.

Für diesen Versuch wurden Zelllysate von Primärkulturen von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen, die unter den gleichen Bedingungen der Neuritenwachstumsexperimente kultiviert wurden, auf eine Expression von TAG-1 und F3/Contactin mittels Immunoblot-Analyse untersucht (s. 3.3.3). In Gesamthirnhomogenat, das als Kontrolle zusätzlich untersucht wurde, konnten beide Proteine detektiert werden (**Abb. 4.19**, Spur 1 und 5). Im Zelllysat der Kleinhirnneurone konnte TAG-1 nachgewiesen werden (**Abb. 4.19**, Spur 2), im Gegensatz zu F3/Contactin, das unter diesen Bedingungen nicht detektierbar war



Abb. 4.19: Nachweis von TAG-1 und F3/Contactin inZelllysatenvonKleinhirn-undHinterwurzelganglienneuronen.Gesamthirnhomogenat(Spur 1 und 5) und Zelllysate von Kleinhirnneuronen (Spur 2und 6) und Hinterwurzelganglienneuronen (Spur 3, 4 und 7)wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung despolyklonalen anti-TAG-1-Antikörpers (α-TAG-1; Spur 1-4)oder des polyklonalen anti-F3-Antikörpers (α-F3; Spur 5-7)untersucht (s. 3.1.15 und 3.3.3). Spur 4 zeigt eine längereExpositionszeit von Spur 3.

(Abb. 4.19, Spur 6). Während die Neuronen der Hinterwurzelganglien nur geringe nachweisbare Mengen des TAG-1 exprimierten (Abb. 4.19, Spur 3 und 4), konnte F3/Contactin aber nachgewiesen werden (Abb. 4.19, Spur 7). Eine Expression von F3/Contactin in Zelllysaten der Kleinhirnneurone konnte auch mit längeren Expositionszeiten, wie für die Expression von TAG-1 der Hinterwurzelganglienneuronen dargestellt, nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Kleinhirnneurone und Hinterwurzelganglienneurone

zeigen unter den gewählten Bedingungen der Primärzellkultur in vitro eine Expression der Zelladhäsionsmoleküle. Während die Kleinhirnneurone TAG-1,

aber keine detektierbaren Mengen F3/Contactin exprimierten, zeigten die Hinterwurzelganglienneuronen eine Expression von F3/Contactin und nur eine sehr geringe Expression von TAG-1. Unter den untersuchten Bedingungen zeigten die beiden Neuronentypen daher eine unterschiedliche Expression der beiden Proteine und Unterschiede im Verhältnis der Expression der beiden Proteine zueinander.

#### 4.9.3 Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mit Lewis<sup>x</sup>

und F3/Contactin Die Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 stellen mögliche Bindungspartner des Lewis<sup>x</sup> dar (s. 4.9.1). Daher wurde nun untersucht, ob eine Interaktion der beiden Proteine mit dem Lewis<sup>x</sup>-Epitop nachzuweisen ist. Um dies zu überprüfen wurden *Pull-down*-Experimente durchgeführt (s. 3.1.16). Verwendet wurden Zelllysate von transfizierten Zellen der Zelllinie CHO, die die GPIverankerten Moleküle TAG-1, F3/Contactin und NCAM 120 exprimierten (s. 2.3), wobei die GPI-verankerte Isoform des NCAM, NCAM 120, als Negativkontrolle diente. Die Glykan-BSA-Konjugate Lewis<sup>x</sup>-BSA und N-Acetyllactosamin-BSA (s. 2.10) und BSA wurden an Epoxy-Beads immobilisiert. Nach Inkubation der verschiedenen Zelllysate mit den unterschiedlich beschichteten Epoxy-Beads wurde die Präzipitation an immobilisiertes Lewis<sup>x</sup>-BSA, N-Acetyllactosamin-BSA und BSA durch Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass in den Zelllysaten der transfizierten Zellen das entsprechende GPI-verankerte Zelladhäsionsmolekül TAG-1 (**Abb. 4.20 A**, Spur 1), F3/Contactin (**Abb. 4.20 B**, Spur 1) oder NCAM 120 (**Abb. 4.20 C**, Spur 1) detektierbar ist. Nach Inkubation des Zelllysats der TAG-1 exprimierenden Zellen mit immobilisiertem Lewis<sup>x</sup>-BSA war eine Präzipitation von TAG-1 detektierbar (**Abb. 4.20 A**, Spur 3). Immobilisiertes N-Acetyllactosamin-BSA (Gal-GlcNAc-BSA) oder immobilisiertes BSA, die beide als Kontrollen verwendet wurden, zeigten keine Präzipitation von TAG-1 (**Abb. 4.20 A**, Spur 2 und 4). Eine Präzipitation von F3/Contactin aus Zelllysat der mit F3/Contactin transfizierten Zellen war weder mit N-Acetyllactosamin-BSA (Gal-GlcNAc-BSA; **Abb. 4.20 B**, Spur 2) noch mit BSA



Abb. 4.20: Nachweis von TAG-1, F3/Contactin und NCAM 120 in Präzipitaten der *Pull-down*-Experimente mit Lewis×-BSA. Zelllysate von transfizierten Zellen der CHO-Zelllinie, die TAG-1 (A), F3/Contactin (B) oder NCAM 120 (C) exprimieren, wurden in *Pull-down*-Experimenten verwendet und mit an Epoxy-Beads beschichtetem N-Acetyllactosamin-BSA (Gal-GlcNAc-BSA) (A, B, C: Spur 2), Lewisx-BSA (A, B, C: Spur 3) oder BSA (A, B, C: Spur 4) inkubiert (s. 3.1.16). Die in den Präzipitaten enthaltenen Proteine wurden mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.4) unter Verwendung des polyklonalen anti-TAG-1-Antikörpers (A, Spur 1-4), des polyklonalen anti-F3-Antikörpers (B, Spur 1-4) oder des polyklonalen anti-NCAM-Antikörpers (C, Spur 1-4) untersucht. Als Kontrollen wurden die Zelllysate der transfizierten Zellen, die TAG-1 (A, Spur 1), F3/Contactin (B, Spur 1) oder NCAM 120 (C, Spur 1) exprimieren, ohne Inkubation mit Epoxy-Beads mittels Immunoblot-Analyse untersucht.

(**Abb. 4.20 B**, Spur 4) oder auch Lewis<sup>x</sup>-BSA (**Abb. 4.20 B**, Spur 3) nachweisbar. Ebenso wie für F3/Contactin konnte auch für NCAM 120 keine Präzipitation mit Lewis<sup>x</sup>-BSA (**Abb. 4.20 C**, Spur 3), N-Acetyllactosamin-BSA (Gal-GlcNAc-BSA; **Abb. 4.20 C**, Spur 2) oder BSA (**Abb. 4.20 C**, Spur 4) gezeigt werden. Zusammenfassend konnte daher geschlossen werden, dass unter den hier gewählten Bedingungen nur das Zelladhäsionsmolekül TAG-1 und nicht F3/Contactin eine spezifische Bindung an Lewis<sup>x</sup> zeigt.

# 4.9.4 Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mit CD24

Nach den in **Kapitel 4.9.1**, **4.9.2** und **4.9.3** beschriebenen Ergebnissen, wurde nun als ein weiterer Schritt eine mögliche Interaktion der beiden Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mit CD24 überprüft. Daher wurden Immunpräzipitationsexperimente (s. 3.1.17) mit dem gegen CD24 gerichteten Antikörper 79 in Membranfraktionen ("17000 x g-Sediment" (s. 3.1.15)) eines Gesamthirnhomogenats von 6 – 8 Tage alten Wildtypmäusen durchgeführt.

Die Immunpräzipitate wurden auf Anwesenheit der verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle überprüft, ein Kontrollansatz ohne Antikörper wurde parallel untersucht. Als Positivkontrolle wurde die Präzipitation von CD24 mit dem gegen CD24 gerichteten Antikörper 79 untersucht. CD24 wurde präzipitiert (Abb. 4.21, Spur 10) und konnte nicht im Kontrollansatz nachgewiesen werden (Abb. 4.21, Spur 9). Im Immunpräzipitat konnte zunächst das Zelladhäsionsmolekül L1, das als Interaktionspartner von CD24 bekannt ist (s. 1.3.3), detektiert werden (Abb. 4.21, Spur 2), wobei es in der Kontrolle ohne Antikörper nicht nachweisbar war (Abb. 4.21, Spur 1). Ebenso waren im Immunpräzipitat auch die möglichen Lewis<sup>x</sup>-Rezeptoren TAG-1 (Abb. 4.21, Spur 4) und F3/Contactin, wobei aber nur



Abb. 4.21: Nachweis von Zelladhäsionsmolekülen in Immunpräzipitaten des anti-CD24 Antikörpers. Das "17000 x g-Sediment" eines Gesamthirnhomogenats wurde mit monoklonalem gegen CD24 gerichteten Antikörper 79 (+; Spur 2, 4, 6, 8 und 10) oder ohne Zugabe des Antikörpers (-; Spur 1, 3, 5, 7 und 9) und mit Protein G gekopppelten magnetischen Beads inkubiert (s. 3.1.17). Immunpräzipitate wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers ( $\alpha$ -L1; Spur 1 und 2), des polyklonalen anti-TAG-1-Antikörpers ( $\alpha$ -TAG-1; Spur 3 und 4), des polyklonalen anti-F3-Antikörpers ( $\alpha$ -F3; Spur 5 und 6), des polyklonalen anti-NCAM-Antikörpers 2B2 ( $\alpha$ -NCAM; Spur 7 und 8) oder des monoklonalen anti-CD24-Antikörpers 79 ( $\alpha$ -CD24; Spur 9 und 10) untersucht.

eine schwache Bande für F3/Contactin detektierbar war (**Abb. 4.21**, Spur 6), nachweisbar. Das Präzipitat schien nur geringe Mengen des F3/Contactins zu enthalten. Beide Proteine waren wie auch L1 nicht im Kontrollansatz zu detektieren (**Abb. 4.21**, Spur 3 und 5). Eine Anwesenheit des Zelladhäsionsmoleküls NCAM dagegen konnte unter diesen Bedingungen weder im Immunpräzipitat (**Abb. 4.21**, Spur 8) noch in der Kontrolle (**Abb. 4.21**, Spur 7)

gezeigt werden und diente wie schon im vorigen Kapitel (s. 4.9.3) als Negativkontrolle. Eine unspezifische Bindung der Proteine konnte wegen der beschriebenen Ergebnisse des Kontrollansatzes ohne Antikörper und der fehlenden Präzipitation von NCAM eher ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse der Immunpräzipitation sind ein Hinweis darauf, dass die Proteine CD24, L1, TAG-1 und F3/Contactin in einem Proteinkomplex assoziiert gefunden werden können.

#### 4.9.5 Bedeutung der Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin für das CD24-abhängige Neuritenwachstum

Nach den in den vorigen Kapiteln beschriebenen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die beiden Proteine TAG-1 und F3/Contactin eine Bedeutung für das unterschiedliche CD24-abhängige Neuritenwachstum Kleinhirnvon und Hinterwurzelganglienneuronen (Förderung bzw. Inhibition) haben. Daher wurde Neuritenwachstum Kleinhirndas CD24-abhängige von bzw. Hinterwurzelganglienneuronen in Anwesenheit von polyklonalen Antikörpern gegen TAG-1 und F3/Contactin untersucht. Der polyklonale anti-NCAM-Antikörper wurde als Kontrolle verwendet.

Das Neuritenwachstum der beiden Neuronentypen auf substratbeschichtetem CD24 im Vergleich zum Kontrollsubstrat poly-L-Lysin zeigte die erwarteten Effekte, eine Förderung der Neuritenlängen der Kleinhirnneuronen (Abb. 4.22 A) und eine Reduktion der Neuritenlängen der Hinterwurzelganglienneuronen (Abb. **4.22 B).** In Anwesenheit des polyklonalen gegen TAG-1 gerichteten Antikörpers  $(\alpha$ -TAG-1) dagegen waren die jeweiligen Effekte nicht mehr zu beobachten. Die Förderung des Neuritenwachstums der Kleinhirnneurone war reduziert (Abb. 4.22 A), während die Neuritenlängen der Hinterwurzelganglienneurone deutlich erhöht waren (Abb. 4.22 B). Die Neuritenlängen der beiden Neuronentypen zeigten signifikante Unterschiede zur Neuritenlänge auf CD24 ohne Zusatz eines Antikörpers und ihre Längen waren vergleichbar mit den jeweiligen Neuritenlängen auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin. Die Kleinhirnneurone zeigten weder in Anwesenheit des polyklonalen Antikörpers gerichtet gegen



Abb. 4.22: Effekte der Antikörper gegen TAG-1, F3/Contactin und NCAM auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum. Kleinhirnneurone (A) und Hinterwurzelganglienneurone (B) wurden als Einzelzellkulturen auf poly-L-Lysin (PLL) oder einer Kombination von poly-L-Lysin mit aus Mausgehirn aufgereinigtem CD24 (CD24) beschichteten Deckgläschen ausgesät (s. 3.3.2). Die Zellen wurden 24 h in An- bzw. Abwesenheit des polyklonalen gegen TAG-1 gerichteten Antikörper TG-1 (α-TAG-1; 1:1000), des polyklonalen gegen F3 gerichteten Antikörper (α-F3; 1:1000) oder des polyklonalen gegen NCAM gerichteten Antikörper 2B2 (α-NCAM; 5 µg/ml) kultiviert. Nach Fixieren und Färben der Zellen wurden totale Neuritenlängen pro Zelle der Kleinhirnneuronen (A) und die Länge der 3 längsten Neuriten pro Zelle Hinterwurzelganglienneurone der (**B**) bestimmt und in Prozent dargestellt. Der Ansatz auf poly-L-Lysin in Abwesenheit eines Zusatzes diente als Kontrolle und wurde als 100 % festgelegt. Werte von mindestens drei unabhängigen Experimenten sind gezeigt, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der unabhängigen Experimente. \*\* p<0,01 (bezogen auf Kontolle PLL oder CD24)

F3/Contactin (α-F3) noch in Anwesenheit des polyklonalen gegen NCAM gerichteten Antikörpers (α-NCAM) eine Veränderung des CD24-abhängigen Neuritenwachstums (**Abb. 4.22 A**). Das CD24-abhängige Neuritenwachstum der Hinterwurzelganglienneurone war in Anwesenheit des gegen NCAM gerichteten Antikörpers ebenfalls unverändert (**Abb. 4.22 B**). In Anwesenheit des gegen

F3/Contactin gerichteten Antikörpers dagegen war eine Reduzierung der Inhibition nachweisbar, die Neuriten waren länger als in Abwesenheit des Antikörpers (**Abb. 4.22 B**), allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle auf CD24 in Abwesenheit eines Antikörpers detektiert werden. Zusätzlich beeinflusste keiner der zugegebenen Antikörper das Neuritenwachstum auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin (Daten nicht gezeigt), so dass unspezifische und toxische Effekte ausgeschlossen werden konnten. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, das lediglich der gegen TAG-1 gerichtete Antikörper eine Bedeutung für das CD24-abhängige Neuritenwachstum der Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneurone zeigte.

