



Universität Hamburg

Department Biologie



**Untersuchungen zur funktionellen
Bedeutung der direkten Bindung von Calmodulin
an das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM im
Nervensystem von *Mus musculus* (Linné 1758)**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rerum naturalium

des Departments Biologie
der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

vorgelegt von Mounir M'Zoughi

Hamburg, Oktober 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. M. SCHACHNER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 28. November 2008

Hamburg, den 14. November 2008



Jörg Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

1.	Einleitung	1
1.1	Die Zelladhäsion.....	1
1.2	Zelladhäsionsmoleküle.....	2
1.3	Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie.....	3
1.4	<u>Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM</u>	4
1.4.1	Transkription des NCAM Gens.....	4
1.4.2	Biosynthese und intrazellulärer Transport von NCAM.....	5
1.4.3	Posttranslationale Modifikationen von NCAM.....	6
1.4.4	Die zelluläre Verteilung von NCAM.....	7
1.4.5	Die Struktur der drei NCAM-Hauptisoformen 120, 140 und 180.....	7
1.5	<u>Signaltransduktionswege von NCAM</u>	9
1.5.1	Der MAP-Kinase-Signalweg.....	9
1.5.2	Der FGF-Rezeptor-Signalweg.....	10
1.5.3	Die Nicht-Rezeptortyrosin-Kinasen Fyn und FAK.....	11
1.5.4	Intrazelluläres Kalzium und die Aktivierung der Kalzium/Calmodulin Kinase II.....	13
1.5.5	Weitere Faktoren im NCAM-vermittelten Signaltransduktionsweg.....	14
1.6	<u>Kalziumbindende Proteine</u>	17
1.6.1	EF-Hand Proteine.....	17
1.6.2	Der Kalziumsensor Calmodulin.....	18
1.7	<u>Calmodulin und das Zelladhäsionsmolekül NCAM</u>	19
1.7.1	Die Regulation der Proteolyse von NCAM durch Calmodulin.....	19
1.7.2	Die Interaktion zwischen Calmodulin und NCAM.....	20
1.8	<u>Die fokale Adhäsionskinase FAK</u>	22
1.9	Aufgabenstellung.....	24
2.	Material	25
2.1	<u>Lösungen, Puffer, Nährmedien</u>	25
2.1.1	Lösungen und Puffer.....	25
2.1.2	Nährmedien und Zellkulturmedien.....	27
2.2	Chemikalien.....	28
2.3	Enzyme, Reagenzien und Marker.....	28
2.4	Kits.....	29
2.5	Plasmide.....	29
2.6	Oligonukleotide.....	30
2.7	Bakterienstämme.....	31
2.8	Zelllinien.....	31
2.9	<u>Antikörper</u>	32
2.9.1	Primärantikörper.....	32
2.9.2	Sekundäre Antikörper.....	33
2.10	Computergestützte Sequenzanalyse.....	33
3.	Methoden	34
3.1	<u>Molekularbiologische Methoden</u>	34

3.1.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (DH5 α).....	34
3.1.2	Erhaltung von Bakterienstämmen (Glycerol-Stock).....	34
3.1.3	Chemische Transformation kompetenter Bakterien.....	34
3.1.4	Plasmidisolierung aus 1,5 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen.....	35
3.1.5	Plasmidisolierung aus 200 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen.....	35
3.1.6	Restriktionsverdau von DNA.....	36
3.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
3.1.8	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	37
3.1.9	Gelelektrophorese von DNA.....	37
3.1.10	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	38
3.1.11	Mutagenese-PCR nach <i>Stratagene</i> - „ <i>site directed mutagenesis</i> “.....	38
<u>3.2</u>	<u>Biochemische Methoden</u>	<u>39</u>
3.2.1	Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	39
3.2.2	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	39
<u>3.2.3</u>	<u>Immunoblot-Analyse</u>	<u>40</u>
3.2.3.1	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen.....	40
3.2.3.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen.....	40
3.2.3.3	<i>Stripping</i> einer <i>Western Blot</i> Membran.....	41
3.2.3.4	Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz.....	41
3.2.4	Proteinfällung mittels Aceton.....	41
3.2.5	Proteinbestimmung (BCA-Test).....	42
<u>3.2.6</u>	<u>Rekombinante Expression His-markierter Proteine mit dem pQE-System in <i>E.coli</i> und deren Aufreinigung</u>	<u>42</u>
3.2.6.1	Bakterienlyse mit der French Press.....	43
3.2.7	ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	43
<u>3.2.8</u>	<u>Co-Immunpräzipitation</u>	<u>45</u>
3.2.8.1	Co-Immunpräzipitation über Protein A/G-Agarose- <i>beads</i>	45
3.2.8.2	Co-Immunpräzipitation über Anti-Phosphotyrosin-Agarose- <i>beads</i>	45
3.2.9	Oberflächenbiotinylierung.....	46
3.2.10	Fluorographische Messung von Palmitinsäure-inkubierten CHO-Zellen.....	46
<u>3.3</u>	<u>Zellbiologische Methoden</u>	<u>47</u>
3.3.1	Auftauen von CHO-Zellen.....	47
3.3.2	Kultivierung von CHO-Zellen.....	47
3.3.3	Langzeitlagerung der Zelllinien.....	48
3.3.4	Transiente Transfektion von CHO-Zellen.....	48
3.3.5	Stabile Transfektion von CHO-Zellen.....	48
3.3.6	Lyse von CHO-Zellen.....	49
3.3.7	Stimulation von CHO-Zellen oder Kleinhirn-Neuronen.....	49
<u>3.3.8</u>	<u>Primärzellkultur</u>	<u>50</u>

3.3.8.1	Beschichtung von Deckgläschen mit PLL (poly-L-Lysin).....	50
3.3.8.2	Einzelzellkulturen von Kleinhirn-Neuronen.....	50
3.3.8.3	Einzelzellkulturen von hippocampalen Neuronen.....	51
3.3.8.4	Transfektion von hippocampalen Neuronen.....	52
3.3.8.5	Stimulation von hippocampalen Neuronen und Neuritenwachstum.....	52
3.3.8.6	Fixierung von hippocampalen Neuronen.....	53
3.3.8.7	Immunzytochemie an fixierten Cerebellum-Neuronen.....	53
3.3.8.9	Konfokale Laser <i>scanning</i> Mikroskopie (LSM)	54
3.3.9	Kernfraktionierung - Isolierung von Kernproteinen aus CHO-Zellen und Cerebellum-Neuronen.....	54
4.	Ergebnisse	56
4.1	Mutagenese des putativen, invertierten „14-8-5-1“ Calmodulinbindungsmotivs.....	56
4.2	Die Bedeutung der putativen invertierten „14-8-5-1“ Calmodulinbindestelle des NCAM für die Interaktion zwischen Calmodulin und NCAM.....	58
4.3	Die Bedeutung von Kalzium für die Interaktion zwischen NCAM und Calmodulin.....	60
4.4	Regulation der Prozessierung von NCAM durch Calmodulin.....	62
4.5	Oberflächenlokalisierung der verschiedenen NCAM-Konstrukte.....	63
4.6	Bedeutung des Moleküls Calmodulin für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum.....	64
4.7	Oberflächenlokalisierung von NCAM140 und NCAM140ΔCaM an NCAM-defizienten Hippocampusneuronen.....	66
4.8	Die Mutation der Calmodulinbindestelle führt zu einer veränderten Zellmorphologie von Hippocampusneuronen.....	69
4.9	Der Einfluss der mutierten Calmodulinbindestelle auf die <i>lipid raft</i> -Lokalisation von NCAM140.....	70
4.10	Der Einfluss der mutierten Calmodulinbindestelle auf die Palmitoylierung von NCAM140.....	72
4.11	Untersuchung der NCAM-Phosphorylierung in Bezug auf die mutierte Calmodulin- bindestelle.....	73
4.12	Untersuchung der Fyn-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der mutierten Calmodulinbindestelle von NCAM.....	76
4.13	Die fokale Adhäsionskinase FAK, Calmodulin und NCAM.....	78
4.14	Untersuchung der FAK-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der Calmodulin- bindestelle von NCAM.....	80
4.15	Der Einfluss des Calmodulininhibitors CGS 9343 B auf die NCAM-vermittelte FAK- Phosphorylierung.....	81
4.16	Untersuchung der Kernlokalisierung des N-terminalen FAK Fragments in CHO Zellen.....	83
4.17	Untersuchung der Kernlokalisierung des N-terminalen FAK Fragments in Cerebellum-Neuronen.....	85
4.18	Untersuchung von FAK in Zelllysaten aus Cerebellum-Neuronen und transfizierten CHO-Zellen.....	87
4.19	Die Kernlokalisierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM in CHO-Zellen.....	88