## 5 Diskussion

Zuckerverbindungen wurden im Laufe der letzten Jahre verstärkt funktionelle Bedeutungen zugesprochen. Die Glykane von Proteinen und Lipiden wurden vermehrt untersucht, da sie nicht nur an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt zu sein scheinen, sondern auch eine Beteiligung an einigen Erkrankungen und der Tumorgenese nachgewiesen wurde (Kottgen et al., 2003). So scheinen Glykane häufig für die Vermittlung und/oder Modulation von Ligand-Rezeptor-Interaktionen verantwortlich zu sein. Auch für die Funktion und Entwicklung des Nervensystems konnte eine Beteiligung zahlreicher Glykanstrukturen gezeigt werden (Kleene und Schachner, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der beiden neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24, die eine wichtige Rolle im Nervensystem spielen, zuckerabhängig ist. Sialinsäurereste des CD24 sind dabei sowohl für die Interaktion mit L1 als auch für das CD24-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirnund Hinterwurzelganglienneuronen essentiell (Kleene et al., 2001). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Bindungsstelle der Sialinsäuren innerhalb des L1-Moleküls zu identifizieren und zu charakterisieren. Des weiteren sollten die Zuckerstrukturen des CD24 und ihre funktionelle Bedeutung für die Bindung an L1 und das CD24-abhängige Neuritenwachstum näher untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass die Bindungsstelle der Sialinsäuren innerhalb der 1. FN-Domäne des L1-Moleküls lokalisiert (s. 4.2) und spezifisch für  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren ist (s. 4.3).  $\alpha$ 2,3verknüpfte Sialinsäurereste konnten zusammen mit dem HNK-1-Epitop und dem Lewis<sup>x</sup>-Epitop auf O-verknüpften Glykanen des CD24 detektiert werden (s. 4.5). Die O-Glykane des CD24 sind für die von CD24 vermittelten Effekte auf das Neuritenwachstum und die Bindung an L1 von großer Bedeutung (s. 4.6). Das CD24-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen wird sowohl durch  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren als auch durch Lewis<sup>x</sup> auf O-Glykanen des CD24 beeinflusst (s. 4.4 und 4.7). Weiterhin wurde aufgrund der Seguenzähnlichkeiten mit fucose- und Lewis<sup>x</sup>spezifischen Pflanzenlektinen vermutet, dass die neuralen Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin mögliche Rezeptoren des Lewis<sup>x</sup>-Epitops darstellen (s. 4.9.1). Allerdings konnte lediglich TAG-1 als neuronaler Rezeptor für Lewis<sup>x</sup>-tragende Zuckerstrukturen identifiziert werden und scheint wie L1 auch an der Vermittlung des CD24-abhängigen Neuritenwachstums beteiligt zu sein (s. 4.9.3, 4.9.4 und 4.9.5).

Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein Rezeptor für  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren. Spezifische Rezeptoren für terminale Sialinsäuren auf Zuckerseitenketten sind u.a. die Mitglieder der siglec-Familie. Sequenzvergleiche der siglecs mit dem L1-Molekül ergaben Ähnlichkeiten zwischen der bereits bekannten Sialinsäure-Bindungsstelle der Lektine mit einem Sequenzabschnitt innerhalb der 1. FN-Domäne des L1 (Kleene et al., 2001; s. 1.3.3). Daher wurde die Sialinsäure-Bindungsstelle in einer Konsensussequenz innerhalb der 1. FN-Domäne des L1, die bei den Mitgliedern der L1-Familie identifiziert werden konnte, vermutet. Mit Hilfe von ELISA-Experimenten wurden die Bindungen von L1-Proteinfragmenten, die unterschiedliche Domänen des L1 Moleküls umfassten (s. 4.2.2), und von L1-Peptiden, die die angenommene Bindungsstelle präsentierten (s. 4.2.4), an aus Maushirn aufgereinigtes, substratbeschichtetes CD24 untersucht. Die Ergebnisse dieser Bindungsstudien bestätigten die Hypothese. Auffallend war jedoch, dass für die beiden L1-Fragmente L1-FN 1-2 und L1-FN 1-5 sehr unterschiedliche Bindungskurven gezeigt werden konnten (s. 4.2.2). Eine Erklärungsmöglichkeit ist eine unterschiedliche Konformationen der beiden Fragmente und damit eventuell eine verschlechterte Zugänglichkeit der Bindungsstelle. Einige Studien haben gezeigt, dass sich die einzelnen Domänen des Moleküls in ihrer Konformation gegenseitig beeinflussen, vor allem die 3. FN-Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der homophilen Interaktion des L1 und bei der Homomultimerisierung (Holm et al., 1995; Silletti et al., 2000). Die so als Sialinsäure-Bindungsstelle identifizierte Konsensussequenz in der 1. FN-Domäne des L1-Moleküls ist bei den Mitgliedern der L1-Familie auch bei verschiedenen Spezies hoch konserviert (s. 1.3.3; Abb. 5.1). Eine Mutation innerhalb dieser Konsensussequenz wurde bei betroffenen Patienten des MASA-Syndroms (s. 1.3.1.1) identifiziert. Mutationen des konservierten Alaninrests zu Glutaminsäure oder Threonin konnten nachgewiesen werden (Du *et al.*, 1998; Finckh *et al.*, 2000; **Abb. 5.1**). Kleene *et al.* zeigten, dass interessanterweise auch andere Proteine mit FN-Domänen wie weitere Mitglieder der Ig-Superfamilie, u. a. die



Abb. 5.1: Darstellung der Sialinsäure-Bindungsstelle und Konsensussequenz (nach Kleene *et al.*, 2001). Dargestellt ist eine Auswahl von Mitgliedern der Ig-Superfamilie mit FN-Domänen und anderen Molekülen mit FN-Domänen. Sequenzvergleiche der FN-Domänen zeigen eine Konsensussequenz (s. auch 1.3.3), die identifizierte Sialinsäure-Bindungsstelle ist innerhalb der Proteine mit FN-Domänen konserviert. Klinisch beschriebene Mutationen innerhalb der Konsensussequenz sind grün und umrandet dargestellt. Die Nummern zeigen die Positionen der Aminosäuren an. Identische Aminosäuren sind gelb, der konservierte Argininrest blau hinterlegt. Spezies und *Swissprot accession number* sind in Klammern angegeben.

Netrin-Rezeptoren DCC und Neogenin, Rezeptor-Proteintyrosinphosphatasen (R-PTP) und das Protein *sidekick*, und die EZM Proteine Usherin und Anosmin Ähnlichkeiten in der identifizierten Sialinsäure-Bindungsstelle zeigen (Kleene *et al.*, 2001; **Abb. 5.1**). Diese Moleküle spielen alle wichtige Rollen in Prozessen wie der Neurogenese und Axonwegfindung (Kleene *et al.*, 2001). Im EZM-Molekül Anosmin wurde die Region des Proteins, die für das Neuritenwachstum

entscheidend ist, identifiziert (Soussi-Yanicostas et al., 1998), wobei diese interessanterweise der hier Aminosäureseguenz mit dargestellten Konsensussequenz überlappt. Zusätzlich konnte eine Mutation des konservierten Asparaginrests innerhalb der Konsensussequenz von Anosmin bei Patienten des Kallmann Syndroms identifiziert werden (Franco et al., 1991; Hardelin et al., 1993). Die Krankheit wird durch das gemeinsame Auftreten von Hypogonadismus und Anosmie (Verlust des Geruchsinns) definiert, als Ursache wurden Störungen im Auswachsen und der Migration von olfaktorischen Neuronen und GnRH (gonadotropin-releasing hormone) synthetisierenden Neuronen beschrieben (Soussi-Yanicostas et al., 1998). Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass dieser Aminosäuresequenzabschnitt der Sialinsäure-Bindungsstelle allgemein von großer Bedeutung für die Entwicklung des Nervensystems zu sein scheint. Da nicht nur L1, sondern auch weitere Proteine im Nervensystem das Sialinsäure-Bindungsmotiv ist wahrscheinlich, dass α2,3-verknüpfte tragen, es Sialinsäurereste auch von anderen Molekülen erkannt und gebunden werden und so wichtige zuckerabhängige Interaktionen von Proteinen und/oder Zellen modulieren oder vermitteln können (Kleene *et al.*, 2001).

Für die *siglecs* konnte eine Spezifität für die Verknüpfung der terminalen Sialinsäuren nachgewiesen werden (Kelm *et al.*, 1994; Vinson *et al.*, 1996). CD22 zeigt eine Präferenz für die Bindung von  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren, während MAG, Sialoadhesin und CD33 bevorzugt  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren binden. Auch das L1-Molekül zeigt eine Präferenz für die Bindung von  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren gegenüber  $\alpha$ 2,6-verknüpften Sialinsäuren, wie die durchgeführten Kompetitionsstudien der L1-CD24-Interaktion deutlich machen (s. 4.3). Hier scheint vor allem lediglich die Verknüpfung der terminalen Sialinsäuren entscheidend zu sein, da die weitere Zusammensetzung der verwendeten Zuckerstrukturen keine Effekte auf die Kompetition der L1-CD24-Interaktion zeigte. Eine vollständige Kompetition konnte unter den gewählten Bedingungen und Zuckerstrukturen nicht detektiert werden. Möglich wäre, dass die Strukturen der Zuckerseitenketten des CD24, die von L1 gebunden werden, nicht exakt den verwendeten Zuckern entsprechen.

Das Zelladhäsionsmolekül CD24 trägt neben  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren das Lewis<sup>x</sup>-Epitop und das HNK-1-Epitop auf O-Glykanen. Kleene et al. konnten zeigen, dass das stark N- und O-glykosylierte Zelladhäsionsmolekül CD24 im Maushirn in drei Glykoformen mit scheinbaren Molekulargewichten von annährend 27 kDa, 30 kDa und 33 kDa vorkommt, wobei die beiden größeren Glykoformen a2,3-verknüpfte Sialinsäuren tragen (Kleene et al., 2001). Eine weitere Charakterisierung des Glykosylierungsmusters von aus Maushirn aufgereinigtem CD24 sollte zeigen, ob weitere Zuckerepitope auf CD24 auf N- oder O-verknüpften detektierbar sind und ob die Epitope Zuckerseitenketten nachweisbar sind (s. 4.5). Zusätzlich zu den terminalen Sialinsäuren konnte durch Immunoblot-Analyse mit zuckerspezifischen Antikörpern das HNK-1-Epitop und das Lewis<sup>x</sup>-Epitop nachgewiesen werden: Die 33 kDa-Glykoform trägt  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, HNK-1 und Lewis<sup>x</sup>, die 30 kDa-Glykoform a2,3-verknüpfte Sialinsäuren und HNK-1, während für die 27 kDa-Glykoform keines dieser Zuckerepitope detektierbar war. Außerdem war für die 30 kDa-Glykoform des CD24 eine Reaktivität mit dem Datura stramonium Agglutinin zu beobachten, dass N-Acetyllactosamin detektiert. Alle drei beschriebenen Glykoformen tragen N-verknüpfte Glykane. Allerdings sind die  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren, das HNK-1 und Lewis<sup>x</sup> nicht auf N-Glykanen, sondern auf den O-verknüpften Glykanen des CD24 detektierbar.

Auf der 33 kDa-Glykoform des CD24 konnte das Lewis<sup>x</sup>-Epitop auf O-verknüpften Zuckerseitenketten detektiert werden. Das Lewis<sup>x</sup>-Epitop (s. 1.2) wurde bisher auf N- und O-Glykanen von Glykoproteinen und auf Glykolipiden nachgewiesen (Streit *et al.*, 1996; Smalheiser *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998). Im Nervensystem wurde für Zelladhäsionsmoleküle wie L1 (Streit *et al.*, 1990) und NCAM (Wuhrer *et al.*, 2003) eine Expression des Lewis<sup>x</sup>-Epitops beschrieben. Auch auf dem Glykoprotein  $\alpha$ -Dystroglycan (Smalheiser *et al.*, 1998) und einigen Proteoglykanen (Allendoerfer *et al.*, 1995) konnte das Epitop nachgewiesen werden. Das Lewis<sup>x</sup>-Epitop zeigt eine entwicklungsabhängige, räumlich und zeitlich transiente Expression im Nervensystem (Gocht *et al.*, 1996; Mai *et al.*, 1999) und eine transiente Expression bereits während der Präimplantationsphase der Embryogenese (Kottgen *et al.*, 2003). Einige Studien zeigen, dass Lewis<sup>x</sup>- tragende Glykokonjugate vor allem auf Astrozyten, seltener auf Oligodendrozyten und Subpopulationen von Neuronen, exprimiert werden und eine Rolle bei Glia-Neuron-Interaktionen, Zelladhäsion und -migration während der Entwicklung des Nervensystems spielen (Lagenaur *et al.*, 1982; Gocht *et al.*, 1996; Sajdel-Sulkowska, 1998).

Das <u>human natural killer cell</u> Glykan HNK-1, das wie die α2,3-verknüpften Sialinsäuren auf der 30 kDa- und 33 kDa-Glykoform des CD24 detektiert werden konnte, wurde ursprünglich durch einen monoklonalen Antikörper entdeckt, der eine Bindung an humane Killerzellen zeigte, woher auch der Name dieses Zuckerepitops rührt (s. 1.2). HNK-1 konnte auf Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykolipiden nachgewiesen werden (Kleene und Schachner, 2004). Zu den Glykoproteinen des Nervensystems, die das HNK-1-Epitop tragen, gehören neurale Zelladhäsionsmoleküle wie L1, NCAM (Kruse et al., 1984), P<sub>0</sub> und MAG (Poltorak et al., 1987; van den Berg et al., 1990), das EZM Glykoprotein Tenascin-R (Xiao *et al.*, 1997), einige Integrine (Hall *et al.*, 1997) und  $\alpha$ -Dystroglycan (Smalheiser und Kim, 1995). HNK-1 wurde sowohl auf N- als auch auf O-Glykanen identifiziert, wobei im Fall der O-Glykosylierung das Epitop hauptsächlich auf O-Mannose-verknüpften Glykanen (s. 1.1.1.2) zu finden ist (Yuen et al., 1997). Über die Interaktion des HNK-1-Epitops mit seinen zahlreichen beschriebenen Rezeptoren, wie Laminin (Hall et al., 1995; Hall et al., 1997), Amphoterin (Chou *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2001), P<sub>0</sub> (Griffith *et al.*, 1992) und Lecticanen (Miura et al., 2001), konnte gezeigt werden, dass HNK-1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems bei Zellmigration und Neuritenwachstum spielt. Vor allem für das Neuritenwachstum motorischer Neurone scheint das HNK-1-Epitop von entscheidender Bedeutung zu sein, da es in vitro das Neuritenwachstum motorischer Neuronen fördert, aber keinen Effekt auf das Neuritenwachstum sensorischer Neurone zeigt (Martini et al., 1994), ebenso wie es auch eine Rolle beim erneuten Auswachsen motorischer Neurone nach einer Läsion zu spielen scheint (Kleene und Schachner, 2004). Zusätzlich wurde für das HNK-1-Epitop auch eine Beteiligung an synaptischer Plastizität im adulten Zentralen Nervensystem in vivo und in vitro nachgewiesen. Sowohl durch die Anwesenheit eines HNK-1-Antikörpers durch Injektion in den Hippocampus als

auch bei transgenen Mäusen, die das HNK-1-Epitop aufgrund einer fehlenden Sulfotransferase oder Glucuronyltransferase nicht exprimierten, zeigten sich Veränderungen der synaptischen Plastizität und ein schlechteres Lernverhalten (Saghatelyan *et al.*, 2000; Strekalova *et al.*, 2001; Senn *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2002). Für das HNK-1-Epitop wird so eine große Bedeutung für die Entwicklung und Funktion des Nervensystems deutlich.

Zusätzlich zu den Unterschieden im Glykosylierungsmuster der Glykoformen des CD24 im Nervensystem der Maus zeigten weitere Ergebnisse, dass auch eine zelltypspezifische Expression der Glykoformen zu beobachten ist (R. Kleene, unveröffentlichte Ergebnisse). Während in Zelllysaten von Primärkulturen von Kleinhirnneuronen lediglich die 27 kDa-Glykoform durch Immunoblot-Analyse nachzuweisen war, konnten in Zelllysaten von Primärkulturen von Astrozyten die 33 kDa- und 30 kDa-Glykoformen detektiert werden. Für die 30 kDa- und 33 kDa-Glykoformen des CD24 wurde bereits gezeigt, dass sie durch alkalische Behandlung von L1-positiven Membranen abgelöst werden können, was für eine trans-Position zu L1 spricht. Dagegen konnte die 27 kDa-Glykoform nicht von L1positiven Membranen durch alkalische Behandlung abgelöst werden, was ein Hinweis auf eine *cis*-Position zu L1 ist (Kleene *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse zeigen eine Ubereinstimmung mit der Expression der CD24-Glykoformen: Die beiden größeren Glykoformen, die in einer trans-Position zum neuronalen L1 vermutet werden, konnten in Zelllysaten von Astrozyten und nicht Neuronen detektiert werden, während die kleinste Glykoform lediglich in Zelllysaten von Kleinhirnneuronen nachgewiesen werden konnte und nicht auf Astrozyten, was die cis-Position zu L1 auf Neuronen unterstützt. Diese zelltypspezifische Expression der CD24-Glykoformen unterstützt auch die Vermutung, dass eher eine trans-Interaktion von L1 und CD24 von funktioneller Bedeutung ist als eine cis-Interaktion (Kleene et al., 2001). Schließlich wurden die für die Bindung an L1 essentiellen α2,3-verknüpften Sialinsäuren auf der 30 kDa- und 33 kDa-Glykoform des CD24 detektiert, die in Zelllysaten von Astrozyten nachgewiesen werden konnten, während auf der neuronalen 27 kDa-Glykoform des CD24 die essentiellen terminalen Sialinsäuren nicht nachzuweisen waren.

Die auf CD24 identifizierten Zuckerepitope, wie  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, Lewis<sup>x</sup> und HNK-1, können auf den O-verknüpften Glykanen der Glykoformen nachgewiesen werden, die auf Astrozyten exprimiert werden. In einigen Studien ist die Glykosylierung des Glykoproteins  $\alpha$ -Dystroglycan, das im Nervensystem hauptsächlich auf Gliazellen zu finden ist und eine wichtige Rolle für die Migration von Neuronen spielt, untersucht worden. Für  $\alpha$ -Dystroglycan konnte gezeigt werden, dass es u.a. O-Mannose-verknüpfte Glykane trägt (s. 1.1.1.2), dabei hauptsächlich folgende, seltene Struktur identifiziert konnte werden: Neu5Acα2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,2Man-O-Ser/Thr, die auch fucosyliert und/oder ohne terminale Sialinsäuren vorkommt (Chiba et al., 1997). Interessanterweise konnten auf diesen O-Mannose verknüpften Zuckerstrukturen sowohl  $\alpha$ 2,3verknüpfte Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup> detektiert werden (Chiba et al., 1997; Smalheiser et al., 1998; Qu und Smith, 2004). Das Glykoprotein zeigte außerdem eine Expression des HNK-1-Epitops (Smalheiser und Kim, 1995). Damit zeigt das gliale  $\alpha$ -Dystroglycan die gleiche Expression von Zuckerepitopen wie die 30 kDaund 33 kDa-Glykoformen des CD24, die auch von Astrozyten exprimiert werden. Vielleicht tragen die glialen Glykoformen des CD24 auch über Mannose verknüpfte O-Glykane, was allerdings eine genaue Analyse der Zuckerstrukturen des CD24 bestätigen müsste.

 $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup> auf O-Glykanen des CD24 spielen eine essentielle Rolle bei der Vermittlung des CD24-abhängigen Neuritenwachstums. Für das Zelladhäsionsmolekül CD24 konnte in Abhängigkeit vom neuronalen Zelltyp eine Förderung oder Inhibition des ieweiligen Neuritenwachstums in vitro nachgewiesen werden. Das Neuritenwachstum postnataler Kleinhirnneurone wird durch CD24 gefördert, während das CD24-abhänige Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen eine Inhibition zeigt (Kleene et al., 2001). Experimente dieser Arbeit zeigten, dass das CD24-abhängige Neuritenwachstum vor allem durch die O-verknüpften Glykane des CD24 vermittelt wird und die N-Glykane höchstwahrscheinlich keinen Einfluss auf die CD24-abhängigen Effekte haben (s. 4.6.2). Gleiches gilt für die Bindung von CD24 an L1, auch hier scheinen die N-Glykane des CD24 nicht von essentieller Bedeutung zu sein (s. 4.6.1). Dies spricht für eine wichtige Rolle der O-Glykane des CD24, was auch dadurch unterstützt wird, dass die funktionell wichtigen Zuckerepitope  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, Lewis<sup>x</sup> und HNK-1 auf O-Glykanen nachgewiesen und nicht auf N-Glykanen detektiert werden konnten.

Es gibt Hinweise und Beispiele, dass die O-Glykosylierung von Proteinen von großer Bedeutung ist (s. 1.1.1.2 und 1.2). So wurde für das Protein Notch gezeigt, dass die extrazellulären EGF-Domänen des Proteins O-Glykane tragen, die über O-Fucose an den Proteinkern gebunden sind (Haltiwanger, 2002; s. 1.1.1.2). Weiter wurde gezeigt, dass diese O-Glykane für die Modulation der Interaktion von Notch mit seinen Liganden von entscheidender Bedeutung sind. Hier moduliert die Glykosyltransferase Fringe, die eine O-Fucose-spezifische β1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase darstellt, die Interaktion von Notch mit seinen Liganden Delta und Jagged/Serrate, wobei der Transfer von N-Acetylglucosamin auf die O-verknüpfte Fucose zu einer Förderung der Interaktion mit Delta und einer Inhibition der Interaktion mit Serrate/Jagged führt (Fortini, 2000; Haltiwanger und Stanley, 2002). Mausmutanten, denen die O-Fucosyltransferase für den initialen Schritt der O-Fucosylierung (s. auch Abb. 1.2 C) von Notch fehlt, zeigen einen schweren Phänotyp, sie sterben während der Embryonalentwicklung mit schweren Defekten in Somitogenese, Kardiogenese und Neurogenese, genau wie auch Notch-defiziente Mausmutanten (Shi und Stanley, 2003; s. 1.2). Auch Fringe-defiziente Mäuse zeigen einen ernsten Phänotyp, der aber nicht so schwer ausfällt (Haltiwanger und Lowe, 2004). Ein weiteres Glykoprotein, für das die Bedeutung seiner O-Glykosylierung gut untersucht wurde, ist  $\alpha$ -Dystroglycan. Das Glykoprotein ist neben den schon beschriebenen Funktionen auch ein wichtiger Bestandteil des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes, der eine Verbindung des Aktin-Zytoskeletts zur EZM in Muskelgewebe und Nervensystem darstellt (Haltiwanger und Lowe, 2004). Die über Mannose verknüpften O-Glykane des  $\alpha$ -Dystroglycan sind essentiell für die Interaktion mit Komponenten der EZM, wie Laminin, Agrin, Neurexin und Perlecan (Chiba et al., 1997; Michele et al., 2002; Haltiwanger und Lowe, 2004). Eine gestörte O-Mannosylierung von Proteinen wie  $\alpha$ -Dystroglycan, die durch Mutationen in den verantwortlichen

Glykosyltransferasen verursacht werden, führt zu Erkrankungen wie muskulärer Dystrophie, *Muscle-Eye-Brain* Erkrankung und Walker-Warburg-Syndrom (s. 1.2). Die gleichen Symptome bzw. Phänotyp zeigen auch transgene  $\alpha$ -Dystroglycandefiziente Mäuse (Moore *et al.*, 2002). Eine funktionelle Bedeutung von Overknüpften Zuckerseitenketten von Proteinen wird so deutlich.

Das Zelladhäsionsmolekül L1 zeigt eine Spezifität der Bindung von α2,3verknüpften Sialinsäuren gegenüber einer  $\alpha$ 2,6-Verknüpfung (s. 4.3). Die Verknüpfung der Sialinsäuren des CD24 scheint auch funktionell von großer Bedeutung zu sein, da nur die Anwesenheit von  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren die Effekte des CD24-abhängigen Neuritenwachstums modulierte, während die Anwesenheit von Zuckern mit einer  $\alpha$ 2,6-Verknüpfung der Sialinsäuren ohne Bedeutung war (s. 4.4). Interessanterweise ist außerdem das Lewis<sup>x</sup>-Epitop zusätzlich zur Sialinsäure an der Vermittluna des CD24-abhängigen Neuritenwachstums beteiligt (s. 4.7). Für das HNK-1-Epitop wurde in einer Reihe von Studien zwar eine Beteiligung an der Vermittlung des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen beschrieben (Chou et al., 2000; Miura et al., 2001), hier dagegen scheint das HNK-1 unter den gewählten Bedingungen bei Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen Rolle keine für das CD24-abhängige Neuritenwachstum zu spielen (s. 4.7). Die CD24-abhängigen Effekte auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen konnten nicht gezeigt werden, wenn CD24 zuvor mit Neuraminidase behandelt wurde und so keine Sialinsäuren mehr trug, oder Neuronen von L1-defizienten Mäusen für die Primärkulturexperimente verwendet wurden (Kleene et al., 2001; s. 1.3.3). Das L1-Molekül als Rezeptor für Sialinsäuren ist also für das CD24abhängige Neuritenwachstum essentiell. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass sowohl a2,3-verknüpfte Sialinsäuren als auch Lewis<sup>x</sup> für die Vermittlung der CD24-abhängigen Effekte auf das Neuritenwachstum der beiden neuronalen Zelltypen erforderlich sind und keines der beiden Epitope dazu allein in der Lage ist, da die Anwesenheit von kompetierenden Zuckerstrukturen oder Antikörpern zu  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren oder Lewis<sup>x</sup> zu einer Aufhebung der CD24abhängigen Effekte führt. Dies wurde zusätzlich bestätigt, da  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup>, wenn sie in Form von BSA-Glykokonjugaten als

jeweils Substrate verwendet wurden, allein keinen Effekt auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen ausübten (s. 4.8). Allerdings vermittelte auch eine Kombination der beiden BSA-Glykokonjugate keine Förderung des Neuritenwachstums der Kleinhirnneuronen, die mit der CD24-abhängigen Förderung der Neuritenlängen vergleichbar wäre. Es ist daher wahrscheinlich, dass sich die Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup> zusätzlich in einer räumlichen Konformation zueinander befinden müssen, um gemeinsam das Neuritenwachstum modulieren zu können. Vielleicht ist es sogar erforderlich, dass sich beide Strukturen auf einem CD24-Molekül befinden müssen, was für die 33 kDa-Glykoform des CD24, die von Astrozyten exprimiert wird, der Fall wäre. Denkbar wäre ein Modell, dass die Sialinsäure- und Lewis<sup>x</sup>-tragende gliale Glykoform des CD24 über eine Interaktion mit neuronalen Rezeptoren eine Signaltransduktion der Neuronen auslöst. Damit spielen die Glykane eine wichtige Rolle für eine Vermittlung und Modulation einer Glia-Neuron-Interaktion. Sowohl die beiden Zuckerstrukturen als auch neuronale Rezeptoren scheinen daher für die zuckerabhängige Förderung Neuritenwachstums Kleinhirnneuronen Inhibition des von und des Neuritenwachstums von Hinterwurzelganglienneuronen von großer Bedeutung zu sein.

Der Prozess des Neuritenwachstums spielt sowohl während der Entwicklung als auch für die Regeneration des Nervensystems eine bedeutende Rolle. Der ausgebildete Wachstumskegel an der Spitze des auswachsenden Neuriten steuert die Wanderung und Verlängerung des Neuriten, wobei die korrekte Wegfindung des Neuriten von herausragender Bedeutung ist. Dafür sind zahlreiche Faktoren der Umgebung und die Zusammensetzung der Rezeptoren auf dem Wachstumskegel verantwortlich. Dabei kann es sich um Komponenten der EZM wie Laminin, Zelladhäsionsmoleküle, die auf Zellen der Umgebung präsentiert werden, Neurotrophine und/oder diffusionsfähige Sekretproteine wie Netrin-1 und -2 und die Semaphorine handeln (Kiryushko et al., 2004), die sowohl anziehende als auch abstoßende Wirkungen auf den Wachstumskegel haben zahlreiche Auf Wachstumskegeln sich können. den befinden Zelladhäsionsmoleküle wie Integrine, Cadherine und Mitglieder der la-Superfamilie (z.B. L1, TAG-1 und NCAM) als Rezeptoren (Sonderegger, 1997). Vor allem Zelladhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie (s. 1.3.1) wird als Rezeptoren auf den Wachstumskegeln eine sehr wichtige Rolle bei der Beweglichkeit und Steuerung zugesprochen. Nach Bindung eines Liganden kommt es über die Rezeptoren zu einer Signaltransduktion, die dann einen Umbau des Zytoskeletts reguliert und für die Beweglichkeit und Steuerung des Wachstumskegels und bei einem fördernden Einfluss für die Verlängerung des Neuriten sorgt (Sonderegger, 1997; Walsh und Doherty, 1997; Faivre-Sarrailh *et al.*, 1999).

Wie es allerdings zu den unterschiedlichen Zellantworten im CD24-abhängigen Neuritenwachstum der Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen kommt, bleibt weiter unklar. Die Beobachtung, dass Moleküle, wie hier das CD24, unterschiedliche Effekte auf z.B. das Axonwachstum von verschiedenen neuronalen Zelltypen haben können, wurde bereits in einigen Studien beschrieben. Studien über das GPI-verankerte neurale Zelladhäsionsmolekül F3/Contactin (s. 1.3.1) zeigten, dass, wenn F3/Contactin als Substrat für Neuritenwachstumsexperimente in vitro verwendet wurde, in Abhängigkeit vom Neuronentyp unterschiedliche Effekte beobachtet werden konnten. So hatte F3/Contactin einen starken fördernden Effekt auf das Neuritenwachstum von Hinterwurzelganglienneuronen (Gennarini et al., 1989). Es konnte aber kein Effekt auf das Axonwachstum hippocampaler Neurone nachgewiesen werden, während eine Inhibition des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen durch F3/Contactin detektierbar war (Buttiglione et al., 1996). Auch für das Phosphacan-Homolog der Maus (DSD-1-Proteoglykan) konnten entgegengesetzte Effekte auf das Neuritenwachstum im Abhängigkeit des Neuronentyps gezeigt werden (Garwood et al., 1999). Weitere Beispiele sind das Glykoprotein MAG (s. 1.2.1 und 1.3.1) und die EZM-Moleküle Tenascin-R und -C oder auch Netrin-1, die sowohl als repulsive als auch attraktive Substrate für verschiedene Zelltypen beschrieben wurden (Faivre-Sarrailh und Rougon, 1997). Zur Erklärung dieser Beobachtungen sind zwei Hypothesen möglich (Faivre-Sarrailh und Rougon, 1997; Kleene et al., 2001). Eine Möglichkeit wäre, dass durch die Interaktion des Liganden mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche der neuronalen Zelltypen unterschiedliche Signaltransduktionsketten ausgelöst werden. Möglich wäre aber auch, dass die

verschiedenen neuronalen Zelltypen spezifische Rezeptoren für die jeweiligen Liganden auf ihrer Zelloberfläche unterschiedlich exprimieren und so die gegensätzlichen Effekte vermittelt werden. Daher könnten weitere neuronale Interaktionspartner von L1 und CD24, die evtl. zusätzlich unterschiedliche Expressionen auf Kleinhirnund Hinterwurzelganglienneuronen zeigen, Erklärungsmöglichkeiten für die unterschiedlichen Effekte des CD24-abhängigen Neuritenwachstums von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen liefern. Eine mögliche Identifikation neuronaler Lewis<sup>x</sup>-Rezeptoren, die wie L1 mit der glialen Glykoform des CD24 interagieren, wäre dann besonders gut geeignet, um die CD24-abhängigen Effekte auf das Neuritenwachstum zu verstehen, da für das CD24-abhängige Neuritenwachstum Lewis<sup>x</sup> eine essentielle Rolle spielt.