4.20	Die Kernlokalisierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM in Cerebellum-Neuronen – Hinweise auf unterschiedliche kernlokalisierte NCAM-Fragmente.....	90
4.21	Die NCAM-stimulationsunabhängige Kernlokalisierung von NCAM180.....	93
4.22	Die NCAM-stimulationsabhängige-Kernlokalisierung von NCAM180.....	94
4.23	Die Entstehung der unterschiedlichen, kernlokalisierten NCAM-Fragmente.....	95
4.24	Einfluss der NCAM-Antikörper-Stimulation auf die Prozessierung von NCAM.....	99
4.25	Immunzytochemische Untersuchung der Kernlokalisierung von NCAM.....	100
4.26	Immunzytochemische Untersuchung der Kernlokalisierung von FAK.....	105
4.27	Hinweis auf eine Co-Lokalisation von FAK und NCAM im Kern.....	107
5.	Diskussion	109
5.1	Die direkte Interaktion von NCAM140 und NCAM180 mit Calmodulin.....	109
5.2	Der Einfluss des Calmodulins auf die regulierte Prozessierung der membranständigen Isoform NCAM140.....	111
5.3	Der Einfluss von Calmodulin auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum.....	112
5.4	Kann ein Kalziumsensor Einfluss auf die Morphologie einer Nervenzelle haben?.....	115
5.5	Calmodulin beeinflusst nicht die NCAM-Zelloberflächenlokalisierung.....	116
5.6	Die <i>lipid rafts</i> Lokalisation und die Palmitoylierung von NCAM sind essentiell für NCAM-abhängiges Neuritenwachstum.....	117
5.7	Das Calmodulinbindungsmotiv als <i>hot spot</i> der intrazellulären NCAM Domäne.....	119
5.8	Fyn, ein weiterer Schritt abwärts des Signalwegs.....	120
5.9	Die fokale Adhäsionskinase stellt einen wichtigen Interaktionspartner dar.....	121
5.10	Die Kernlokalisierung der N-terminalen Domäne von FAK ist NCAM-abhängig.....	123
5.11	Die Kernlokalisierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM.....	125
5.12	Welche Proteasen könnten an der Entstehung der unterschiedlichen kernlokalisierten NCAM-Fragmente involviert sein?	128
5.13	NCAM und FAK: Alte Bindungspartner, neue Funktion in neuer Umgebung?.....	131
6.	Zusammenfassung	135
7.	Literaturverzeichnis	137
8.	Anhang	160

1. Einleitung

1.1. Die Zelladhäsion

Eine zentrale Rolle bei der Proliferation, der Differenzierung, der Migration und der Zellaggregation nehmen Zelladhäsionsvorgänge ein. All diese sind Prozesse, die für die Bildung funktionsfähiger Gewebe und Organe unerlässlich sind. Im adulten Organismus sind Änderungen der Zelladhäsion für zahlreiche physiologische Vorgänge wie Lymphozytenwanderung, Homöostase und Wundheilung als auch bei pathologischen Prozessen wie Tumorentstehung, Tumorwachstum und Metastasierung verantwortlich (Hynes und Lander, 1992). Als Zelladhäsion wird der über Zelladhäsionsmoleküle vermittelte Kontakt zu einer Nachbarzelle (Zell-Zell-Adhäsion) oder zu Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM = Zell-Matrix-Adhäsion) bezeichnet. Während Zell-Zell-Adhäsionsvorgänge in der Histogenese entscheidend für die Ablösung ganzer Zellgruppen oder einzelner Zellen aus einem Zellverband (Segregation und Dispersion) und für die Aggregation von Zellen sind, überwiegen Zell-Matrix-Interaktionen bei der Migration von Zellen, wie z. B. im Nervensystem. Beim Auswachsen von Neuriten als auch bei deren zielgerichteter Lenkung sind beide Zelladhäsionsformen von Bedeutung. Die zeitliche und räumliche Regulation der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle ist für den richtigen Ablauf morphogenetischer Vorgänge entscheidend. Zelladhäsionsmoleküle wirken nicht nur als mechanisch-dynamische Kontaktelemente, sie können zudem als Signalvermittler fungieren, also Signale aus der unmittelbaren Umgebung aufnehmen, integrieren und ins Zellinnere weiterleiten, deshalb können sie auch als Adhäsionsrezeptoren bezeichnet werden. Die Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen kann intrazellulär sowohl zur Umstrukturierung des Zytoskeletts als auch zur Initiation von Signaltransduktionsprozessen führen, die z. B. auch in einer veränderten Genexpression resultieren kann (Aplin et al., 1998). Viele Adhäsionsmoleküle sind mit Elementen des Zytoskeletts und/oder mit intrazellulären Signalmolekülen wie mit Proteinkinasen und Phosphatasen oder mit Adapterproteinen, assoziiert. Sie können aber auch selber Kinase- oder Phosphatasedomänen besitzen oder lateral mit anderen Rezeptorproteinen wie z. B. Rezeptortyrosin-Kinasen assoziiert sein.

1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Bei den Zelladhäsionsmolekülen handelt es sich meist um transmembrane Glykoproteine, die über eine zytoplasmatische Domäne unterschiedlichster Länge verfügen. Einige Zelladhäsionsmoleküle oder bestimmte Isoformen besitzen keine zytoplasmatische Domäne und sind über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Rest in der Membran verankert. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten lassen sich die Zelladhäsionsmoleküle in vier Großfamilien einteilen: die Cadherine, die Selektine, die Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF).

Die **Cadherine** sind Zelladhäsionsmoleküle, die sehr starke kalziumabhängige Zell-Zell-Adhäsion über homophile Bindung vermitteln und eine wichtige Rolle in der Gewebeentwicklung und in der Aufrechterhaltung normaler Gewebestrukturen im adulten Organismus spielen. Zu den klassischen Cadherinen gehören mindestens 15 verschiedene Mitglieder. Einige von ihnen werden nach ihrem Vorkommen in bestimmten Geweben benannt: die E-(epithelial) Cadherine, die N-(neuronal und neuroendokrine) Cadherine, die P-(plazental) und die R-(retinale) Cadherine (Takeichi, 1995). Sie kommen in spezialisierten Zellkontaktbereichen vor: 1. der Zonula adherens, wo sie intrazellulär über Catenine (β -, α -) mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind und 2. in den Desmosomen, in denen sie Verbindungen mit Intermediärfilamenten eingehen (Cowin und Burke, 1996). Cadherine sind auch in der Lage, über β -Catenin Signale weiterzuleiten, die an den *wingless*/Wnt-Signalweg anschließen (Orsulic und Peifer, 1996).

Die kleine Familie der **Selektine**, bestehend aus den drei Mitgliedern der L-(Leukozyten), P-(Plättchen), und E-(Endothel)-Selektine, werden auf Endothelzellen und verschiedenen Blutzellen exprimiert und vermitteln schwache kalziumabhängige heterophile Zell-Zell-Adhäsion zwischen Blutzellen und Endothelzellen sowie zwischen Blutzellen untereinander (Tedder et al., 1995). Über ihre N-terminale Typ-C-Lektindomäne erkennen und binden sie kalziumabhängig an eine spezielle Tetrasaccharidstruktur des Liganden, die sogenannte Sialyl-Lewis-X-Struktur (Foxall et al., 1992; Erbe et al., 1993). Bei Entzündungsreaktionen und beim Lymphozyten-*homing* sind die Selektine für den ersten Kontakt der Lymphozyten mit dem Endothel und dem anschließenden Rollen der Zellen entlang der Endotheloberfläche verantwortlich - Prozesse, die der Migration der Leukozyten vorausgehen (Vestweber und Blanks, 1999).

Die **Integrine** stellen eine große Familie von Glykoproteinen dar, die Zell-Matrix- als auch Zell-Zell-Adhäsion vermitteln können. Sie sind transmembrane Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Bisher sind mindestens 24 verschiedene Heterodimere

beschrieben worden, die sich durch Kombination einer der 8 β - und einer der 18 α -Untereinheiten ergeben (Juliano, 2002). Die β 1-Integrine sind auf allen Zelltypen vorhanden und binden hauptsächlich an Komponenten der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Laminin, Fibronectin und Vitronectin. Dabei zeigen die verschiedenen Heterodimere unterschiedliche Ligandenspezifität, wobei ein Heterodimer oft mehrere EZM-Proteine binden kann. Die vier bekannten β 2-Integrine werden nach Aktivierung durch chemotaktische Faktoren (z. B. IL-8 oder plättchenaktivierender Faktor) auf Leukozyten exprimiert und vermitteln über heterophile Interaktionen zu Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie Kontakt zu anderen Leukozyten oder Endothelzellen (Albelda et al., 1994). Im Gegensatz zu den Selektinen bewirken die Integrine eine stärkere Adhäsion am Endothel und leiten die Transmigration der Leukozyten in das Gewebe ein.