Das Zelladhäsionsmolekül TAG-1 ist ein Rezeptor für Lewis<sup>x</sup>-tragende Glykane und ein Interaktionspartner von L1. Um mögliche Rezeptoren des Lewis<sup>x</sup>-Epitops zu identifizieren, wurden die Aminosäuresequenzen von Lektinen, die eine Spezifität für fucosetragende oder Lewis<sup>x</sup>-tragende Oligosaccharide zeigen, mit denen neuraler Zelladhäsionsmoleküle verglichen. Dabei wurden zunächst nur Zelladhäsionsmoleküle berücksichtigt, für die bereits eine funktionelle Verbindung zum L1 beschrieben worden ist. Diese Sequenzvergleiche ergaben, dass die Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin (s. 1.3.1) signifikante Sequenzähnlichkeiten innerhalb ihrer 1. Ig-Domäne zu den fucosespezifischen Lektinen Ulex europaeus Lektin II, Pisum sativum Agglutinin, Cytisus sessilifolius Lektin I, Laburnum alpinum Lektin I und Lathyrus ochrus Lektin ß1 und ß2 zeigen (s. 4.9.1). Auch Sequenzähnlichkeiten der ersten vier Ig-Domänen der beiden Moleküle mit dem Lewis<sup>x</sup>-spezifischen *Lotus tetragonolobus* Lektin konnten beobachtet werden (s. 4.9.1; Daten der Seguenzvergleiche von R. Kleene und N. Katagihallimath). Die beiden einander nah verwandten, GPIverankerten Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin zeigen eine Sequenzidentität von ca. 50 % und gehören wie L1 zur Ig-Superfamilie (s. 1.3.1). Für beide Moleküle wurde eine Interaktion mit L1 beschrieben (Kuhn et al., 1991; Olive et al., 1995; Faivre-Sarrailh et al., 1999). Bei der Überprüfung mit Hilfe von *Pull-down*-Experimenten, ob die beiden Moleküle Lewis<sup>x</sup>-tragende Glykane binden, zeigte lediglich TAG-1 eine spezifische Bindung an Lewis<sup>x</sup> (s. 4.9.3). Auch zeigte nur die Anwesenheit des TAG-1-Antikörpers eine Beeinflussung des CD24abhängigen Neuritenwachstums von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen, während der F3/Contactin-Antikörper keinen Effekt hatte (s. 4.9.5). Außerdem zeigte TAG-1 die größere Sequenzähnlichkeit zum Lewis<sup>x</sup>-spezifischen *Lotus tetragonolobus* Lektin als F3/Contactin (s. 4.9.1), so dass es wahrscheinlich ist, dass nur TAG-1 und nicht F3/Contactin ein neuronaler Rezeptor für Lewis<sup>x</sup>-tragende Glykane ist.

Das neurale Zelladhäsionsmolekül TAG-1 mit einem Molekulargewicht von etwa 135 kDa wurde in mehreren in vitro Studien als neuritenwachstumsförderndes Substrat für Hinterwurzelganglienneurone beschrieben (Furley et al., 1990; Kuhn et al., 1991; Stoeckli et al., 1991), wobei unterschiedliche Effekte auf Neuritenwachstum, wie sie für F3/Contactin gezeigt werden konnten, für TAG-1 nicht beschrieben worden sind. TAG-1 interagiert mit zahlreichen Interaktionspartnern, dazu gehören neben Mitgliedern der L1-Familie, wie L1 und NrCAM (Sonderegger, 1997), auch NCAM (Milev et al., 1996) und β1-Integrin (Felsenfeld et al., 1994). Auch Interaktionen von TAG-1 mit Tenascin-C, Neurocan und Phosphacan in der EZM sind beschrieben worden (Milev et al., 1996). Eine Interaktion von TAG-1 und L1 wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben. Eine funktionelle Bedeutung für die cis-Interaktion der beiden Proteine wurde aezeiat, da Experimente deutlich machten, dass die Formierung des Heterokomplexes aus TAG-1 und L1 auf Neuronen für das Auswachsen und die Faszikulation von Neuriten erforderlich ist (Buchstaller et al., 1996; Kunz et al., 1998). Kuhn et al. konnten zeigen, dass L1 und TAG-1 auf der Zelloberfläche von Hinterwurzelganglienneuronen co-lokalisiert sind (Kuhn et al., 1991). Weitere Hinweise auf eine Interaktion von L1 und TAG-1 lieferten Co-Immunpräzipitationen der beiden Proteine aus kultivierten Zellen, die beide Moleküle nach Co-Transfektion exprimieren (Rader et al., 1993; Malhotra et al., 1998), sowie Co-Immunpräzipitationen aus Hinterwurzelganglienneuronen, die beide Proteine exprimieren (Buchstaller et al., 1996; Kunz et al., 1996). Ob die Interaktion der beiden Zelladhäsionsmoleküle L1 und TAG-1 dabei auf einer direkten Protein-Protein-Interaktion beruht, bleibt aber unklar, da verschiedene

Studien zu sehr verschiedenen Ergebnissen führten. Bindungsstudien mit fluoreszierenden Beads, die mit nativem NgCAM (Homolog des Hühnchens zu L1) und Axonin-1 (Homolog des Hühnchens zu TAG-1) beschichtet wurden, zeigten, dass die beiden Moleküle aneinander binden (Kuhn et al., 1991). Andererseits konnte dieses Ergebnis in Bindungsstudien mit radioaktiv-markierten Liganden nicht bestätigt werden, obwohl auch hier die nativen Proteine des Hühnchens NgCAM und Axonin-1 verwendet wurden. Hier konnte nur eine schwache und nicht signifikante Bindung von NgCAM an Axonin-1 detektiert werden (Milev et al., 1996). Ein weiterer Hinweis, der nicht auf eine direkte Protein-Protein-Interaktion deutet, waren Bindungsstudien, die mit rekombinanten Fc-Fusionsproteinen durchgeführt wurden. Für die Fusionsproteine TAG-1-Fc und L1-Fc, die auf fluoreszierenden Beads beschichtet wurden, konnte keine direkte Bindung aneinander nachgewiesen werden (Pavlou et al., 2002). Außerdem zeigte das Konstrukt TAG-1-Fc keine Bindung an L1-exprimierende CHO-Zellen (Pavlou et al., 2002). Ebenso konnte keine Bindung von TAG-1 und L1 nachgewiesen werden, wenn die beiden Moleküle nicht zusammen, sondern einzeln auf unterschiedlichen Zellen exprimiert wurden (Buchstaller et al., 1996; Pavlou et al., 2002). Dies führte zu der Annahme, dass für die heterophile Interaktion von L1 und TAG-1 eine besondere Konformation des TAG-1 und/oder eine Reduktion der homophilen Interaktion des TAG-1 erforderlich ist (Kunz et al., 1998; Pavlou et al., 2002). Eine homophile Interaktion von TAG-1 konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Rader et al., 1993; Felsenfeld et al., 1994; Pavlou et al., 2002). Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit, ist es möglich, dass Glykanstrukturen die erforderliche Konformationsänderung und/oder Störung der homophilen Interaktion des TAG-1 für die nachfolgende Interaktion von TAG-1 und L1 auslösen oder anregen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Glykanstrukturen für die Vermittlung der Interaktion von TAG-1 und L1 entscheidend sind, indem sie die beiden Proteine in einen erforderlichen Proteinkomplex führen. Für die Vermittlung der heterophilen Interaktion von L1 und TAG-1 konnte gezeigt werden, dass im L1-Molekül die 2., 3. und 4. lg-Domäne und die 3. FN-Domäne und innerhalb des TAG-1-Moleküls die ersten vier Ig-Domänen essentiell sind (Rader et al., 1996; Malhotra et al., 1998; Kunz et al., 1998; Haspel und Grumet, 2003). Dabei überlappen die identifizierten Domänen

des TAG-1 interessanterweise mit der hier angenommenen Bindungsstelle des Lewis<sup>x</sup> innerhalb des TAG-1-Moleküls. Diese Hinweise der Beteiligung von Glykanen an der heterophilen *cis*-Interaktion von TAG-1 und L1 schließen allerdings nicht aus, dass auch eine Beteiligung der Glykane an einer möglichen heterophilen *trans*-Interaktion, die auch beschrieben wurde (Pavlou *et al.*, 2002), von Bedeutung sein könnte.

Die Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3/Contactin spielen als Coeine Rolle L1-vermittelten, zuckerabhängigen Rezeptoren im Neuritenwachstum. Entgegen der beschriebenen Hypothese, dass mehrere Lewis<sup>x</sup>-Rezeptoren mit unterschiedlicher Expression auf Kleinhirnbzw. Hinterwurzelganglienneuronen als Erklärung für die gegensätzlichen CD24abhängigen Effekte auf das Neuritenwachstum der beiden neuronalen Zelltypen dienen könnten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur das Zelladhäsionsmolekül TAG-1 als ein neuronaler Rezeptor für Lewis<sup>x</sup>-tragende Zuckerstrukturen identifiziert werden. Allerdings konnten Expressionsunterschiede für TAG-1 in den verwendeten neuronalen Zelltypen und den gewählten Bedingungen gezeigt werden: Eine hohe Expression von TAG-1 zeigten die Kleinhirnneurone, während auf den Hinterwurzelganglienneuronen nur geringe Mengen detektierbar waren (s. 4.9.2). TAG-1 zeigt allgemein eine transiente Expression während der Entwicklung des Nervensystems, die während des initialen Axonwachstums von Neuronen der Hinterwurzelganglien und anderen neuronalen Zelltypen sehr hoch ist und dann absinkt (Dodd et al., 1988; Furley et al., 1990; Karagogeos et al., 1991). Während der Entwicklung des Kleinhirns ist auch zuerst eine Expression von TAG-1 auf sich differenzierenden Körnerzellen detektierbar, die dann durch eine Expression von F3/Contactin während ihrer Migration ersetzt wird (Bizzoca et al., 2003). Im Gegensatz zu TAG-1 bleibt eine Expression von F3/Contactin auch auf adulten Axonen detektierbar (Theveniau et al., 1992; Faivre-Sarrailh et al., 1992). Auch unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Bedingungen zeigte F3/Contactin eine entgegengesetzte Expression zu TAG-1: Für die hier verwendeten Kleinhirnneuronen konnte keine Expression von F3/Contactin detektiert werden, F3/Contactin allerdings Hinterwurzelganglienneuronen konnte auf den

nachgewiesen werden (s. 4.9.2). Für die beiden Moleküle TAG-1 und F3/Contactin wurden bereits antagonistische Funktionen beschrieben. Buttiglione et al. untersuchten in vitro die Effekte von Zellen der CHO-Zelllinie, die mit TAG-1 und F3/Contactin co-transfiziert waren. auf Primärzellkulturen von Kleinhirnneuronen und verglichen sie mit einzeln transfizierten CHO-Zellen. Sie konnten eine funktionelle Interaktion der beiden Zelladhäsionsmoleküle zeigen und, dass im Fall einer Co-Transfektion, TAG-1 die F3/Contactin-abhängigen Effekte auf die Kleinhirnneuronen unterbindet (Buttiglione et al., 1998). Einen weiteren Hinweis auf antagonistische Funktionen von TAG-1 und F3/Contactin lieferte eine transgene Maus, die F3/Contactin unter dem TAG-1-Promotor exprimiert (Bizzoca et al., 2003). Kleinhirnneurone dieser transgenen Maus zeigten in Primärkulturexperimenten eine Inhibition des Neuritenwachstums im Vergleich zu Wildtypneuronen. Aus diesen Studien folgert die Annahme, dass TAG-1 eher einen fördernden Einfluss auf das Axonwachstum während der Entwicklung hat und F3/Contactin eher als ein Inhibitor oder Stabilisator des Axonwachstums dient. Der Antagonismus dieser beiden Zelladhäsionsmoleküle und ihre regulierte Expression scheint verschiedene Stufen während der Entwicklung und Differenzierung der Neuronen zu definieren und kann mitentscheidend für eine korrekte Morphogenese sein (Buttiglione et al., 1998; Bizzoca et al., 2003). Beide Proteine haben aufgrund ihrer GPI-Verankerung in der Zellmembran keinen direkten Kontakt zum Zytoplasma. Ein denkbarer Mechanismus für die antagonistischen Funktionen des TAG-1 und F3/Contactins wäre daher, dass beide Proteine zusätzlich mit verschiedenen Bindungspartnern in Komplexen assoziiert sind und so die Expression von TAG-1 und F3/Contactin und ihrer assoziierten Bindungspartner die Effekte auf das Neuritenwachstum bestimmt.

Eine mögliche darausfolgende Hypothese, um nun die Förderung des CD24abhängigen Neuritenwachstums der Kleinhirnneuronen und die Inhibition des CD24-abhängigen Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneuronen unter den im Rahmen dieser Arbeit gewählten Bedingungen zu erklären, wird im folgenden beschrieben (**Abb. 5.2**). Für das CD24-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirn- und Hinterwurzelganglienneuronen ist L1 als neuronaler Rezeptor Seite 126

für  $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäuren von essentieller Bedeutung (Kleene *et al.*, 2001). Das Neuritenwachstum wird über L1 vermittelt, ist aber abhängig von den Zuckerstrukturen des CD24,  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup>. Als neuronaler Rezeptor für Lewis<sup>x</sup>-tragende Zuckerstrukturen konnte TAG-1 identifiziert werden. Die Förderung des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen, die TAG-1 aber nicht F3/Contactin exprimieren, könnte daher durch folgenden Mechanismus erklärt werden (Abb. 5.2 A):  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup> des CD24 vermitteln die heterophile Interaktion von L1 und TAG-1. Eine homophile Interaktion von TAG-1 ist aufgrund seiner hohen Expression möglich, aber nicht entscheidend. TAG-1 ist mit anderen Bindungspartnern assoziiert, die dann gemeinsam mit L1 in einem Proteinkomplex eine Stimulation des Neuritenwachstums bewirken. Ein möglicher Kandidat für den weiteren Bindungspartner des TAG-1 ist NrCAM, das auch wie L1 und TAG-1 ein Mitglied der Ig-Superfamilie ist (s. 1.3.1). Für NrCAM konnten bereits eine Interaktion mit TAG-1 (Suter et al., 1995) und ein synergistischer Effekt mit L1 auf die Förderung von Neuritenwachstum nachgewiesen werden (Sakurai et al., 2001). In diesem Zusammenhang kann dann die Inhibition des Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneuronen, die eine Expression von F3/Contactin und nur eine schwache Expression von TAG-1 zeigen, wie folgt beschrieben werden (**Abb. 5.2 B**): Wiederum vermitteln  $\alpha$ 2,3-verknüpfte Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup> des CD24 die heterophile Interaktion von L1 und TAG-1. Hier führt nun aber die Expression von F3/Contactin zur Bildung eines heterophilen Komplexes aus TAG-1 und F3/Contactin. Eine heterophile Interaktion von TAG-1 und F3/Contactin konnte bereits gezeigt werden (Buttiglione et al., 1998; Pavlou et al., 2002), Hinweise auf eine homophile Interaktion des F3/Contactin gibt es bisher nicht (Faivre-Sarrailh et al., 1999; Pavlou et al., 2002). Die Assoziation des F3/Contactin mit weiteren neuronalen Bindungspartnern könnte dann im Zusammenspiel mit L1 eine inhibitorische Wirkung auf das Neuritenwachstum der Hinterwurzelganglienneurone haben. Ein möglicher Kandidat stellt in diesem Fall CASPR/paranodin dar, das als Bindungspartner von F3/Contactin beschrieben wurde (Faivre-Sarrailh et al., 2000). Einen weiteren Hinweis auf die in Abbildung 5.2 dargestellten

Proteinkomplexe lieferten auch die durchgeführten Immunpräzipitationen (s. 4.9.4). Bei der Analyse der Immunpräzipitate des anti-CD24-Antikörpers zeigte sich, dass neben L1 auch TAG-1 und F3/Contactin im Präzipitat detektiert werden konnten. F3/Contactin war allerdings nur in geringen Mengen im Präzipitat nachweisbar. Dies spricht dafür, dass die Proteine L1, TAG-1 und F3/Contactin in einem Komplex mit CD24 assoziiert vorliegen können und Interaktionen, wie sie in der **Abbildung 5.2** beschrieben wird, möglich sind.



Förderung des Neuritenwachstums

Inhibition des Neuritenwachstums

Abb. 5.2: Modell für die Rolle der Glykane Lewis<sup>x</sup> und α2,3-verknüpfte Sialinsäuren in der Modulation von Glia-Neuron-Interaktionen. (A) Die Glykane α2,3-verknüpfte Sialinsäuren (Sia) und Lewis<sup>x</sup> (Le<sup>x</sup>) des CD24 auf Astrozyten vermitteln die Interaktion von L1 und TAG-1 auf Kleinhirnneuronen, indem L1 α2,3verknüpfte Sialinsäuren und TAG-1 Lewis× bindet. TAG-1 kann homophil interagieren und bindet einen weiteren Interaktionspartner (Xs) in cis. Die gemeinsame Assoziation mit L1 führt dann zu einer Signaltransduktion, die eine Förderung des Neuritenwachstums bewirkt. **(B)** L1 der Hinterwurzelganglieneuronen bindet α2,3-verknüpfte Sialinsäuren des CD24 der Astrozyten und TAG-1 bindet Lewisx des CD24 auf Astrozyten. Die Expression von F3/Contactin (F3) führt zur heterophilen Interaktion von TAG-1 und F3/Contactin. Die Interaktion des F3/Contactins mit einem inhibitorischen Bindungspartner (Xi) in cis führt dann in Zusammenhang mit L1 zu einer inhibitorischen Signaltransduktion, die zur Inhibition des Neuritenwachstums der Hinterwurzelganglienneuronen führt.

Bei der Untersuchung, ob TAG-1 und F3/Contactin eine Beeinflussung des CD24abhängigen Neuritenwachstums zeigen, konnte dies nur für den anti-TAG-1-Antikörper und nicht für den anti-F3/Contactin-Antikörper gezeigt werden (s. 4.9.5). Der anti-TAG-1-Antikörper bindet an TAG-1 und könnte die Interaktion von TAG-1 und L1 verhindern und so den jeweiligen Prozess blockieren, der im Fall der Kleinhirnneuronen zur Förderung und im Fall der Hinterwurzelganglienneuronen zur Inhibition des Neuritenwachstums führt. Möglich wäre, dass das F3/Contactin in seinem heterophilen Komplex mit TAG-1 im Fall der Hinterwurzelganglienneuronen nicht mehr für den F3-Antikörper zugänglich ist, und so dieser Antikörper keinen Einfluss auf das CD24-abhängige Neuritenwachstum der Hinterwurzelganglienneuronen haben kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass verschiedene Zuckerstrukturen für die Vermittlung von Glia-Neuron-Interaktionen von großer Bedeutung sein können. Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Funktionen des hochglykosylierten CD24 wurden über die O-verknüpften Glykane des Proteins vermittelt. Der kleine Proteinkern des CD24 scheint an der Vermittlung der Funktionen nicht beteiligt zu sein. Eine genaue Analyse der Glykosylierung des CD24 könnte weitere interessante Ergebnisse für die funktionelle Bedeutung liefern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass zelltypspezifische Glykosylierungsmuster von Glykoproteinen und Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen eine entscheidende Rolle spielen, da auch darüber Funktionen und Interaktionen vermittelt und moduliert werden können. Weitere Untersuchungen müssen die angenommenen *cis*-Interaktionswege aber noch bestätigen.

## 6 Zusammenfassung

Zuckerverbindungen (Glykane) werden vermehrt funktionelle Bedeutungen bei der Vermittlung und Modulation von Zell-Zell-Interaktionen im Nervensystem zugesprochen. Die Interaktion der neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1 und CD24 zeigt eine Abhängigkeit von  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäureresten des CD24, die sowohl für die direkte Bindung der beiden als auch für die von CD24 vermittelten Funktionen entscheidend sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bindungsstelle des CD24 im L1-Molekül lokalisiert werden. Die α2,3-verknüpften Sialinsäurereste des CD24 binden innerhalb einer Konsensussequenz in der ersten Fibronektin Typ III Domäne des L1, die Ähnlichkeiten zu den Mitgliedern der siglec-Familie (sialic acid binding Ig*like lectin*) zeigt. CD24 kommt im Maushirn in drei Glykoformen mit scheinbaren Molekulargewichten von ca. 27 kDa, 30 kDa und 33 kDa vor, die sich in ihrem Glykosylierungsmuster unterscheiden. Alle drei Glykoformen tragen N-verknüpfte Glykane, zusätzlich tragen die 30 kDa- und 33 kDa-Glykoformen a2.3-verknüpfte Sialinsäuren, Lewis<sup>x</sup> und HNK-1 auf O-verknüpften Glykanen. Die O-Glykane des CD24 vermitteln auch seine Bindung an L1 und das CD24-abhängige Neuritenwachstum, während die N-Glykane für die Vermittlung dieser Funktionen nicht entscheidend zu sein scheinen. Sowohl die  $\alpha$ 2,3-verknüpften Sialinsäuren als auch das Lewis<sup>x</sup>-Epitop auf O-Glykanen des CD24 sind für die Vermittlung der CD24-abhängigen Förderung des Neuritenwachstums von Kleinhirnneuronen CD24-abhängigen Inhibition des Neuritenwachstums bzw. der von Hinterwurzelganglienneuronen essentiell. Aufgrund von Seguenzhomologien zu fucose- und Lewis<sup>x</sup>-spezifischen Lektinen kann das Zelladhäsionsmolekül TAG-1 als neuronaler Lewis<sup>x</sup>-spezifischer Rezeptor identifiziert werden. TAG-1 bindet spezifisch an Lewis<sup>x</sup>-tragende Glykane, zeigt eine Interaktion mit CD24 und beeinflusst das CD24-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen. Die Bindung von  $\alpha 2,3$ -verknüpften Sialinsäuren und Lewis<sup>x</sup> des CD24 an ihre neuronalen Rezeptoren L1 bzw. TAG-1 könnte die Interaktion der beiden Zelladhäsionsmoleküle vermitteln. Die zuckerabhängige

Interaktion von CD24, L1 und TAG-1 könnte Interaktionen von L1 bzw. TAG-1 mit verschiedenen neuronalen Co-Rezeptoren induzieren, die dann eine Inhibition oder Förderung des Neuritenwachstums von Kleinhirn- bzw. Hinterwurzelganglienneuronen auslösen.

### 7 Summary

Glycans have been increasingly recognized to be important players in cell interactions in the nervous system. The interaction of neural cell adhesion molecules L1 and CD24 has been shown to depend on glycans. Sialic acid residues on CD24 are essential for binding of CD24 to L1 and for CD24 induced effects on neurite outgrowth.

The  $\alpha$ 2,3-linked sialic acid residues of CD24 are recognized by a siglec (sialic acid binding Ig-like lectin) homologous sequence in the first fibronectin type III domain of the neural cell adhesion molecule L1. The CD24 glycoforms identified in mouse brain with apparent molecular weights of approximately 27 kDa, 30 kDa and 33 kDa differ in their glycosylation pattern. The 30 kDa and 33 kDa glycoforms carry the Lewis<sup>x</sup> epitope, the HNK-1 epitope and  $\alpha$ 2,3-linked sialic acid residues on O-linked glycans, whereas the 27 kDa glycoforms does not carry these glycan structures. All three glycoforms carry N-linked glycans. The O-glycans rather than the N-glycans are also responsible for binding of CD24 to L1 and for CD24 induced effects on neurite outgrowth of cerebellar and dorsal root ganglion neurons, respectively. CD24 induced promotion and inhibition of neurite outgrowth of cerebellar and dorsal root ganglion neurons, respectively, depend on  $\alpha 2,3$ linked sialic acid and Lewis<sup>x</sup>. According to the observation that the neural cell adhesion molecule TAG-1 shows sequence homologies to fucose- and Lewis<sup>x</sup>specific lectins, TAG-1 is identified as a neuronal Lewis<sup>x</sup> specific receptor. TAG-1 shows a specific binding to Lewis<sup>x</sup> carrying glycans, an interaction with CD24 and plays a role in CD24 induced neurite outgrowth of cerebellar neurons and dorsal root ganglion neurons. CD24 may mediate the linkage of L1 and TAG-1 via binding of  $\alpha$ 2,3-linked sialic acid and Lewis<sup>x</sup> to their neuronal receptors L1 and TAG-1, respectively. Thus, different co-receptors for L1 and TAG-1 within the neuronal cell surface may elicit promotion or inhibition of neurite outgrowth induced by CD24 in a glycan-dependent interaction.

## 8 Literatur

Allendoerfer,K.L., J.L.Magnani, and P.H.Patterson. 1995. FORSE-1, an antibody that labels regionally restricted subpopulations of progenitor cells in the embryonic central nervous system, recognizes the Le(x) carbohydrate on a proteoglycan and two glycolipid antigens. *Mol Cell Neurosci*. 6:381-95.

Appel, F., J.Holm, J.F.Conscience, H.F.Bohlen und, A.Faissner, P.James, and M.Schachner. 1995. Identification of the border between fibronectin type III homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain. *J. Neurobiol.* 28:297-312.

Appel, F., J.Holm, J.F.Conscience, and M.Schachner. 1993. Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J. Neurosci.* 13:4764-4775.

Arami,S., M.Jucker, M.Schachner, and H.Welzl. 1996. The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav Brain Res.* 81:81-87.

Ausubel,L.J., C.K.Kwan, A.Sette, V.Kuchroo, and D.A.Hafler. 1996. Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:15317-15322.

Beltran-Valero,d.B., S.Currier, A.Steinbrecher, J.Celli, E.van Beusekom, Z.B.van der, H.Kayserili, L.Merlini, D.Chitayat, W.B.Dobyns, B.Cormand, A.E.Lehesjoki, J.Cruces, T.Voit, C.A.Walsh, H.van Bokhoven, and H.G.Brunner. 2002. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 71:1033-1043.

Belvindrah, R., G.Rougon, and G.Chazal. 2002. Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *J. Neurosci.* 22:3594-3607.

Bizzoca, A., D.Virgintino, L.Lorusso, M.Buttiglione, L.Yoshida, A.Polizzi, M.Tattoli, R.Cagiano, F.Rossi, S.Kozlov, A.Furley, and G.Gennarini. 2003. Transgenic mice expressing F3/contactin from the TAG-1 promoter exhibit developmentally regulated changes in the differentiation of cerebellar neurons. *Development* 130:29-43.

Blaess, S., R.A.Kammerer, and H.Hall. 1998. Structural analysis of the sixth immunoglobulin-like domain of mouse neural cell adhesion molecule L1 and its interactions with alpha(v)beta3, alpha(IIb)beta3, and alpha5beta1 integrins. *J Neurochem*. 71:2615-25. extension.

Brummendorf, T., M.Hubert, U.Treubert, R.Leuschner, A.Tarnok, and F.G.Rathjen. 1993. The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10:711-727.

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

Brummendorf, T. and F.G.Rathjen. 1996. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:584-593.

Buchstaller, A., S.Kunz, P.Berger, B.Kunz, U.Ziegler, C.Rader, and P.Sonderegger. 1996. Cell adhesion molecules NgCAM and axonin-1 form heterodimers in the neuronal membrane and cooperate in neurite outgrowth promotion. *J. Cell Biol.* 135:1593-1607.

Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.

Buttiglione, M., J.M.Revest, O.Pavlou, D.Karagogeos, A.Furley, G.Rougon, and C.Faivre-Sarrailh. 1998. A functional interaction between the neuronal adhesion molecules TAG-1 and F3 modulates neurite outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 18:6853-6870.

Buttiglione, M., J.M.Revest, G.Rougon, and C.Faivre-Sarrailh. 1996. F3 neuronal adhesion molecule controls outgrowth and fasciculation of cerebellar granule cell neurites: a cell-type-specific effect mediated by the Ig-like domains. *Mol. Cell Neurosci.* 8:53-69.

Calaora, V., G.Chazal, P.J.Nielsen, G.Rougon, and H.Moreau. 1996. mCD24 expression in the developing mouse brain and in zones of secondary neurogenesis in the adult. *Neuroscience* 73:581-594.

Castellani,V., A.Chedotal, M.Schachner, C.Faivre-Sarrailh, and G.Rougon. 2000. Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27:237-249.

Castellani, V., E.De Angelis, S.Kenwrick, and G.Rougon. 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. *EMBO J.* 21:6348-6357.

Chai,W., C.T.Yuen, H.Kogelberg, R.A.Carruthers, R.U.Margolis, T.Feizi, and A.M.Lawson. 1999. High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* 263:879-888.

Chen, S., N.Mantei, L.Dong, and M.Schachner. 1999. Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J. Neurobiol.* 38:428-439.

Chen,Y.J., D.R.Wing, G.R.Guile, R.A.Dwek, D.J.Harvey, and S.Zamze. 1998. Neutral N-glycans in adult rat brain tissue--complete characterisation reveals fucosylated hybrid and complex structures. *Eur. J. Biochem.* 251:691-703.

Cheng,L., K.Itoh, and V.Lemmon. 2005. L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixinmoesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J. Neurosci.* 25:395-403.

Cheng,L. and V.Lemmon. 2004. Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect neurite outgrowth and branching on an L1 substrate. *Mol. Cell Neurosci.* 27:522-530.

Cheng,W., E.Bullitt, L.Bhattacharyya, C.F.Brewer, and L.Makowski. 1998. Electron microscopy and x-ray diffraction studies of *Lotus tetragonolobus* A isolectin cross-linked with a divalent Lewis<sup>x</sup> oligosaccharide, an oncofetal antigen. *J. Biol. Chem.* 273:35016-22.

Chiba, A., K.Matsumura, H.Yamada, T.Inazu, T.Shimizu, S.Kusunoki, I.Kanazawa, A.Kobata, and T.Endo. 1997. Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alphadystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alphadystroglycan with laminin. *J. Biol. Chem.* 272:2156-2162. Chou, D.K., J.E.Evans, and F.B.Jungalwala. 2001. Identity of nuclear high-mobility-group protein, HMG-1, and sulfoglucuronyl carbohydrate-binding protein, SBP-1, in brain. *J. Neurochem.* 77:120-131.

Chou, D.K., S.Tobet, and F.B.Jungalwala. 2000. Interaction of sulfoglucuronyl (HNK-1) carbohydrate and its binding protein, SBP-1, in microexplant cultures of rat cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 59:188-201.

Cohen,N.R., J.S.Taylor, L.B.Scott, R.W.Guillery, P.Soriano, and A.J.Furley. 1998. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr. Biol.* 8:26-33.

Crocker, P.R., E.A.Clark, M.Filbin, S.Gordon, Y.Jones, J.H.Kehrl, S.Kelm, N.Le Douarin, L.Powell, J.Roder, R.L.Schnaar, D.C.Sgroi, K.Stamenkovic, R.Schauer, M.Schachner, T.K.van den Berg, P.A.van der Merwe, S.M.Watt, and A.Varki. 1998. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8:v.

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

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

Dahlin-Huppe,K., E.O.Berglund, B.Ranscht, and W.B.Stallcup. 1997. Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol Cell Neurosci.* 9: 144-156

Dahme, M., U.Bartsch, R.Martini, B.Anliker, M.Schachner, and N.Mantei. 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat. Genet.* 17:346-349.

Davis, J.Q. and V.Bennett. 1994. Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* 269:27163-27166.