1.3 Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) stellt die größte Familie strukturverwandter Proteine dar, die über 100 Mitglieder umfasst (Brummendorf und Rathjen, 1995). Sie kommen in Vertebraten aber auch in Invertebraten wie z. B. *Drosophila* vor und zeichnen sich alle durch die Anwesenheit eines gemeinsamen Strukturelementes aus: Das Vorhandensein mindestens einer Immunglobulin-artigen Domäne (Ig) im extrazellulären Proteinbereich. Solche Domänen, die auch für Antikörper charakteristisch sind, bestehen aus 70-110 Aminosäuren, die zwei antiparallele β -Faltblätter bilden, welche über eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden (zwei Cysteinreste pro Ig-Domäne charakteristisch) (Vaughn und Bjorkman, 1996). Es kommen vier verschiedene Typen von Ig-ähnlichen Domänen vor, Typ C1, C2 und V, die dem konstanten (C) Teil bzw. den variablen (V) Teil von Immunglobulinen ähneln, sowie der I-Typ (intermediär) (Williams und Barclay, 1988). Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie können die unterschiedlichsten Funktionen haben. Eine Untergruppe stellen die Zelladhäsionsmoleküle der IgSF dar. Sie sind meist stark glykosylierte transmembrane Proteine, die kalziumunabhängige Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Viele spielen im Immunsystem eine wichtige Rolle wie der T-Zell- und der B-Zellrezeptor, die Corezeptoren CD4, CD8, CD28, die MHC-Moleküle der Klasse 1 und 2 sowie die auf aktivierten Endothelzellen exprimierten ICAMs 1-3 (*inter cellular adhesion molecules*) (Alberts et al., 1997). Eine andere große Unterfamilie umfasst die Zelladhäsionsmoleküle des

Nervensystems, die eine wichtige Rolle beim Auswachsen von Neuriten und der Entstehung und Aufrechterhaltung neuronaler Verbindungen spielen (Baldwin et al., 1996). Zu dieser Gruppe gehört das gut charakterisierte neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM sowie L1, NgCAM (*neuron glia cell adhesion molecule*), NrCAM, Tag-1 (Ratte), F3 (Maus)/F11 (Hühnchen), MAG (*myelin-associated glycoprotein*) und P0. Viele dieser Mitglieder besitzen neben Wiederholungen von Ig-Domänen ein oder mehrere Fibronectin-Typ III-Domänen (FnIII), eine 90-Aminosäuren-lange Struktur, die als erstes in dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin gefunden wurde (Main et al., 1992). MAG und P0 besitzen keine Fn-Domäne. In verschiedenen Vertebraten, aber auch in Invertebraten wie *Drosophila* oder Gomphocerinae (Grashüpfer), konnten Homologe einiger der IgCAMs (Immunglobulin-artige-Zelladhäsionsmoleküle) identifiziert werden. Während die meisten der hier aufgezählten neuronalen Zelladhäsionsmoleküle hauptsächlich homophile Zell-Zell-Adhäsion vermitteln, aber auch heterophile Bindungen eingehen können, sind bei den Adhäsionsmolekülen des Immunsystems heterophile Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen (heterotypisch) dominant.

1.4 Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neural cell adhesion molecule*) ist eines der am besten untersuchten und charakterisierten Zelladhäsionsmoleküle. Es ist in die verschiedensten morphogenetischen Prozesse während der Entwicklung des Gehirns involviert, wie der Proliferation, Migration, Differenzierung und der Synaptogenese. NCAM gehört zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) [s. Pkt. 1.3] und wurde als erstes neurales Zelladhäsionsmolekül entdeckt. Es ist das erste isolierte und untersuchte Zelladhäsionsmolekül der IgSF (Brackenbury et al., 1977; Cunningham et al., 1983; Hoffman und Edelman, 1983; Doherty et al., 1990).

1.4.1 Transkription des NCAM Gens

NCAM wird von einem einzigen Gen codiert, welches in der Maus auf dem Chromosom 9 (D'Eustachio et al., 1985) und im Menschen auf dem Chromosom 11, q23 lokalisiert wurde

(Nguyen et al., 1986; Walsh et al., 1986). Durch den Vorgang des alternativen Spleißens entstehen aus einem Primärtranskript bis zu 27 unterschiedliche NCAM-Polypeptide bzw. -Isoformen (Reyes et al., 1991). Die drei Haupt-Isoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180, welche entweder membranassoziierte Proteine (NCAM120) oder Transmembranproteine (NCAM140 und NCAM180) darstellen, unterscheiden sich in der differierenden Polyadenylierung und dem alternativen Spleißens am 3'Ende der NCAM-mRNA (Hemperly et al., 1986; Murray et al., 1986; Barbas et al., 1988).

1.4.2 Biosynthese und intrazellulärer Transport von NCAM

Die NCAM-Biosynthese wurde ausgiebig an fötalen Ratten-Neuronen untersucht (Lyles et al., 1984). Im Endoplasmatischen Retikulum entstehen zwei Polypeptide mit den Molekulargewichten von 186kDa und 136kDa, die auf den unterschiedlichen Glykosylierungsgrad zurückzuführen sind (Lyles et al., 1984). Die NCAM Polypeptide unterliegen einem schnellen intrazellulären Transport und sind innerhalb von 35 min an der Zelloberfläche lokalisiert, wo sie phosphoryliert werden (Alcaraz und Goridis, 1991).

Die Biosynthese der NCAM-Isoformen 140 und 180 nimmt mit steigendem Alter ab, wohingegen die von NCAM120 und anderen hochmolekularen NCAM-Isoformen deutlich ansteigt (Lyles et al., 1984; Hansen et al., 1985; Linnemann et al., 1993). In Kultur gehaltene Neurone können alle drei Hauptisoformen synthetisieren, wobei die Menge an NCAM120 etwas geringer ausfällt, wenn man sie mit der NCAM120-Menge in Glia-Zellen vergleicht (Nybroe et al., 1986). Wachstumsfaktoren und die intrazelluläre Kalziumkonzentration regulieren die Biosynthese von NCAM. In mit *dibutyryl cyclic adenosine monophosphate* (dBcAMP)-inkubierten Astrozyten wurde eine erhöhte NCAM140 und NCAM120 Expression gemessen. Zudem wurde auch eine Expression von NCAM180 beobachtet, wobei diese Isoform in Astrozyten eher selten vorkommt (Gegelashvili et al., 1993). Auch der *nerve growth factor* NGF, der *insulin-like growth factor II* oder Veratridin, ein Natriumkanal-Agonist, führten zu einem erhöhten NCAM Expressionslevel (Lyles et al., 1993).

1.4.3 Posttranslationale Modifikationen von NCAM

Es ist bekannt, dass NCAM wie viele andere Proteine auch posttranslational vielfältig modifiziert wird. NCAM bietet mehrere Glykosylierungsstellen an. So wird es z. B. an sechs möglichen Glykosylierungsstellen N-glykosyliert (Albach et al., 2004). Das GPI-verankerte NCAM120 weist als einzige Isoform eine O-Glykosylierung auf, dessen Funktion auf eine Stabilisierung des NCAMs hinweisen oder aber einen NCAM *turnover* in der Plasmamembran regulieren könnte (Walsh et al., 1989). Das NCAM ist einzigartig darin, dass es eine große Menge eines negativ geladenen Zuckers, der Polysialinsäure (PSA), trägt (Hoffman et al., 1982). Alle NCAM-Isoformen können diese lineare α -2,8-verknüpfte Polymerkette von bis zu 200 PSA-Resten tragen (Schachner und Martini, 1995), wohingegen im Hippocampus dieses Epitop nur an NCAM180 detektierbar ist (Doyle et al., 1992). Diese Verzuckerung an der fünften Ig-ähnlichen Domäne von NCAM (von der Ohe et al., 2002) könnte als Regulationsmechanismus für Zell-Zell-Kontakte fungieren, da PSA die adhäsiven Eigenschaften von NCAM vermindert und dies der Migration förderlich ist. Auch an der Defaszikulierung von Neuronen bei einem Neuarrangement von Axontrakten ist das PSA-NCAM beteiligt (Durbec und Cremer, 2001). Diese Art der Glykosylierung konnte bislang an keinem anderen Adhäsionsmolekül des Nervensystems der Vertebraten nachgewiesen werden (Kleene und Schachner, 2004). Dieser negativ geladene Zuckerrest modifiziert funktionelle Eigenschaften des NCAM-Protein-Rückgrats während der neuralen Migration, der axonalen Zielfindung und der synaptischen Plastizität (Eckhardt et al., 2000; Angata et al., 2004; Weinhold et al., 2005). Das Kohlenhydrat HNK-1/L2 (*human natural killer-1*) findet man nur an im Gehirn exprimierten NCAM140- und NCAM180-Isoformen (Chou et al., 1985).

Die Phosphorylierung von NCAM kann an einem der bis zu 49 Serin- oder Threoninreste erfolgen (Sorkin et al., 1984), wobei die NCAM-Phosphorylierung einen Dauerzustand während der Entwicklung des Gehirns darstellt (Linneman et al., 1984). Eine Tyrosin-Phosphorylierungsstelle findet sich in der intrazellulären Domäne von NCAM, in der ein Tyrosinrest an der Position 734 nachgewiesen wurde, welcher wichtig für den FGF-R-abhängigen Neuritenwachstum ist (Diestel et al., 2004). Diese Phosphorylierungsstelle könnte auch Zell-Zell-Kontakte stabilisieren, da die intrazelluläre Domäne von NCAM180 die Verbindung zum Zytoskelettprotein Spektrin vermittelt (Sytnyk et al., 2002).

NCAM ist ein stark sulfatiertes Protein, wobei die Sulfatierung von NCAM140 und NCAM180 während des Transports durch das ‚trans-Golgi‘-Kompartiment erfolgt und diese Modifikation in der postnatalen Entwicklung reduziert wird (Lyles et al., 1984). Bedeutung

haben Sulfatierungen besonders bei Interaktionen zwischen Zellen sowie mit der extrazellulären Matrix (Yamada, 1983; Silberstein und Daniel, 1982).