De Angelis, E., J.MacFarlane, J.S.Du, G.Yeo, R.Hicks, F.G.Rathjen, S.Kenwrick, and T.Brummendorf. 1999. Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *EMBO J.* 18:4744-4753.

De Angelis, E., A.Watkins, M.Schafer, T.Brummendorf, and S.Kenwrick. 2002. Disease-associated mutations in L1 CAM interfere with ligand interactions and cell-surface expression. *Hum. Mol. Genet.* 11:1-12.

deBellard,M.E., S.Tang, G.Mukhopadhyay, Y.J.Shen, and M.T.Filbin. 1996. Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol. Cell Neurosci.* 7:89-101.

DeBernardo, A.P., and S.Chang. 1996. Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J Cell Biol*. 133:657-66.

Dodd, J., S.B.Morton, D.Karagogeos, M.Yamamoto, and T.M.Jessell. 1988. Spatial regulation of axonal glycoprotein expression on subsets of embryonic spinal neurons. *Neuron* 1:105-116.

Doherty, P., and F.S.Walsh. 1996. CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol Cell Neurosci.* 8:99-11.

Du,Y.Z., A.K.Srivastava, and C.E.Schwartz. 1998. Multiple exon screening using restriction endonuclease fingerprinting (REF): detection of six novel mutations in the L1 cell adhesion molecule (L1CAM) gene. *Hum. Mutat.* 11:222-230.

Edelman, G.M. and K.L.Crossin. 1991. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem.* 60:155-190.

Edelman,G.M., B.A.Cunningham, W.E.Gall, P.D.Gottlieb, U.Rutishauser, and M.J.Waxdal. 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 63:78-85.

Endo, T. and T.Toda. 2003. Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol. Pharm. Bull.* 26:1641-1647.

Ennas, M.G., D.Cocchia, E.Silvetti, V.Sogos, A.Riva, S.Torelli, and F.Gremo. 1992. Immunocompetent cell markers in human fetal astrocytes and neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* 32:424-436.
Espinosa, B., R.Zenteno, R.Mena, Y.Robitaille, E.Zenteno, and J.Guevara. 2001. O-Glycosylation in sprouting neurons in Alzheimer disease, indicating reactive plasticity. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60:441-8.

Faissner, A., J.Kruse, J.Nieke, and M.Schachner. 1984. Expression of neural cell adhesion molecule L1 during development, in neurological mutants and in the peripheral nervous system. *Brain Res.* 317:69-82.

Faivre-Sarrailh, C., F. Gauthier, N. Denisenko-Nehrbass, A. Le Bivic, G. Rougon, and J.A. Girault. 2000. The glycosylphosphatidyl inositol-anchored adhesion molecule F3/contactin is required for surface transport of paranodin/contactin-associated protein (caspr). *J. Cell Biol.* 149:491-502.

Faivre-Sarrailh, C., J.Falk, E.Pollerberg, M.Schachner, and G.Rougon. 1999. NrCAM, cerebellar granule cell receptor for the neuronal adhesion molecule F3, displays an actin-dependent mobility in growth cones. *J. Cell Sci.* 112 Pt 18:3015-3027.

Faivre-Sarrailh, C. and G.Rougon. 1997. Axonal molecules of the immunoglobulin superfamily bearing a GPI anchor: their role in controlling neurite outgrowth. *Mol. Cell Neurosci.* 9:109-115.

Faivre-Sarrailh,C., G.Gennarini, C.Goridis, and G.Rougon. 1992. F3/F11 cell surface molecule expression in the developing mouse cerebellum is polarized at synaptic sites and within granule cells. *J Neurosci*. 12:257-67.

Falk, J., C.Bonnon, J.A.Girault, and C.Faivre-Sarrailh. 2002. F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination. *Biol. Cell* 94:327-334.

Felsenfeld, D.P., M.A.Hynes, K.M.Skoler, A.J.Furley, and T.M.Jessell. 1994. TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and beta 1 integrins. *Neuron* 12:675-690.

Filbin, M.T. 1996. The muddle with MAG. *Mol Cell Neurosci*. 8:84-92.

Finckh,U., J.Schroder, B.Ressler, A.Veske, and A.Gal. 2000. Spectrum and detection rate of L1CAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease. *Am. J. Med. Genet.* 92:40-46.

Finne, J., U.Finne, H.Deagostini-Bazin, and C.Goridis. 1983. Occurrence of alpha 2-8 linked polysialosyl units in a neural cell adhesion molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 112:482-7.

Fischer,G., V.Kunemund, and M.Schachner. 1986. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J. Neurosci.* 6:605-612.

Fortini, M.E. 2000. Fringe benefits to carbohydrates. *Nature* 406:357-358.

Franco, B., S.Guioli, A.Pragliola, B.Incerti, B.Bardoni, R.Tonlorenzi, R.Carrozzo, E.Maestrini, M.Pieretti, P.Taillon-Miller, and . 1991. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353:529-536.

Franke, J. 2004. Isolierung und funktionelle Charakterisierung von Saccharid mimikrierenden Peptiden zur Blockierung der Adhäsion von Pseudomonas aeruginosa an Epithelien des Respirationstraktes (Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg).

Fransen, E., R.D'Hooge, G.Van Camp, M.Verhoye, J.Sijbers, E.Reyniers, P.Soriano, H.Kamiguchi, R.Willemsen, S.K.Koekkoek, C.I.De Zeeuw, P.P.De Deyn, L.A.Van der, V.Lemmon, R.F.Kooy, and P.J.Willems. 1998. L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum. Mol. Genet.* 7:999-1009.

Fransen, E., V.Lemmon, G.Van Camp, L.Vits, P.Coucke, and P.J.Willems. 1995. CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur. J. Hum. Genet.* 3:273-284.

Friedlander, D.R., P.Milev, L.Karthikeyan, R.K.Margolis, R.U.Margolis, and M.Grumet. 1994. The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 125:669-680.

Furley, A.J., S.B.Morton, D.Manalo, D.Karagogeos, J.Dodd, and T.M.Jessell. 1990. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61:157-170.

Garwood, J., O.Schnadelbach, A.Clement, K.Schutte, A.Bach, and A.Faissner. 1999. DSD-1proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage. *J. Neurosci.* 19:3888-3899.

Gennarini,G., G.Cibelli, G.Rougon, M.G.Mattei, and C.Goridis. 1989. The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. *J. Cell Biol.* 109:775-788.

Gocht, A., G.Struckhoff, and J.Lhler. 1996. CD15-containing glycoconjugates in the central nervous system. *Histol. Histopathol.* 11:1007-1028.

Griffith,L.S., B.Schmitz, and M.Schachner. 1992. L2/HNK-1 carbohydrate and protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule P0. *J Neurosci Res.* 33:639-48.

Grumet, M., D.R. Friedlander, and G.M. Edelman. 1993. Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun.* 1:177-90.

Grumet, M. and G.M.Edelman. 1988. Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. *J Cell Biol*. 06:487-503.

Hall, H., S.Carbonetto, and M.Schachner. 1997. L1/HNK-1 carbohydrate- and beta 1 integrindependent neural cell adhesion to laminin-1. *J. Neurochem.* 68:544-553.

Hall,H., T.Vorherr, and M.Schachner. 1995. Characterization of a 21 amino acid peptide sequence of the laminin G2 domain that is involved in HNK-1 carbohydrate binding and cell adhesion. *Glycobiology* 5:435-441.

Haltiwanger, R.S. 2002. Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* 12:593-8.

Haltiwanger, R.S. and J.B.Lowe. 2004. Role of glycosylation in development. *Annu. Rev. Biochem.* 73:491-537.

Haltiwanger, R.S. and P.Stanley. 2002. Modulation of receptor signaling by glycosylation: fringe is an O-fucose-beta1, 3-N-acetylglucosaminyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1573:328-335.

Hardelin, J.P., J.Levilliers, S.Blanchard, J.C.Carel, M.Leutenegger, J.P.Pinard-Bertelletto, P.Bouloux, and C.Petit. 1993. Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2:373-377.

Haspel, J., D.R. Friedlander, N. Ivgy-May, S. Chickramane, C. Roonprapunt, S. Chen, M. Schachner, and M. Grumet. 2000. Critical and optimal Ig domains for promotion of neurite outgrowth by L1/Ng-CAM. *J. Neurobiol.* 42:287-302.

Haspel, J. and M.Grumet. 2003. The L1CAM extracellular region: a multi-domain protein with modular and cooperative binding modes. *Front Biosci.* 8:s1210-s1225.

Heukeshoven, J. and R.Dernick. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28-32.

Holm, J., F.Appel, and M.Schachner. 1995. Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in homophilic interactions. *J. Neurosci. Res.* 42:9-20.

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

Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25.

Jessell, T.M., M.A.Hynes, and J.Dodd. 1990. Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 13:227-255.

Kadmon,G., H.F.Bohlen und, R.Horstkorte, M.Eckert, P.Altevogt, and M.Schachner. 1995. Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7:993-1004.

Kadmon,G., M.Eckert, M.Sammar, M.Schachner, and P.Altevogt. 1992. Nectadrin, the heat-stable antigen, is a cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 118:1245-1258.

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

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

Kamiguchi, H., M.L.Hlavin, and V.Lemmon. 1998. Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol. Cell Neurosci.* 12:48-55.

Karagogeos, D. 2003. Neural GPI-anchored cell adhesion molecules. Front Biosci. 8:1304-20.

Karagogeos, D., S.B.Morton, F.Casano, J.Dodd, and T.M.Jessell. 1991. Developmental expression of the axonal glycoprotein TAG-1: differential regulation by central and peripheral neurons in vitro. *Development* 112:51-67.

Kay, R., F.Takei, and R.K.Humphries. 1990. Expression cloning of a cDNA encoding M1/69-J11d heat-stable antigens. *J. Immunol.* 145:1952-1959.

Kelm,S., A.Pelz, R.Schauer, M.T.Filbin, S.Tang, M.E.de Bellard, R.L.Schnaar, J.A.Mahoney, A.Hartnell, and P.Bradfield. 1994. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Biol.* 4:965-972.

Kelm,S. and R.Schauer. 1997. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175:137-240.

Kelm,S., R.Schauer, and P.R.Crocker. 1996. The Sialoadhesins--a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. *Glycoconj. J.* 13:913-926.

Kemler, R., M.Ozawa, and M.Ringwald. 1989. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:892-897.

Kenwrick, S., A.Watkins, and E.De Angelis. 2000. Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum. Mol. Genet.* 9:879-886.

Kiryushko, D., V.Berezin, and E.Bock. 2004. Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014:140-154.

Kleene, R. and M.Schachner. 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 5:195-208.

Kleene, R., H.Yang, M.Kutsche, and M.Schachner. 2001. The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 276:21656-21663.

Konami,Y., K.Yamamoto, T.Osawa, and T.Irimura. 1992. Correlation between carbohydrate-binding specificity and amino acid sequence of carbohydrate-binding regions of Cytisus-type anti-H(O) lectins. *FEBS Lett.* 304: 129-35.

Kornblihtt,A.R., K.Umezawa, K.Vibe-Pedersen, and F.E.Baralle. 1985. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4:1755-1759.

Kornfeld, R. and S.Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 54:631-64.

Kottgen, E., W.Reutter, and R.Tauber. 2003. [Human lectins and their correspondent glycans in cell biology and clinical medicine]. *Med. Klin. (Munich)* 98:717-738.

Kristiansen, G., M.Sammar, and P.Altevogt. 2004. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J. Mol. Histol.* 35:255-262.

Kruse, J., R.Mailhammer, H.Wernecke, A.Faissner, I.Sommer, C.Goridis, and M.Schachner. 1984. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311:153-155.

Kuchler, S., G.Rougon, P.Marschal, S.Lehmann, A.Reeber, G.Vincendon, and J.P.Zanetta. 1989. Location of a transiently expressed glycoprotein in developing cerebellum delineating its possible ontogenetic roles. *Neuroscience* 33:111-124.

Kuhn,T.B., E.T.Stoeckli, M.A.Condrau, F.G.Rathjen, and P.Sonderegger. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* 115:1113-1126.

Kunz, S., M.Spirig, C.Ginsburg, A.Buchstaller, P.Berger, R.Lanz, C.Rader, L.Vogt, B.Kunz, and P.Sonderegger. 1998. Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin-1 and Ng cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 143:1673-1690.

Kunz, S., U.Ziegler, B.Kunz, and P.Sonderegger. 1996. Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NgCAM during neurite fasciculation. *J. Cell Biol.* 135:253-267.

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

Lagenaur, C., M.Schachner, D.Solter, and B.Knowles. 1982. Monoclonal antibody against SSEA-1 is specific for a subpopulation of astrocytes in mouse cerebellum. *Neurosci Lett.* 16:181-4.

Law,J.W., A.Y.Lee, M.Sun, A.G.Nikonenko, S.K.Chung, A.Dityatev, M.Schachner, and F.Morellini. 2003. Decreased anxiety, altered place learning, and increased CA1 basal excitatory synaptic transmission in mice with conditional ablation of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci.* 23:10419-10432.

Lemmon, V., K.L.Farr, and C.Lagenaur. 1989. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron*. 2:1597-603.

Lindner, J., F.G.Rathjen, and M.Schachner. 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305:427-430.

Loers, G., S.Chen, M.Grumet, and M.Schachner. 2005. Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis. *J. Neurochem.* 92:1463-1476.

Lowe, J.B. and J.D.Marth. 2003. A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu. Rev. Biochem.* 72:643-691.

Lu,L., M.S.Chappel, R.K.Humphries, and D.G.Osmond. 2000. Regulation of cell survival during B lymphopoiesis: increased pre-B cell apoptosis in CD24-transgenic mouse bone marrow. *Eur. J. Immunol.* 30:2686-2691.

Luthl,A., J.P.Laurent, A.Figurov, D.Muller, and M.Schachner. 1994. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature*. 372:777-9.

Mai,J.K., S.Krajewski, G.Reifenberger, B.Genderski, S.Lensing-Hohn, and K.W.Ashwell. 1999. Spatiotemporal expression gradients of the carbohydrate antigen (CD15) (Lewis X) during development of the human basal ganglia. *Neuroscience* 88:847-858.

Malhotra, J.D., P.Tsiotra, D.Karagogeos, and M.Hortsch. 1998. Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 273:33354-33359.

Marquardt, T. and J.Denecke. 2003. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur. J. Pediatr.* 162:359-379.

Martin, P.T. and H.H.Freeze. 2003. Glycobiology of neuromuscular disorders. *Glycobiology* 13:67R-75R.

Martini,R., M.Schachner, and T.M.Brushart. 1994. The L2/HNK-1 carbohydrate is preferentially expressed by previously motor axon-associated Schwann cells in reinnervated peripheral nerves. *J. Neurosci.* 14:7180-7191.

Martini, R., Y.Xin, and M.Schachner. 1994. Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and neurites in culture. *Glia* 10:70-74.

Martini,R., and M.Schachner. 1986. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J Cell Biol.* 103:2439-48.

Michele, D.E., R.Barresi, M.Kanagawa, F.Saito, R.D.Cohn, J.S.Satz, J.Dollar, I.Nishino, R.I.Kelley, H.Somer, V.Straub, K.D.Mathews, S.A.Moore, and K.P.Campbell. 2002. Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418:417-22.

Milev, P., P.Maurel, M.Haring, R.K.Margolis, and R.U.Margolis. 1996. TAG-1/axonin-1 is a highaffinity ligand of neurocan, phosphacan/protein-tyrosine phosphatase-zeta/beta, and N-CAM. *J. Biol. Chem.* 271:15716-15723. Milev, P., D.R.Friedlander, T.Sakurai, L.Karthikeyan, M.Flad, R.K.Margolis, M.Grumet, and R.U.Margolis. 1994. Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol*. 127:1703-15.