Zu den posttranslationalen Modifikationen von NCAM zählt auch die Palmitoylierung (Murray et al., 1987). Die Palmitoylierungsstelle liegt im N-terminalen Teil der zytoplasmatischen Domäne von NCAM und umfasst vier Cysteinreste, von denen nur drei palmitoyliert sein müssen (Little et al., 1998). Die Palmitoylierung von NCAM ist entscheidend für das Verankern des Proteins in der Zellmembran und für die Lokalisierung in Membranamikrodomänen, dem sogenannten *lipid rafts* (Niethammer et al., 2002)

1.4.4 Die zelluläre Verteilung von NCAM

Die unterschiedlichen Typen an neuronalen Zellen im zentralen Nervensystem exprimieren unterschiedliche Mengen an NCAM-Isoformen. Während NCAM140 sowohl in prä- als auch in postsynaptischen Membranen detektiert werden kann, akkumuliert NCAM180 in postsynaptischen Dichten von Synapsen reifer Neurone (Persohn et al., 1989; Pollerberg et al., 1985). Die Expression von NCAM140 und -180 nimmt in Gehirnen adulter Nagetiere ab (Bock und Braestrup, 1978). NCAM120 wird ausschließlich von Oligodendrozyten sowie von Astrozyten exprimiert (Bhat und Silberberg, 1988), wohingegen NCAM140 und NCAM180 vorwiegend auf der Zelloberfläche von Neuronen zu finden sind (Nybroe et al., 1985).

Interessanterweise findet man NCAM nicht nur in neuronalen sondern auch in nichtneuronalen Zellen und Geweben, z. B. im Muskel- oder Nierengewebe (Klein et al., 1988, Markovic-Lipkovski et al., 2007). Immunoblot-Analysen zeigten, dass alle drei Hauptisoformen während der gesamten Entwicklung des Herzens exprimiert werden, wobei im alternden Herzgewebe eine Erhöhung der Expression von NCAM120 und NCAM140 nachgewiesen wurde (Gaardsvoll et al., 1993).

1.4.5 Die Struktur der drei NCAM Hauptisoformen 120, 140 und 180

Die drei NCAM-Hauptisoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180 entstehen wie bereits erwähnt [s. Pkt. 1.4.1] als Produkt des alternativen Spleißvorgangs eines einzelnen

Transkripts. Das Ergebnis der Proteintranslation sind drei Proteine, welche in der SDS-PAGE die apparenten Molekulargewichte von 120, 140 und 180kDa aufweisen (Cunningham et al., 1987). NCAM140 und NCAM180 sind Transmembranproteine, deren zytoplasmatische Domänen sich lediglich in einer 261-267 Aminosäure (~speziesabhängig) langen Sequenz der NCAM180 Isoform voneinander unterscheiden. Diese zusätzlichen Aminosäuren werden von dem Exon18 codiert. Das NCAM120 besitzt nur eine extrazelluläre Domäne und ist an die Membran mittels Glykosyl-Phosphatidylinositol-(GPI)-Ankers gebunden. Der extrazelluläre Teil aller NCAM Isoformen besteht aus fünf Immunglobulin-Domänen, gefolgt von zwei Fibronektin-Typ III (FnIII)-Domänen [s. Abb. 1.1].

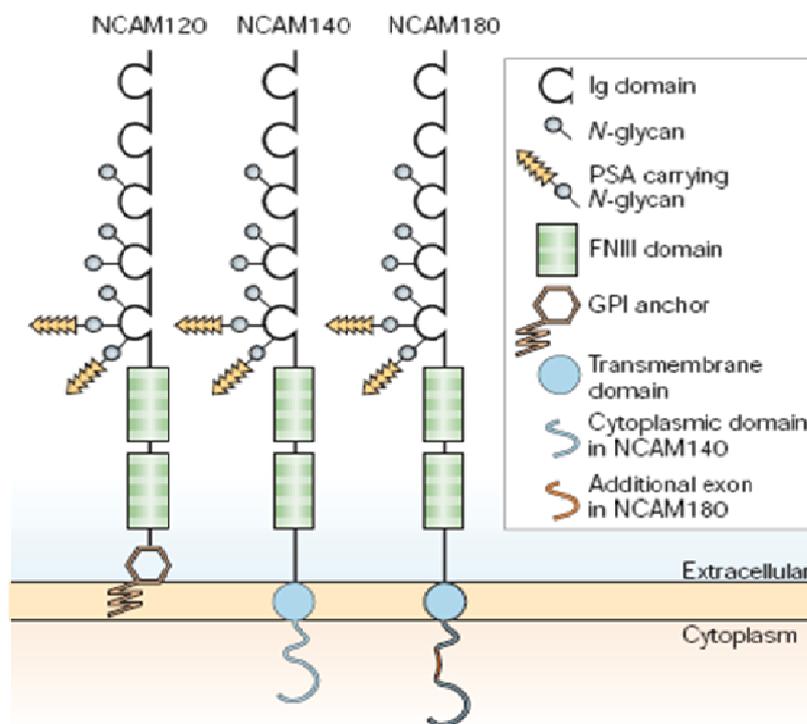


Abb. 1.1: Die NCAM Isoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180 entstehen durch alternatives Spleißen. NCAM180 und NCAM140 gehören zu der Klasse der Typ I-Membranproteine. Das Molekül NCAM180 unterscheidet sich von dem Molekül NCAM140 einzig durch eine in der intrazellulären Domäne lokalisierte Aminosäureabfolge, die vom Exon18 codiert wird. NCAM120 hingegen ist mit Hilfe eines GPI-Ankers in der Membran inseriert (Kleene und Schachner, 2004).

Die Abbildung 1.1 zeigt neben den glykosylierten NCAM Isoformen auch die ungewöhnliche PSA-Glykosylierung von NCAM [s. Pkt. 1.4.3], welche bislang an keinem anderen Zellerkennungsmolekül im Nervensystem von Vertebraten detektiert wurde (Kleene und Schachner, 2004).

1.5 Signaltransduktionswege von NCAM

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM vermittelt über homophile Bindung Zelladhäsion, d.h. es bindet dabei ein NCAM Molekül auf der Oberfläche einer Zelle an ein anderes NCAM Molekül auf der benachbarten Zelloberfläche. Wichtig dabei ist, dass dieser Vorgang nicht nur als eine Art „Kleber“ zwischen benachbarten Zellen verstanden wird. Vielmehr führen nach homophiler Bindung verschiedenste Vorgänge zur Bildung von intrazellulären, membrannahen Komplexen, wodurch ein kompliziertes Netzwerk von Signaltransduktionsmolekülen bzw. -vorgängen entsteht. Andererseits führen auch heterophile NCAM-Interaktionen zur Regulation zellulärer Vorgänge, wie die der Differenzierung oder Proliferation (Seidenfaden et al., 2003, 2006; Amoureux et al., 2000)

1.5.1 Der MAP-Kinase-Signalweg

Die MAP-Kinasen (*mitogen activated protein*) ERK1 und ERK2 (*extracellular regulated kinase*) nehmen eine zentrale Rolle im NCAM-Signalweg ein. Wie Schmid et al. zeigen konnten, resultiert NCAM-Stimulation durch NCAM-Antikörper oder NCAM-Fc-Protein in Neuroblastoma-Zellen oder Granularzellen des Kleinhirns (*cerebellar granule neurons*, CGN) in einer erhöhten ERK1- und ERK2-Phosphorylierung (Schmid et al., 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass die MAP-Kinase-Aktivität nach NCAM-Stimulation erhöht wird, was einhergeht mit der erhöhten Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 (Schmid et al., 1999). Die Bedeutung der MAP-Kinasen für Neuritenwachstum wurde gezeigt, indem die Inhibition des *upstream* liegenden Aktivators MAP- und ERK-Kinase (MEK) sich negativ auf das Neuritenwachstum in den Granularzellen und in PC12-Zellen (Pheochromozytoma-Zellen) auswirkte (Schmid et al., 1999; Kolkova et al., 2000). Raf, welches durch Ras aktiviert werden kann, ist als Aktivator von MEK bekannt. Die Expression einer dominant negativen Version von Raf oder Ras führte zu vermindertem, NCAM-abhängigem Neuritenwachstum in PC12-Zellen. Umgekehrt konnte eine dauerhafte Aktivierung dieser beiden Signal-Moleküle Neuritenwachstum anregen, ohne dass eine homophile Bindung von NCAM vorlag, welche so den Effekt der NCAM-Stimulation simulieren konnte (Kolkova et al., 2000).

Es gibt somit zwei Möglichkeiten der Signalweiterleitung vom NCAM hin zum Ras-MAP-Kinase-Weg: der eine führt über die Nicht-Rezeptortyrosin-Kinase Fyn und der andere über

den FGF-Rezeptor (*fibroblast growth factor receptor*). Beide Transduktionswege sind in der NCAM-Signalweiterleitung involviert und werden im Folgenden näher beschrieben.