Miura, R., I.M. Ethell, and Y.Yamaguchi. 2001. Carbohydrate-protein interactions between HNK-1reactive sulfoglucuronyl glycolipids and the proteoglycan lectin domain mediate neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *J. Neurochem.* 76:413-424.

Moore,S.A., F.Saito, J.Chen, D.E.Michele, M.D.Henry, A.Messing, R.D.Cohn, S.E.Ross-Barta, S.Westra, R.A.Williamson, T.Hoshi, and K.P.Campbell. 2002. Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418:422-5.

Moos, M., R.Tacke, H.Scherer, D.Teplow, K.Fruh, and M.Schachner. 1988. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334:701-703.

Moulding, H.D., R.L.Martuza, and S.D.Rabkin. 2000. Clinical mutations in the L1 neural cell adhesion molecule affect cell-surface expression. *J. Neurosci.* 20:5696-5702.

Mullis, K., F.Faloona, S.Scharf, R.Saiki, G.Horn, and H.Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1:263-273.

Nedelec, J., M.Pierres, H.Moreau, J.Barbet, P.Naquet, C.Faivre-Sarrailh, and G.Rougon. 1992. Isolation and characterization of a novel glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoconjugate expressed by developing neurons. *Eur. J. Biochem.* 203:433-442.

Olive, S., C.Dubois, M.Schachner, and G.Rougon. 1995. The F3 neuronal glycosylphosphatidylinositol-linked molecule is localized to glycolipid-enriched membrane subdomains and interacts with L1 and fyn kinase in cerebellum. *J. Neurochem.* 65:2307-2317.

Pavlou,O., K.Theodorakis, J.Falk, M.Kutsche, M.Schachner, C.Faivre-Sarrailh, and D.Karagogeos. 2002. Analysis of interactions of the adhesion molecule TAG-1 and its domains with other immunoglobulin superfamily members. *Mol. Cell Neurosci.* 20:367-381.

Poltorak, M., R.Sadoul, G.Keilhauer, C.Landa, T.Fahrig, and M.Schachner. 1987. Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J Cell Biol*. 105:1893-9.

Poncet, C., V.Frances, R.Gristina, C.Scheiner, J.F.Pellissier, and D.Figarella-Branger. 1996. CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules is transiently expressed during the development of human central nervous system and is a marker of human neural cell lineage tumors. *Acta Neuropathol. (Berl)* 91:400-408.

Qu,Q. and F.I.Smith. 2004. Alpha-dystroglycan interactions affect cerebellar granule neuron migration. *J. Neurosci. Res.* 76:771-782.

Rader, C., B.Kunz, R.Lierheimer, R.J.Giger, P.Berger, P.Tittmann, H.Gross, and P.Sonderegger. 1996. Implications for the domain arrangement of axonin-1 derived from the mapping of its NgCAM binding site. *EMBO J.* 15:2056-2068.

Rader, C., E.T. Stoeckli, U.Ziegler, T.Osterwalder, B.Kunz, and P.Sonderegger. 1993. Cell-cell adhesion by homophilic interaction of the neuronal recognition molecule axonin-1. *Eur. J. Biochem.* 215:133-141.

Rathjen, F.G. and M.Schachner. 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* 3:1-10.

Rathjen, F.G., J.M.Wolff, R.Frank, F.Bonhoeffer, and U.Rutishauser. 1987. Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation. *J Cell Biol*. 104:343-53. mechanism.

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

Rougon, G., L.A.Alterman, K.Dennis, X.J.Guo, and C.Kinnon. 1991. The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hematolymphoid and neural cell lineages. *Eur. J. Immunol.* 21:1397-1402.

Rougon, G. and O.Hobert. 2003. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:207-238.

Runker, A.E., U.Bartsch, K.A.Nave, and M.Schachner. 2003. The C264Y missense mutation in the extracellular domain of L1 impairs protein trafficking in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 23:277-86.

Saghatelyan,A.K., A.G.Nikonenko, M.Sun, B.Rolf, P.Putthoff, M.Kutsche, U.Bartsch, A.Dityatev, and M.Schachner. 2004. Reduced GABAergic transmission and number of hippocampal perisomatic inhibitory synapses in juvenile mice deficient in the neural cell adhesion molecule L1. *Mol Cell Neurosci*. 26:191-203.

Saghatelyan,A.K., S.Gorissen, M.Albert, B.Hertlein, M.Schachner, and A.Dityatev. 2000. The extracellular matrix molecule tenascin-R and its HNK-1 carbohydrate modulate perisomatic inhibition and long-term potentiation in the CA-1 region of the hippocampus. *Eur J Neurosci.* 12:3331-3342.

Sajdel-Sulkowska, E.M. 1998. Immunofluorescent detection of CD15-fucosylated glycoconjugates in primary cerebellar cultures and their function in glial-neuronal adhesion in the central nervous system. *Acta Biochim. Pol.* 45:781-790.

Sakurai, T., M.Lustig, J.Babiarz, A.J.Furley, S.Tait, P.J.Brophy, S.A.Brown, L.Y.Brown, C.A.Mason, and M.Grumet. 2001. Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J. Cell Biol.* 154:1259-1273.

Sambrook, J. and M.J.Gething. 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342:224-225.

Sammar, M., S.Aigner, and P.Altevogt. 1997. Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys. Acta* 1337:287-294.

Sammar, M., S.Aigner, M.Hubbe, V.Schirrmacher, M.Schachner, D.Vestweber, and P.Altevogt. 1994. Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin. *Int. Immunol.* 6:1027-1036.

Sanes, J.R. 1989. Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 12:491-516.

Schachner, M. and U.Bartsch. 2000. Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 29:154-165.

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

Schmidt,C., V.Kunemund, E.S.Wintergerst, B.Schmitz B, and M.Schachner. 1996. CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res*. 43:12-31.

Schmitz, B., J.Peter-Katalinic, H.Egge, and M.Schachner. 1993. Monoclonal antibodies raised against membrane glycoproteins from mouse brain recognize N-linked oligomannosidic glycans. *Glycobiology* 3:609-617.

Schwarzkopf, M., K.P.Knobeloch, E.Rohde, S.Hinderlich, N.Wiechens, L.Lucka, I.Horak, W.Reutter, and R.Horstkorte. 2002. Sialylation is essential for early development in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:5267-5270.

Senn, C., M.Kutsche, A.Saghatelyan, M.R.Bosl, J.Lohler, U.Bartsch, F.Morellini, and M.Schachner. 2002. Mice deficient for the HNK-1 sulfotransferase show alterations in synaptic efficacy and spatial learning and memory. *Mol. Cell Neurosci.* 20:712-729.

Sheikh,K.A., J.Sun, Y.Liu, H.Kawai, T.O.Crawford, R.L.Proia, J.W.Griffin, and R.L.Schnaar. 1999. Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:7532-7537.

Shevchenko, A., M.Wilm, O.Vorm, and M.Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.

Shewan, D., V.Calaora, P.Nielsen, J.Cohen, G.Rougon, and H.Moreau. 1996. mCD24, a glycoprotein transiently expressed by neurons, is an inhibitor of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 16:2624-2634.

Shi,S. and P.Stanley. 2003. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:5234-5239.

Silletti,S., F.Mei, D.Sheppard, and A.M.Montgomery. 2000. Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J. Cell Biol.* 149:1485-1502.

Smalheiser, N.R. and E.Kim. 1995. Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties. *J Biol Chem.* 270:15425-33.

Smalheiser, N.R., S.M.Haslam, M.Sutton-Smith, H.R.Morris, and A.Dell. 1998. Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J. Biol. Chem.* 273:23698-23703.

Smith, P.K., R.I.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner, M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, and D.C.Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.

Sokolowski,T., T.Peters, S.Perez, and A.Imberty. 1997. Conformational analysis of biantennary glycans and molecular modeling of their complexes with lentil lectin. *J Mol Graph Model*. 15: 37-42, 54.

Sonderegger, P. 1997. Axonin-1 and NgCAM as "recognition" components of the pathway sensor apparatus of growth cones: a synopsis. *Cell Tissue Res.* 290:429-439.

Soussi-Yanicostas, N., C.Faivre-Sarrailh, J.P.Hardelin, J.Levilliers, G.Rougon, and C.Petit. 1998. Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 19):2953-2965.

Stallcup,W.B. 2000. The third fibronectin type III repeat is required for L1 to serve as an optimal substratum for neurite extension. *J. Neurosci. Res.* 61:33-43.

Stanley, P. and L.Siminovitch. 1977. Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins. *Somatic. Cell Genet.* 3:391-405.

Stoeckli, E.T., T.B.Kuhn, C.O.Duc, M.A.Ruegg, and P.Sonderegger. 1991. The axonally secreted protein axonin-1 is a potent substratum for neurite growth. *J. Cell Biol.* 112:449-455.

Streit, A., A.Faissner, B.Gehrig, and M.Schachner. 1990. Isolation and biochemical characterization of a neural proteoglycan expressing the L5 carbohydrate epitope. *J. Neurochem.* 55:1494-1506.

Streit, A., C.T.Yuen, R.W.Loveless, A.M.Lawson, J.Finne, B.Schmitz, T.Feizi, and C.D.Stern. 1996. The Le(x) carbohydrate sequence is recognized by antibody to L5, a functional antigen in early neural development. *J. Neurochem.* 66:834-844.

Strekalova, T., C.T.Wotjak, and M.Schachner. 2001. Intrahippocampal administration of an antibody against the HNK-1 carbohydrate impairs memory consolidation in an inhibitory learning task in mice. *Mol. Cell Neurosci.* 17:1102-1113.

Sun, J., N.L.Shaper, S.Itonori, M.Heffer-Lauc, K.A.Sheikh, and R.L.Schnaar. 2004. Myelinassociated glycoprotein (Siglec-4) expression is progressively and selectively decreased in the brains of mice lacking complex gangliosides. *Glycobiology* 14:851-857.

Suter, D.M., G.E.Pollerberg, A.Buchstaller, R.J.Giger, W.J.Dreyer, and P.Sonderegger. 1995. Binding between the neural cell adhesion molecules axonin-1 and Nr-CAM/Bravo is involved in neuron-glia interaction. *J Cell Biol.* 131:1067-81.

Suzuki, T., N.Kiyokawa, T.Taguchi, T.Sekino, Y.U.Katagiri, and J.Fujimoto. 2001. CD24 induces apoptosis in human B cells via the glycolipid-enriched membrane domains/rafts-mediated signaling system. *J. Immunol.* 166:5567-5577.

Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455.

Tang,S., Y.J.Shen, M.E.deBellard, G.Mukhopadhyay, J.L.Salzer, P.R.Crocker, and M.T.Filbin. 1997. Myelin-associated glycoprotein interacts with neurons via a sialic acid binding site at ARG118 and a distinct neurite inhibition site. *J. Cell Biol.* 138:1355-1366.

Theveniau, M., P.Durbec, G.Gennarini, J.N.Wood, and G.Rougon. 1992. Expression and release of phosphatidylinositol anchored cell surface molecules by a cell line derived from sensory neurons. *J Cell Biochem*. 48:61-72. several anti-H(O) lectins. *J Biochem (Tokyo)* 111:436-9.

Towbin,H., T.Staehelin, and J.Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:4350-4354.

Treubert, U. and T.Brummendorf. 1998. Functional cooperation of beta1-integrins and members of the Ig superfamily in neurite outgrowth induction. *J. Neurosci.* 18:1795-1805.

van den Berg,L.H., S.A.Sadiq, F.P.Thomas, and N.Latov. 1990. Characterization of HNK-1 bearing glycoproteins in human peripheral nerve myelin. *J Neurosci Res.* 25:295-9.

Vinson, M., P.J.Strijbos, A.Rowles, L.Facci, S.E.Moore, D.L.Simmons, and F.S.Walsh. 2001. Myelinassociated glycoprotein interacts with ganglioside GT1b. A mechanism for neurite outgrowth inhibition. *J. Biol. Chem.* 276:20280-20285.

Vinson, M., P.A.van der Merwe, S.Kelm, A.May, E.Y.Jones, and P.R.Crocker. 1996. Characterization of the sialic acid-binding site in sialoadhesin by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271:9267-9272.

Vyas,A.A., H.V.Patel, S.E.Fromholt, M.Heffer-Lauc, K.A.Vyas, J.Dang, M.Schachner, and R.L.Schnaar. 2002. Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:8412-8417.

Vyas,A.A. and R.L.Schnaar. 2001. Brain gangliosides: functional ligands for myelin stability and the control of nerve regeneration. *Biochimie* 83:677-682.

Walsh, F.S. and P.Doherty. 1997. Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:425-456.

Wang,Y., L.Shao, S.Shi, R.J.Harris, M.W.Spellman, P.Stanley, and R.S.Haltiwanger. 2001. Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 276:40338-40345.

Weller,S. and J.Gartner. 2001. Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum. Mutat.* 18:1-12.

Wenger, R.H., M.Ayane, R.Bose, G.Kohler, and P.J.Nielsen. 1991. The genes for a mouse hematopoietic differentiation marker called the heat-stable antigen. *Eur. J. Immunol.* 21:1039-1046.

Wessel, D. and U.I.Flugge. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138:141-143.

Williams, A.F. and A.N.Barclay. 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6:381-405.

Williams, E.J., J.Furness, F.S.Walsh, and P.Doherty. 1994. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*. 13:583-94.

Wing, D.R., T.W.Rademacher, B.Schmitz, M.Schachner, and R.A.Dwek. 1992. Comparative glycosylation in neural adhesion molecules. *Biochem. Soc. Trans.* 20:386-390.

Wong, E.V., A.W.Schaefer, G.Landreth, and V.Lemmon. 1996. Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 66:779-786.

Wood, P.M., M.Schachner, and R.P.Bunge. 1990. Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci*. 10:3635-45.

Wuhrer, M., H.Geyer, M.von der Ohe, R.Gerardy-Schahn, M.Schachner, and R.Geyer. 2003. Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM. *Biochimie*. 85:207-18.

Xiao,Z.C., U.Bartsch, R.K.Margolis, G.Rougon, D.Montag, and M.Schachner. 1997. Isolation of a tenascin-R binding protein from mouse brain membranes. A phosphacan-related chondroitin sulfate proteoglycan. *J Biol Chem.* 272:32092-101.

Yamamoto,K., Y.Konami, T.Osawa, and T.Irimura. 1992. Carbohydrate-binding peptides from several anti-H(O) lectins. *J Biochem (Tokyo)* 111:436-9.

Yamamoto,S., S.Oka, M.Inoue, M.Shimuta, T.Manabe, H.Takahashi, M.Miyamoto, M.Asano, J.Sakagami, K.Sudo, Y.Iwakura, K.Ono, and T.Kawasaki. 2002. Mice deficient in nervous systemspecific carbohydrate epitope HNK-1 exhibit impaired synaptic plasticity and spatial learning. *J Biol Chem.* 277:27227-27231.

Yoshida, A., K.Kobayashi, H.Manya, K.Taniguchi, H.Kano, M.Mizuno, T.Inazu, H.Mitsuhashi, S.Takahashi, M.Takeuchi, R.Herrmann, V.Straub, B.Talim, T.Voit, H.Topaloglu, T.Toda, and T.Endo. 2001. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell* 1:717-724.

Yuen, C.T., W.Chai, R.W.Loveless, A.M.Lawson, R.U.Margolis, and T.Feizi. 1997. Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose). *J. Biol. Chem.* 272:8924-8931.

Zamze, S., D.J.Harvey, Y.J.Chen, G.R.Guile, R.A.Dwek, and D.R.Wing. 1998. Sialylated N-glycans in adult rat brain tissue--a widespread distribution of disialylated antennae in complex and hybrid structures. *Eur. J. Biochem.* 258:243-270.

Zhao,X. and C.H.Siu. 1995. Colocalization of the homophilic binding site and the neuritogenic activity of the cell adhesion molecule L1 to its second Ig-like domain. *J. Biol. Chem.* 270:29413-29421.