1.5.2 Der FGF-Rezeptor-Signalweg

Die Tatsache, dass NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum mittels Inhibitoren von Rezeptortyrosin-Kinasen zu unterdrücken ist, veranlasste Williams et al. zu der Hypothese, dass NCAM-bedingtes Neuritenwachstum allein über den FGF-Rezeptor vermittelt wird (Williams et al., 1994; Williams et al., 1995). NCAM verursacht in dieser Theorie auf bislang ungeklärte Weise die Dimerisierung und durch die darauf folgende Phosphorylierung des Rezeptors die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade, welche mit der Stimulierung der Phospholipase C γ (PLC γ) beginnt. Der FGF-Rezeptor interagiert dabei mit einer für seine eigene Funktionalität entbehrlichen Domäne mit NCAM (Sanchez-Heras, 2006). PLC γ verwandelt Phospholipide in Diacylglycerol (DAG), welches über die Diacylglycerol Lipase zu Arachidonsäure (AA) umgewandelt wird. Arachidonsäure wiederum kann einen Einstrom an extrazellulärem Kalzium über in der Membran befindliche Kalziumkanäle bewirken. Dies kann bereits über die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α (CaMKII α) zu Neuritenwachstum führen (Williams et al., 1994). Als eine weitere Konsequenz des NCAM bedingten KalziumEinstroms wurde die daraus resultierende Aktivierung der Protein Kinase C (PKC) entdeckt. Unter Beteiligung des Membran-Zytoskelett *Linker*-Proteins Spektrin wird NCAM140 oder NCAM180 zu einem Komplex mit der PKC Isoform PKC β 2, welcher in lipidhaltige Mikrodomänen - den sogenannten *lipid rafts* - wandern kann (Leshchyn'ska et al. 2003). In den *lipid rafts* kann PKC die Aktivierung von Raf bewirken, was eine Verbindung zum MAP-Kinase Pathway darstellt. Ditlevsen und Kollegen konnten in noch unveröffentlichten Experimenten beobachten, dass die Inhibierung von PKC oder PLC keinen Einfluss auf die NCAM-vermittelte ERK-Phosphorylierung hat und dass somit dieser PKC vermittelte Signalweg für die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges nach NCAM Aktivierung unerheblich sein muss (Ditlevsen und Kolkova, 2008). Der NCAM/Spektrin/PKC β 2 Komplex kann in *lipid rafts* aber mit Molekülen interagieren, welche wachstumsassoziierte und Zytoskelett-Kontrollmoleküle darstellen wie z. B. GAP43 (*growth associated protein 43*), CAP23 und MARCKS (*myristoylated alanine rich C kinase substrate*) (Laux. et al., 2000; He und Meiri, 2002). Dabei ist zumindest für GAP43 gezeigt worden, dass es für NCAM-

vermitteltes Neuritenwachstum benötigt wird (Meiri et al., 1998). Dies wäre dann als Ras/MAP-Kinase unabhängiger Signalverarbeitungsweg anzusehen.

FGF-R wurde lange Zeit als alleiniger Mediator des NCAM-Signals zum MAP-Kinase-Signalweg angesehen. Jedoch konnte an transfizierten CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*), welche einzeln die drei NCAM-Isoformen exprimierten, gezeigt werden, dass die durch NCAM-Antikörper-Stimulation herbeigeführte ERK-Phosphorylierung nur dann FGF-R-abhängig war, wenn NCAM180 alleine exprimiert wurde, wohingegen NCAM140 keinen Einfluss hatte. In den alle drei Isoformen exprimierenden Neuroblastoma-Zellen hatte die Inhibierung des FGF-Rezeptors keinen Einfluss auf die NCAM-vermittelte ERK-Phosphorylierung (Niethammer et al., 2002). Diese Erkenntnis führte zu der Annahme, dass NCAM180-Signalweiterleitung durch den FGF-R verarbeitet wird und NCAM140 sich somit eines anderen Mechanismus bedient. Damit könnte bei FGF-R-Inhibierung und gleichzeitiger Anwesenheit von NCAM140 die Signalweiterleitung über einen alternativen Weg fortgesetzt werden, welcher zur Phosphorylierung von ERK führt.

1.5.3 Die Nicht-Rezeptortyrosin-Kinasen Fyn und FAK

Die Annahme, dass der FGF-Rezeptor einziger Mediator NCAM-abhängiger Signaltransduktion ist, wurde durch Versuche an Fyn-defizienten Neuronen in Frage gestellt. An diesen Zellen konnte gezeigt werden, dass das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum inhibiert ist (Beggs et al., 1994). Später konnte eine Interaktion zwischen NCAM140 und Fyn, nicht aber zwischen NCAM180 und Fyn durch Co-Immunpräzipitation demonstriert werden (Beggs et al., 1997).

Die Interaktion von NCAM mit Fyn wird über einen dritten Bindungspartner vermittelt, die Rezeptorprotein-Tyrosin-Phosphatase α , RPTP α (Bodrikov et al., 2005). RPTP α wird wie NCAM und Fyn in Neuronen und an Wachstumskegeln in hohem Maße exprimiert und ist für die Aktivierung der Kinasen der Src-Familie (Roskoski, 2005) bekannt. Diese Annahme basiert auf mehreren Beobachtungen, wobei zunächst Fyn in RPTP α -defizienten Neuronen mit NCAM weder co-immunpräzipitiert noch durch NCAM aktiviert werden konnte. Zudem wurde gezeigt, dass NCAM teilweise mit RPTP α co-lokalisiert und dass das *clustering* (= die Zusammenlagerung) von NCAM die co-Lokalisation verstärkt. Weiterhin ist NCAM-

vermitteltes Neuritenwachstum in RPTP α -defizienten Hippocampus-Zellen als auch in wildtypischen Hippocampus-Neuronen, welche dominant negative Mutanten von RPTP α exprimieren, reduziert (Bodrikov et al., 2005). Hierbei sollte nochmals berücksichtigt werden, dass sich NCAM140 als die Isoform herausstellte, welche die höchste Bindungsaffinität zu RPTP α zeigte. Dies passt gut in die Ergebnisse von Beggs et al., dass im Wesentlichen NCAM140 mit Fyn assoziiert, wohingegen dies für NCAM180 und NCAM120 nicht der Fall ist. In derselben Studie von Beggs und Kollegen konnte gezeigt werden, dass nach Bindung von NCAM-Antikörpern und Kreuzvernetzung mit sekundären Antikörpern die fokale Adhäsionskinase FAK an den NCAM/Fyn-Komplex bindet und das schließlich zur verstärkten Phosphorylierung beider Kinasen führt. Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges mündet in den MAP-Kinaseweg und führt nach Aktivierung der GTPase Ras, der Serin/Threonin-Kinase Raf und der Kinasen MEK1 und MEK2 zur Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 (Schmid et al., 1999). Kolkova et al. konnten zeigen, dass in PC12-Zellen beide Signaltransduktionswege, der FGF-R- und der Fyn/FAK-Weg, an NCAM-stimuliertem Neuritenwachstum mitwirken (Kolkova et al., 2000). Die NCAM-Signalgebung über den ERK-/MAP-Kinase-Weg bewirkt schlussendlich eine Phosphorylierung und somit eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB, welcher für das Neuritenwachstum essentiell ist (Schmid et al., 1999; Kolkova et al., 2000; Jessen et al., 2001).

Zusammenfassend kann man sagen, dass NCAM über zwei unterschiedliche Pfade des MAP-Kinase-Wegs Transduktionssignale vermittelt. Der eine wird durch Bindung an den FGF-Rezeptor initiiert, wohingegen der andere durch die Rekrutierung von FAK zum Fyn-RPTP α -Komplex eingeleitet wird. Diese beiden Signaltransduktionswege scheinen auch räumlich getrennt und unabhängig voneinander zu sein, da der FGF-Rezeptor in *lipid rafts* nicht nachgewiesen werden konnte (Davy et al., 2000; Niethammer et al., 2002), wohingegen für Fyn und andere Mitglieder der Src-Protein-Familie eine *raft*-Lokalisation nachgewiesen werden konnte (Simons und Toomre, 2000).

1.5.4 Intrazelluläres Kalzium und die Aktivierung der Kalzium/Calmodulin Kinase II

Die NCAM-stimulierte Signalweiterleitung führt zu einer Zunahme der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration (Schuch et al., 1989), wobei die Antagonisten der L- und N-Typ Kalziumkanäle können NCAM-abhängiges Neuritenwachstum inhibieren (Doherty et al., 1991). Die Annahme unterstützend, dass Kalzium einen Einfluss auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum hat, zeigten Saffel et al., dass die direkte Aktivierung von Kalziumkanälen ein durch NCAM stimuliertes Neuritenwachstum nachahmt (Saffel et al., 1992). Im Jahre 1994 wurde eine mögliche Signalkaskade vorgeschlagen, die auf der kalziumabhängigen NCAM-Aktivität basiert, die in Pkt. 1.5.2 bereits beschrieben ist und mit der Aktivierung des FGF-Rezeptors und anschließender Phospholipase C γ -Stimulierung zum Kalziumeinstrom über kalziumspezifische Kanäle führt (Williams et al., 1994). Die Arachidonsäure, die die Kalziumkanäle aktiviert, zeigte keinen positiven Einfluss mehr auf Neuritenwachstum nach Inhibierung der Kalziumkanäle durch den Einsatz spezifischer Blocker. Zudem wurde NCAM-abhängiges Neuritenwachstum minimiert, wenn die DAG-Lipase, welche für die Umwandlung des Diacylglycerols in Arachidonsäure verantwortlich ist, blockiert wurde (Williams et al., 1994). Interessanterweise führt die Inhibition des FGF-Rezeptors zu vermindertem, aber nicht vollständig unterbundenem Kalziumeinstrom nach NCAM-Stimulation. Dies erreichte man nur durch den Einsatz von Tyrosinkinase-Inhibitoren, was zu der Annahme führte, dass neben dem FGF-Rezeptor weitere, und zwar wie sich zeigte, Src-Kinase Familie zugehörige Tyrosinkinasen einen Einfluss auf den NCAM-vermittelten Kalziumeinstrom haben (Kiryushko et al., 2006).

Die Regulation im Wachstumskegel wird durch ein im Nervensystem von Säugetieren sehr präsenes Protein vermittelt, die Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (Bennet et al., 1983; Zheng et al., 1994; Gomez und Spitzer, 2000). Der Einfluss der CaMKII auf NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum wurde durch den Einsatz von CaMKII-spezifischen Inhibitoren entdeckt (Williams et al., 1995). Eine 2007 erschienene Studie von Ditlevsen et al. zeigte die Bedeutung der CaMKII für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in dopaminergen Neuronen. In dieser Arbeit zeigte sich aber auch, dass sowohl die CaMKII als auch die PLC für das neurale Überleben der Zellen, für welches sich auch die NCAM-Signalweiterleitung verantwortlich zeigt, verzichtbar sind (Ditlevsen et al., 2007).

Die Aktivität der CaMKII wird durch den Aktivator Calmodulin nach Kalziumbindung eingeleitet. Nach einer Hypothese aktiviert NCAM die CaMKII über den FGF-R-PLC-DAG-

AA-Kalzium-Signalweg. Diese Annahme wird durch das Ergebnis gestützt, dass durch Kalzium-Einstrom oder aber durch Zugabe von AA oder FGF2 erfolgtes Neuritenwachstum durch einen CaMKII-spezifischen Inhibitor reduziert wird (Williams et al. 1995).

1.5.5 Weitere Faktoren im NCAM-vermittelten Signaltransduktionsweg

Die Rolle der Protein Kinase C (PKC) für NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum wurde durch den Einsatz von verschiedenen PKC-spezifischen Inhibitoren deutlich (Kolkova et al., 2000, 2005). Überdies resultierte die homophile Bindung von NCAM in einer erhöhten Autophosphorylierung von PKC (Kolkova et al., 2005). PKC könnte als ein Punkt des Zusammenlaufens des FGF-Rezeptors und des MAP-Kinase Signalweges angesehen werden. PKC ist dem FGF-R und der PLC nachgeschaltet und kann Raf aktivieren, womit eine Verbindung zum MAP-Kinase-Weg geschaffen wird (Rutishauser, 2008). In einer vor kurzem veröffentlichten Studie von Ditlevsen et al. wurde allerdings deutlich, dass dieser Signalweg über PKC womöglich für den gesamten NCAM-MAP-Kinase-Weg entbehrlich sein könnte, da die Inhibierung von PKC oder von PLC keinen Einfluss auf NCAM-abhängige ERK-Phosphorylierung hatte (Ditlevsen et al., 2008 *in press*).

Die PKC-Proteinfamilie besteht aus elf Isoformen, welche durch Kalzium oder DAG aktiviert werden können. Die Isoform PKC β 2 ist an Spektrin und somit auch an NCAM gekoppelt, wobei diese Verbindung wichtig für NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum ist (Leshchyn'ska et al., 2003). Dieses Ergebnis wurde einstweilen von Kolkova und Kollegen mit spezifischen Inhibitoren gegen PKC β 2 bestätigt (Kolkova et al., 2005). Hierbei wurde zudem gezeigt, dass PKC ϵ eine wichtige Rolle in der NCAM-Signalweiterleitung in Granularzellen des Kleinhirns hat.

Ein weiterer Stimulator des NCAM-vermittelten Signaltransduktionsweges ist das Stickstoffmonoxid (NO). Stickstoffmonoxid wird von der NO-Synthase (NOS) synthetisiert und ist in verschiedene NCAM-regulierte Prozesse wie synaptische Plastizität (Daniel et al., 1998; Monfort et al., 2004), Neuritenwachstum (Hindley et al., 1997) und neurales Zellüberleben (Fiscus, 2002) involviert. Das Substrat des NO stellt die lösliche Form der enzymatischen Guanylat-Zyklase (GC) dar, welches zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Guanosin-Triphosphat (GTP) synthetisiert. cGMP wiederum aktiviert die stromabwärts befindlichen Zielproteine wie z. B. die Protein Kinase G (PKG). Dieser NOS-

NO-GC-cGMP-PKG Signalweg scheint in NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum und das NCAM-bedingte neurale Zellüberleben involviert zu sein (Ditlevsen et al., 2007). Der Mechanismus der NCAM-vermittelten NO-Stimulation ist noch unklar. Bekannt ist jedoch, dass zytosolisches Kalzium ein wichtiger Regulator der NO-Aktivität ist (Knowles et al., 1989) und auch die Phosphorylierung der NOS durch die Protein-Kinase-A (PKA), PKC oder die CaMKII beeinflusst wird (Bredt et al., 1992).

Studien mit einem PKA-Inhibitor zeigten die Notwendigkeit von PKA für NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum ist (Jessen et al., 2001). Die Entstehung von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) wird von der Adenylyl-Zyklase reguliert, welche selbst durch den zytosolischen Kalziumgehalt, heterotrimere G-Proteine und die Protein Kinase C gesteuert wird (Willoughby und Cooper, 2007), wobei die Aktivierung der G-Proteine als Teil des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums angesehen wird (Doherty et al., 1991; Hansen et al., 2007). Die G-Protein- oder kalziumabhängige Adenylyl-Zyklase könnte somit NCAM in Verbindung mit cAMP und PKA bringen, die möglicherweise von der PKC-Aktivität reguliert wird.

Der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP response element-binding protein*) wird durch Phosphorylierung an Serin133 aktiviert (Schmid et al., 1999), was wichtig für NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum ist, da die Expression eines dominant negativen CREB Konstrukts in PC12-Zellen dieses Neuritenwachstum unterdrückte (Jessen et al., 2001). Angenommen wurde, dass CREB als eine Art Zielprotein das Zusammenführen der verschiedenen durch NCAM eingeleiteten Signaltransduktionswege vermittelt und die ankommenden Informationen weiter in den Kern leitet. Diese Annahme manifestierte sich, da CREB in anderen zellulären Systemen durch viele der zuvor bereits erwähnten Kinasen wie z. B. PKA, ERK oder CaMKII phosphoryliert werden kann (Johannessen et al., 2004). Jedoch zeigten neueste Studien, dass die Inhibierung von PKA, CaMKII oder PKG keinen Einfluss auf die NCAM-abhängige CREB-Phosphorylierung hat (Ditlevsen et al., 2008 *in press*). Ein inhibitorischer Effekt auf die CREB-Phosphorylierung wurde nur beschrieben, wenn der ERK-Aktivator MEK ausgeschaltet wurde (Schmid et al., 1999). Somit stellt CREB keinen allgemeinen Zielpunkt des NCAM-Signalweges dar. Die Signaltransduktionswege, welche im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum, aber nicht in der CREB-Aktivierung involviert sind, müssen daher ihre Signale auf andere Transkriptionsfaktoren übertragen. Mögliche Kandidaten hierfür könnten NFκB (*nuclear factor κB*) oder *c-fos* sein, welche Transkriptionsfaktoren darstellen, die eine Rolle in NCAM-vermittelten Signalwegen spielen,

wobei NF κ B eine Abhängigkeit von PLC, PKC und CaMKII in Astrozyten zeigt (Choi et al., 2001) und *c-fos* durch CREB reguliert wird (Jessen et al., 2001).