Zisch,A.H., W.B.Stallcup, L.D.Chong, K.Dahlin-Huppe, J.Voshol, M.Schachner, and E.B.Pasquale. 1997. Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cek5. *J. Neurosci. Res.* 47:655-665.

## 9 ANHANG

### 9.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide sind der folgenden **Tabelle 9.1** zu entnehmen und wurden von der Firma metabion GmbH (Martinsried) bezogen.

Tab. 9.1: Verwendete Oligonukleotide und ihre Nukleotidsequenzen

Bezeichnung	Sequ	lenz	( 5`-3`	<b>`)</b>							
L1mut FN1-up	GTC	CAC	TAC	ACC	TTT	GCG	GTC	ACT	GCC	ATT	AAC
L1mut FN1-dn	GTT	AAT	GGC	AGT	GAC	CGC	AAA	GGT	GTA	GTG	GAC
T7 Promotor	TAA	TAC	GAC	TCA	CTA	TAG	G				

### 9.2 Gerichtete Mutation einer Aminosäure im L1-Molekül

Zur Einführung einer gezielten Mutation innerhalb der 1. FN-Domäne von L1 wurde das Quickchange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, diente USA) verwendet. Als Template der pET-Vektor mit dem Expressionskonstrukt für das L1-Proteinfragment FN 1-2 (s. 2.6), in dem die Aminosäure Arginin (Position 687 der Aminosäuresequenz des murinen L1) in der angenommenen Bindungsstelle der a2,3-verknüpften Sialinsäuren zu Alanin ausgetauscht werden sollte. Die Primer sind in Kapitel 9.1 aufgeführt. Einen Ausschnitt der entsprechenden mutierten und nicht mutierten Aminosäure- und DNS-Sequenz der 1. FN-Domäne des L1 der Maus (Swiss Protein Database accession number P11627) ist dargestellt. Der Austausch von Cytosin zu Guanin an der Nukleotidposition 2059 und von Guanin zu Cytosin an Nukleotidposition 2060 führt zu einem Austausch von Arginin zu Alanin an der Aminosäureposition 687. In der oberen Reihe ist die nicht-mutierte Aminosäure- und DNS-Sequenz dargestellt, die untere Reihe zeigt die Aminosäure- und DNS-Sequenz nach der Mutation. Fett unterlegt ist die angenommene Bindungsstelle der α2,3-verknüpften Sialinsäuren, und die Mutationen der Nukleotide und der Aminosäure sind in grau dargestellt.

G 678 L S Р Y V Η Y T F R V T A I N K Y 2032 CTGTCCCCCTATGTCCACTACACCTTTCGGGTCACTGCCATTAACAAATATGGT 678 L S P т F ΑΥΤ Y G Υ V Н Y А Τ Ν Κ 2032 CTGTCCCCCTATGTCCACTACACCTTTGCGGTCACTGCCATTAACAAATATGGT

### 9.3 Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1.1: Biosynthese von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden (nach Kleene und Schachner, 2004)
- Abb. 1.2: Biosynthese von O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden (nach Kleene und Schachner, 2004)
- Abb. 1.3: Biosynthese von Glykolipiden (nach Kleene und Schachner, 2004)
- Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Subfamilien der neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie (nach Crossin und Krushel, 2000)
- Abb. 1.5: Schematische Darstellung des L1-Moleküls
- Abb. 1.6: Interaktionen des L1-Moleküls (nach Kenwrick *et al.*, 2000)
- Abb. 1.7: Aminosäuresequenz des murinen CD24 (Kay *et al.*, 1990)
- Abb. 1.8: Identifizierung der putativen Sialinsäure-Bindungsstelle und Darstellung einer Konsensussequenz (nach Kleene *et al.*, 2001)
- Abb. 4.1: Nachweis von aus Maushirn aufgereinigtem CD24
- Abb. 4.2: Schematische Darstellung des L1-Moleküls und der verwendeten L1-Proteinfragmente
- Abb. 4.3: Nachweis der rekombinanten L1-Proteinfragmente

Abb. 4.4:	Bindung der L1-Proteinfragmente Ig I-VI, FN 1-5, FN 1-2 und FN 3-5 an immobilisiertes CD24
Abb. 4.5:	Nachweis und Vergleich der Proteinfragmente L1-FN 1-2 und L1- FN 1-2m
Abb. 4.6:	Bindung der L1-Proteinfragmente FN 1-2 und FN 1-2m an immobilisiertes CD24
Abb. 4.7:	Aminosäuresequenzen der L1-Peptide und ihre Lokalisierung im L1- Molekül
Abb. 4.8:	Bindung der biotinylierten L1-Peptide Siabind2 und Siabind2- scrambled (scr) an immobilisiertes CD24
Abb. 4.9:	Bindung des L1-FN 1-2 an CD24 in Anwesenheit verschiedener Zucker
Abb. 4.10:	Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen und Hinterwurzelganglienneuronen auf verschiedenen Substraten
Abb. 4.11:	Effekte von sialinsäuretragenden Zuckern auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum
Abb. 4.12:	Analyse des Glykosylierungsmusters von aufgereinigtem CD24
Abb. 4.13:	Bindung des Proteinfragments L1-FN 1-2 an immobilisiertes N- deglykosyliertes CD24
Abb. 4.14:	Effekt der N-Glykosylierung des CD24 auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum
Abb. 4.15:	Effekte des Lewisx-Epitops und des HNK-1-Epitops auf CD24- abhängiges Neuritenwachstum
Abb. 4.16:	Effekte eines L-Fucose-Replika-Peptids auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum.
Abb. 4.17:	Effekte des 3'-Sialyl-N-Acetyllactosmin-BSA-Konjugats und Lewisx- BSA-Konjugats auf das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen
Abb. 4.18:	Sequenzvergleich von TAG-1 und F3/Contactin mit fucosespezifischen Lektinen (R. Kleene)

- Abb. 4.19: Nachweis von TAG-1 und F3/Contactin in Zelllysaten von Kleinhirnund Hinterwurzelganglienneuronen
- Abb. 4.20: Nachweis von TAG-1, F3/Contactin und NCAM 120 in Präzipitaten der *Pull-down*-Experimente mit Lewisx-BSA
- Abb. 4.21: Nachweis von Zelladhäsionsmolekülen in Immunpräzipitaten des anti-CD24 Antikörpers
- Abb. 4.22: Effekte der Antikörper gegen TAG-1, F3/Contactin und NCAM auf CD24-abhängiges Neuritenwachstum
- Abb. 5.1: Darstellung der Sialinsäure-Bindungsstelle und Konsensussequenz (nach Kleene *et al.*, 2001)
- Abb. 5.2: Modell für die Rolle der Glykane Lewis<sup>x</sup> und α2,3-verknüpfte Sialinsäuren in der Modulation von Glia-Neuron-Interaktionen

### 9.4 Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1.1: Funktionen, die durch Glykosylierungen beeinflusst und reguliert werden (Kottgen *et al.*, 2003)
- Tab. 1.2:InteraktionspartnerdesZelladhäsionsmolekülsL1unddiefunktionelleBedeutung ihrerBindung (Haspel und Grumet, 2003)
- Tab. 2.1:Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften
- Tab. 2.2: Verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften
- Tab. 2.3: Verwendetes Plasmid und seine Eigenschaften
- Tab. 2.4: Verwendete Expressionskonstrukte und ihre Charakteristika
- Tab. 2.5: Verwendete Primärantikörper und ihre Charakteristika
- Tab. 2.6: Verwendete Peptide und ihre Aminosäuresequenzen
- Tab. 2.7: Verwendete Zucker und ihre Strukturen
- Tab. 3.1:Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen
- Tab. 3.2: Eingesetzte Primärantikörper und ihre Charakteristika

- Tab. 3.3: Eingesetzte Zucker in Bindungsstudien und ihre Konzentrationen
- Tab. 3.4: Verwendete Lektine und ihre Spezifität
- Tab. 3.5: Zusammensetzung des Kulturmediums der CHO-Zelllinie
- Tab. 3.6: Zusammensetzung des Expansionsmediums der Hybridomazellen
- Tab. 3.7:
   Zusammensetzung des Produktionsmediums der Hybridomazellen
- Tab. 3.8:
   Zusammensetzung der Einfriermedien der verwendeten Zelllinien
- Tab. 3.9: Zusammensetzung des X-1 Mediums für die Kultivierung der primären Kleinhirnneurone
- Tab. 3.10:Eingesetzte Zucker in Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen und<br/>Hinterwurzelganglienneuronen
- Tab. 3.11:Eingesetzte Antikörper in Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronenund Hinterwurzelganglienneuronen
- Tab. 3.12:Eingesetzte Peptide in Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen und<br/>Hinterwurzelganglienneuronen
- Tab. 3.13: Zusammensetzung des DRG-Mediums für die Kultivierung der primären Hinterwurzelganglienneurone
- Tab. 9.1:
   Verwendete Oligonukleotide und ihre Nukleotidsequenzen
- Tab. 9.2: Abkürzungen der Nukleotide
- Tab. 9.3: Abkürzungen der Aminosäuren

## 9.5 Abkürzungen und Einheiten

- A Absorption
- aa *amino acid*
- Abb. Abbildung
- ABTS 2,2`-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-5-sulfonsäure)
- ACC agenesis of corpus callosum

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	bicinchoninic acid
BIG-1	brain-derived immunoglobulin superfamily protein 1
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CHL1	close homologue of L1
CD	cluster of differentiation
CDG	congenital disorders of glycosylation
CDU	collagen digestion unit
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
СНО	chinese hamster ovary
cm	Zentimeter
CNBr	Cyanogenbromid
Da	Dalton
DCC	deleted in colorectal cancer
dH₂O	destilliertes Wasser
DM1-GRASP	dystrophia myotonica 1 - (general receptor for phosphoinositides) - associated scaffold protein
DMEM	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Datura stramonium agglutinin

DTT	Dithiotreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF-R	fibroblast growth factor receptor
FN	Fibronektin
Fuc	Fucose
g	Gramm
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Galβ1-4GlcNAc	N-Acetyllactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GMEM	Glasgow`s Minimal Essential Medium
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Stunde
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HBSS	Hank`s gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HNK-1	human natural killer cell glycan

$H_2O_2$	Waserstoffperoxid
HRP	horseradish-peroxidase
HSAS	hydrocephalus as result of stenosis of the aqueduct of Sylvius
lg	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thio-galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μΜ	mikromolar
μm	Mikrometer
Μ	molar, mol/l
mA	Milliampere
MAA	Maackia amurensis agglutinin
MAG	myelin associated glycoprotein
mAk	monoklonaler Antikörper
Man	Mannose
MASA	mental retardation, aplasia, shuffling gait, adducted thumbs
MEB	Muscle-Eye-Brain Erkrankung
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mМ	millimolar
mm	Millimeter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure

NB-2/3	Neural recognition molecule NB-2/3				
NBT/X-Phosphat	NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid			
	X-Phosphat	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphat			
NCAM	neural cell adhesion molecule				
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure				
NgCAM	neuron-glia cell adhesion molecule				
NGF	nerve growth facto	nerve growth factor			
nm	Nanometer				
nmol	nanomol				
NrCAM	neuron-glia cell a molecule	adhesion molecule related cell adhesion			
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte be	i x nm			
OSGE	O-Sialoglykoprotein-Endopeptidase				
p.a.	per analysi				
PAA	Polyacrylamid				
PAGE	Polyacrylamidgelel	ektrophorese			
PBS	Phosphat gepuffer	te Salzlösung			
PLL	poly-L-Lysin				
рМ	picomolar				
pmol	picomol				
PMSF	Phenylmethylsulfor	nylfluorid			
PNGase F	N-Glycosidase F				
PSA	polysialic acid				
PVDF	Polyvinyldifluorid				
rpm	rounds per minute				
R-PTΡδ	receptor-type tyros	ine-protein phosphatase $\delta$			

RT	Raumtemperatur
scr	scrambled
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siglec	sialic acid Ig-like lectin
SP-1	complicated spastic paraplegia type 1
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAG-1	transient axonal glycoprotein
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
TIU	trypsin inhibitor unit
Tris	Tris-(hydroxyl)-aminomethan
u.a.	unter anderen
U	units
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WWS	Walker-Warburg-Syndrom
x g	x 9,81 m/s <sup>2</sup>
Xyl	Xylose

# 9.6 Abkürzungen der Nukleotide und Aminosäuren

#### Tab. 9.2: Abkürzungen der Nukleotide

Abkürzung
A
С
G
Т

#### Tab. 9.3: Abkürzungen der Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	С
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	Н
Isoleucin	lle	I
Lysin	Lys	К
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	М
Asparagin	Asn	Ν
Prolin	Pro	Р
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	Т

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Valin	Val	V
Trytophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

## Publikationen

Brendel, F., N. Katagihallimath, D. Karagogeos, M. Schachner, and R. Kleene. 2005. CD24 mucin-dependent neurite outgrowth is mediated by its glycans binding to the cell adhesion molecules TAG-1 and L1. In Vorbereitung.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name:	Frauke Brendel
Geburtsdatum:	09.01.1975
Geburtsort:	Braunschweig
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

# Ausbildungsdaten

1981 - 1985	Grundschule Lehndorf/Braunschweig
1985 - 1987	Orientierungsstufe Lehndorf/Braunschweig
1987 - 1994	Hoffmann-von-Fallersleben-Schule Gymnasium, Braunschweig
	Schulabschluss: Abitur
10/1994 — 01/2000	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel
	Approbation als Apothekerin
03/2000 – 12/2000	Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
02/2001 – 11/2005	Promotion am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg der Universität Hamburg (ZMNH) bei Frau Prof. Dr. Schachner
	externe Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Heisig, Universität Hamburg
10/2001 - 10/2003	Aufbaustudiengang der Molekularbiologie der Universität Hamburg

## Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Melitta Schachner möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des interessanten Themas und die nette Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Peter Heisig danke ich sehr für die Übernahme der Betreuung und die Begutachtung dieser externen Promotion.

Besonders möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn Dr. habil. Ralf Kleene bedanken, ohne den diese Arbeit nie so weit fortgeschritten wäre und der mir mit sehr konstrutiven Diskussionen und seinen Ideen immer sehr viel geholfen hat.

Dr. Gaby Loers möchte ich für ihre Einführung und all ihre Hilfe bei den Primärkulturen und natürlich auch für alle anderen Hilfestellungen im Labor danken.

Dr. Ina Kalus danke ich für alles, was wir gemeinsam im Labor und natürlich auch außerhalb des Labors erlebt haben, was ich hier nicht alles erwähnen kann. Danke für all unsere "wissenschaftlichen" Diskussionen und die Beantwortung aller meiner Fragen, ihre stete Hilfsbereitschaft, die Notrufnummern und den Spaß, den wir immer hatten.

Ute Bork, Claas Cassens, Ute Eicke-Kohlmorgen, Nainesh Katagihallimath (natürlich auch für die Bereitstellung der transient transfizierten CHO-Zellen), Stephan Kaizik, Nicole Meyer, Dr. Carsten Schmidt, Gerrit Wolters, meiner Mittagsgruppe und allen anderen Kollegen danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung im Labor, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der EDV-Abteilung und der Werkstatt für ihre Hilfen bedanken.

Bei Ralf möchte ich mich ganz besonders bedanken, da er immer für mich da war, mich motiviert und mit allen Kräften unterstützt hat.

Ein großer Dank geht natürlich auch an meine Eltern und meine Familie, die mich immer unterstützt und mir Mut gemacht haben.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt zu haben. Hilfe anderer Personen ist, soweit sie in Anspruch genommen wurde, im Text vermerkt.

Diese Arbeit ist zuvor keiner Prüfungsbehörde, weder in dieser noch in geänderter Form, eingereicht worden.

Hamburg, September 2005

Frauke Brendel