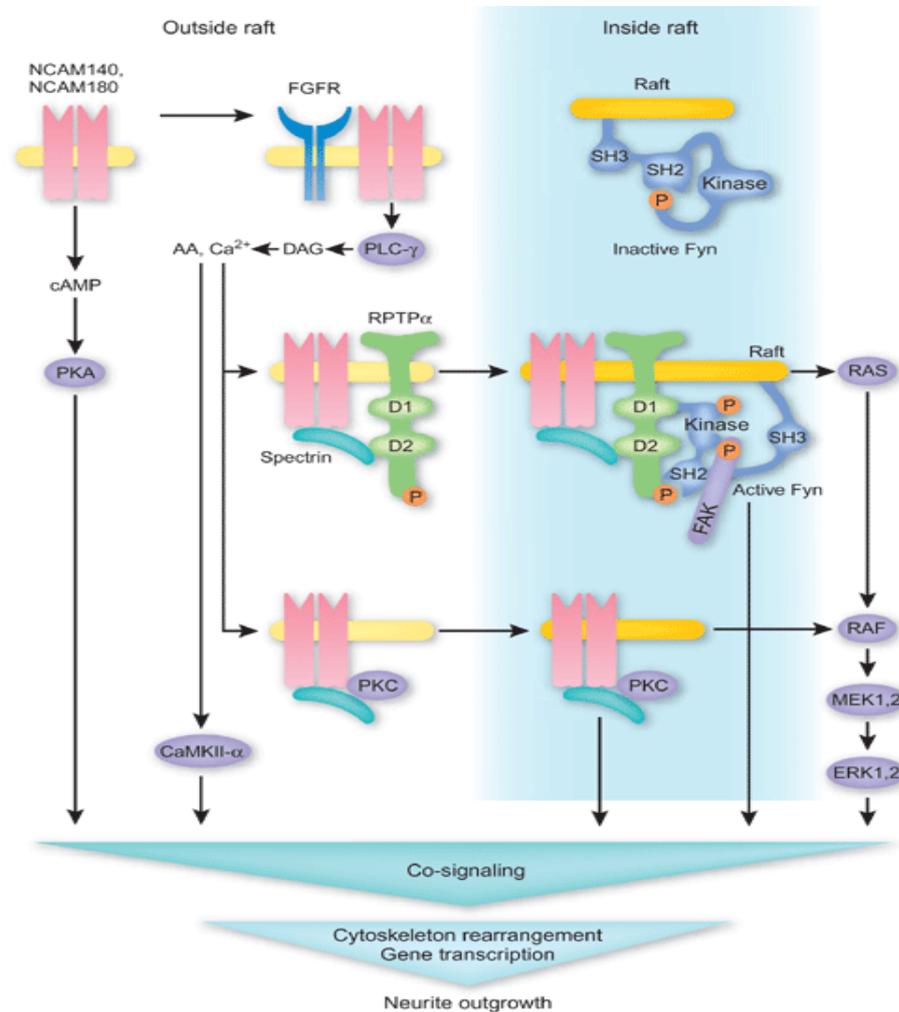


Abb. 1.2: NCAM-Signaltransduktionskaskaden. Die von NCAM140 und NCAM180 aktivierten Signalkaskaden innerhalb (rechts) und außerhalb (links) von *lipid raft* Strukturen der Plasmamembran wurden hier zusammen dargestellt. Außerhalb der *lipid rafts* aktiviert NCAM zum einen die cAMP-abhängige Protein Kinase (PKA) über einen noch unbekannten Mechanismus und interagiert zum anderen mit dem FGF-Rezeptor (FGFR), was zur Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) und der Diacylglycerol-Lipase (DAG) führt, welche Arachidonsäure (AA) erzeugt, wodurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt. Der PLC γ -Signalweg aktiviert AA und Kalzium unabhängig oder in Kombination und führt zur 1) Bildung eines Komplexes aus NCAM140 und der Rezeptorprotein-Tyrosin-Phosphatase α (RPTP α ; Domänen D1 und D2 inklusive der Phosphatgruppen gezeigt), 2) Assoziation und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und 3) Aktivierung von CaMKII α . Fyn (SH3, SH2, Kinasedomänen) ist über Palmitoylierung in den *lipid rafts* assoziiert und die C-terminale, regulatorische Einheit, welche Tyrosinphosphoryliert (P) ist, inaktiv. Das Clustering von NCAM führt zu RPTP α -vermittelter Dephosphorylierung und damit Aktivierung von Fyn, was die fokale Adhäsionskinase (FAK) rekrutiert, welche die Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade initiiert. Die Abbildung zeigt die Autophosphorylierung (P) von Fyn und FAK. Die Signale von NCAM innerhalb und außerhalb von *lipid rafts* sind in Kombination wichtig für den Vorgang des Neuritenwachstums. Spektrin bindet an NCAM180 und in einer geringeren Affinität auch an NCAM140, was die Komplexbildung mit RPTP α und PKC fördert (Abbildung aus Maness und Schachner, 2007).

1.6 Kalziumbindende Proteine

Kalzium (Ca^{2+}) fungiert als ein ubiquitäres Signalmolekül in allen Zellen. Im normalen Ruhezustand einer Zelle ist die zu messende Kalziumkonzentration sehr niedrig ($\sim 100\text{nM}$). Innerhalb der Zelle ist Kalzium jedoch in höherer Konzentration in Organellen gespeichert, vor allem im Endoplasmatischen Retikulum (Sarkoplasmatisches Retikulum in Muskelzellen), aus dem es nach einem entsprechend stimulierenden Signal herausströmen kann. Diese räumliche Abgrenzung und der sehr steile Kalzium-Konzentrationsgradient erlauben es dem Kalzium, eine Funktion als *second messenger* inne zu haben, welcher sehr sensibel Änderungen der Konzentration detektiert und in zelluläre Signale umwandelt (Stryer, 1995).

1.6.1 EF-Hand Proteine

Die Vielzahl der über Kalzium signalisierenden Proteine gehören der Familie der sogenannten EF-Hand-Proteine an wie z. B. das Calmodulin, das Calmodulin-homologe Troponin C und die S100-Proteine (Carafoli, 2002), welche alle einer kalziumabhängigen Konformationsänderung unterliegen. Das strukturelle Motiv der EF-Hand beim Calmodulin setzt sich zusammen aus einer Helix, einer Wendung (oder Umdrehung) und einer weiteren Helix. Die Bezeichnung EF-Hand geht zurück auf das Protein Parvalbumin, dessen Helices E und F die Kalziumbindestelle flankieren (Kretsinger et al., 1987) und bei dem eben diese Konformation einer greifenden Hand ähnelt, bei der Zeigefinger und Daumen die Helices E und F präsentieren sollen.

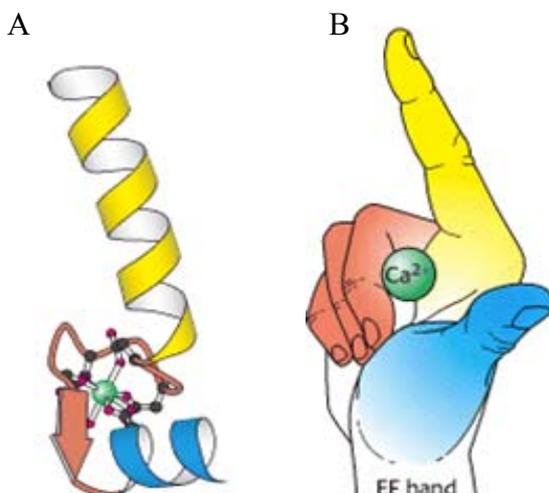


Abb. 1.3: Das EF-Hand Motiv.

Bestehend aus einer Helix, einer Wendung und einer weiteren Helix, bildet die EF-Hand eine Bindestelle für Kalzium in zahlreichen kalziumbindenden Proteinen. Die Abbildung 3A zeigt die E-Helix in gelb, die F-Helix in blau und das Kalziumion ist grün dargestellt. Abbildung 3B soll die Herkunft der Bezeichnung des Motivs durch die Skizze einer greifenden Hand verdeutlichen, bei der Zeigefinger und Daumen die Helices E und F präsentieren sollen. Die Lage des Kalziumions ist durch den grünen Punkt angedeutet (Biochemistry, 2002).

1.6.2 Der Kalziumsensor Calmodulin

Calmodulin (CaM) ist ein 17kDa großes, saures Protein und gehört der Familie der EF-Hand Proteine an, welches ubiquitär in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Einzellern gefunden wurde (Crivici and Ikura, 1995). Es ist durch alle eukaryontischen Spezies hindurch in höchstem Maße konserviert (Crivici and Ikura, 1995), was seine bedeutsame Rolle besonders hervorhebt, da es ein Schlüsselmolekül in kalziumabhängigen *second messenger* Systemen darstellt und somit in viele metabolische Signalkaskaden involviert ist (Carafoli, 2002). Steigt die zytosolische Kalziumkonzentration auf $\sim 500\text{nM}$, so wird Calmodulin aktiviert, wobei dann jede der vier Kalziumionen-Bindestellen des Moleküls besetzt sein kann. Allgemein gesprochen ähnelt die Struktur des Calmodulins einer Hantel, da es aus zwei globulären „Lappen“, die durch eine lange α -Helix miteinander verbunden sind, aufgebaut ist. Jeder „Lappen“ wird von zwei EF-Hand-Strukturen gebildet, sodass Calmodulin vier Bindungsstellen für Kalziumionen besitzt. Das CaM-EF-Hand Motiv umfasst die Aminosäuren 20-31 (DKDGDGTITTKE), 56-67 (DADGNGTIDFPE), 93-104 (DKDGNGYISAAE), und 129-140 (DIDGDGQVNYEE) [Swiss-Prot Eingabe P02593]. In Abwesenheit von Kalziumionen befindet sich das Molekül in einem kalziumfreien Zustand (apoCaM), bei dem die für die Bindung mit verschiedenen Zielproteinen verantwortlichen, negativ geladenen und von hydrophoben Bereichen umgebenen Regionen des Proteins maskiert sind. Die Bindung von Kalziumionen hat eine Konformationsänderung zur Folge, die eine Interaktion mit Zielproteinen ermöglicht. Calmodulin ist so in der Lage - mit positiv geladenen - amphipatischen α -Helices, die in der Aminosäuresequenz seiner Zielproteine lokalisiert sind, zu interagieren.

Der Kalzium/Calmodulin-Komplex ist in der Lage, eine sehr große Anzahl an Enzymen, Pumpen und weiteren Zielproteinen zu aktivieren oder stimulieren. Zwei dieser Zielproteine sollen kurz vorgestellt werden, da eines der Signalverbreitung und eines dem Signalabbruch dient. Die Gruppe der Calmodulin-abhängigen Protein-Kinasen (CaMK) sind in der Lage, viele verschiedene Zielproteine zu phosphorylieren. Diese Enzyme regulieren den Stoffwechsel, die ionische Permeabilität, die Neurotransmitter-Synthese und die Freisetzung neu gebildeter Neurotransmitter. Durch die Bindung des Kalzium/Calmodulin-Komplexes an die CaM-Kinasen werden diese Enzyme aktiviert und sind daraufhin in der Lage, ihre entsprechenden Zielmoleküle zu phosphorylieren. Überdies können diese Kinasen eine Autophosphorylierung durchführen, was den aktiven Zustand auch nach dem Abfall der zytosolischen Kalziumkonzentration und der damit verbundenen Calmodulin-Dissoziation

sichert. Das Bedeutsame an der Autophosphorylierung ist demnach, dass ein Kalzium-Impuls vorangegangen sein muss. Die membranständige Kalzium-ATPase-Pumpe ist ein weiteres bedeutsames Zielprotein des Kalzium/Calmodulin-Komplexes. Die Stimulation der Pumpe durch aktiviertes CaM führt zur Herabsetzung des zytosolischen Kalziumspiegels, um den basalen, niedrigen Kalziumpegel wieder herzustellen. Dieser Vorgang beschreibt folglich ein Beispiel, wie Kalzium/Calmodulin auch an dem Abbruch eines Signals beteiligt sein kann (Biochemistry, 2002).

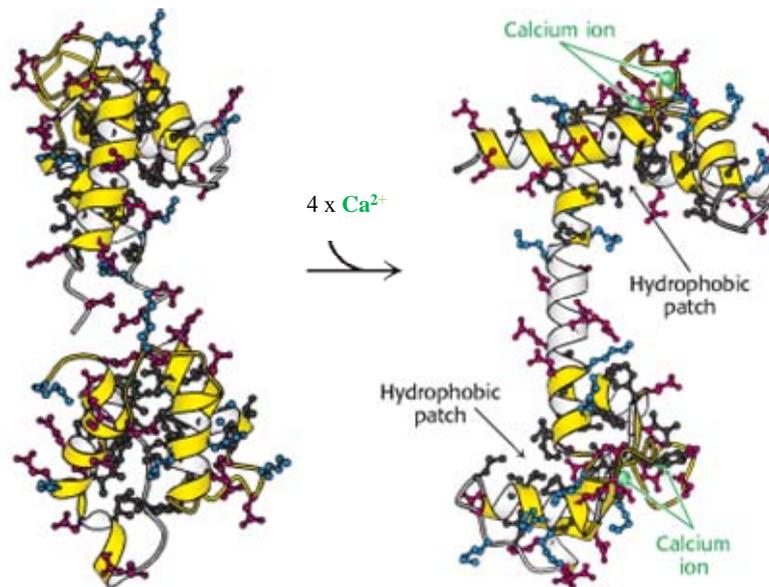


Abb. 1.4: Konformationsänderung des Calmodulins nach Kalziumbindung. In der Abwesenheit von Kalzium (links) weist das EF-Hand Motiv einen hydrophoben Kern auf. Durch die Bindung von Kalziumionen (grün) an jede EF-Hand und daraus resultierende konformationelle Änderungen werden die hydrophoben Stellen an der CaM Oberfläche bloßgelegt. Diese Stellen dienen als Andockfläche für die Zielproteine. Saure Reste (rot), basische Reste (blau) und hydrophobe Reste (schwarz). Die zentrale α -Helix im Calmodulin bleibt trotz Kalziumbindung flexibel (Biochemistry, 2002).

1.7. Calmodulin und das Zelladhäsionsmolekül NCAM

1.7.1 Die Regulation der Proteolyse von NCAM durch Calmodulin

Einen Beweis für die Vielfältigkeit des Calmodulins in seiner Wirkungsweise erbrachten die Ergebnisse von verschiedenen Gruppen, die nachweisen konnten, dass an der Regulation des *ectodomain shedding* der Transmembranproteine APP (*amyloid precursor protein*) (Diaz-

Rodriguez et al., 2000), Tyrosin-Rezeptor-Kinase A (TrkA) (Diaz-Rodriguez et al., 2000; Llovera et al., 2004), L-Selektin (Kahn et al., 1998; Diaz-Rodriguez et al., 2000) oder L1 (Kalus et al., 2003) der Kalziumsensor Calmodulin beteiligt ist. Calmodulin-Inhibitoren stimulieren die Freisetzung der extrazellulären Domäne dieser Moleküle (Diaz-Rodriguez et al., 2000; Kalus et al., 2003). Der konservierte und fundamentale Vorgang, bei dem Transmembranproteine durch Prozessierung in einen löslichen und einen weiterhin membrangebundenen Teil gespalten werden, wird als *ectodomain shedding* (*to shed* = verlieren, abwerfen) definiert und führte zu der alternativen Benennung der beteiligten und verantwortlichen Proteasen als *secretases* oder *shedases* (Schlondorff und Blobel, 1999; Seidah und Chretien, 1999; Blobel, 2000). Auch die proteolytische Prozessierung von NCAM wird von Calmodulin reguliert, wie Kalus et al. zeigen konnten (Kalus et al., 2006). Wie für L1 (Kalus et al., 2003) konnte mit einem spezifischen Calmodulin-Inhibitor eine erhöhte Prozessierung der transmembranen Isoformen von NCAM nachgewiesen werden (Kalus et al., 2006). Diese Regulation dieser Prozessierung zeigte zudem Auswirkungen auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum, welches durch den Einsatz von Calmodulin-Inhibitoren reduziert wurde (Kalus et al., 2006).

1.7.2 Die Interaktion zwischen Calmodulin und NCAM

Bereits im Rahmen der Dissertation von U. Bormann aus dem Jahr 2001 konnte in Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt werden, dass Calmodulin mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 kalziumabhängig interagiert. Auch die Untersuchung der Interaktion der beteiligten Moleküle mittels *Surface Plasmon Resonance* Analyse (Biacore) deutete auf eine kalzium- und magnesiumabhängige Interaktion der intrazellulären Domänen von NCAM180 und NCAM140 mit Calmodulin hin (Bormann, 2001). In ELISA-Studien von Ina Kalus (Dissertation, 2005) konnte gezeigt werden, dass sowohl die intrazelluläre Domäne von NCAM140 als auch die intrazelluläre Domäne von NCAM180 konzentrationsabhängig an Calmodulin binden.

Calmodulin interagiert kalziumabhängig über zwei verschiedene Aminosäuremotive mit seinen potentiellen Bindungspartnern. Zwei Bindungsmotive werden basierend auf der Lage von bestimmten Aminosäuren als „1-5-10“-Motiv mit der Konsensussequenz [FILVW]XXX[FILV]XXXX[FILVW] und „1-8-14“-Motiv mit der Konsensussequenz

[FILVW]XXXXXX[FAILVW]XXXXX[FILVW] bezeichnet (wobei F=Phenylalanin, I=Isoleucin, L=Leucin, V=Valin, W=Tryptophan und A=Alanin; X=beliebig). Das „1-8-14“-Motiv wird weiter unterteilt in Typ A, welcher eine zusätzliche hydrophobe Aminosäure an der Position 5 (F, A, I, L, V und W) aufweist („1-5-8-14“- Motiv) und Typ B („1-8-14“- Motiv). Aufgrund der zweifachen pseudo-Symmetrie des Calmodulinmoleküls ist Calmodulin nicht nur in der Lage, Sequenzmotive in der Orientierung von Amino- nach Carboxyterminus, sondern auch in reverser Orientierung zu binden (Rhoads und Friedberg, 1997). Die Analyse der Aminosäuresequenz der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 führte zu der Identifizierung eines möglichen reversen Calmodulinbindungsmotivs („14-8-5-1“- Motiv). Wettbewerbsstudien zur genaueren Lokalisierung der Calmodulinbindungsstelle unter Verwendung von Peptiden [s. Abb. 1.5], die unter anderem die putative Calmodulinbindungsstelle mimikrieren, bestätigten, dass die Interaktion der Proteine über einen membranahen Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne, der das putative inverse Calmodulinbindungsmotiv aufweist (Peptid1), vermittelt wird (Kalus, 2005).

14 8 5 1	Peptid 1	Peptid 2	
	MDITCYFLNKCGLLMCTAVNLGGRAGPGARGKDMEEGKRAAFSRDESKEPI		NCAM140IC
	MDITCYFLNKCGLLMCTAVNLGGRAGPGARGKDMEEGKRAAFSRDESKEPI		NCAM180IC
	VEVREEEERTPNHDGGRHTEPNETTPLTEFE-----	VEVREEEERTPNHDGGRHTEPNETTPLTEFELPADTTATVEDMLPSVTTV	NCAM140IC
			NCAM180IC
	-----		NCAM140IC
	TTNSDTITETFATAQNSPTSETTTLTSSLAPPATTVPDSNSVPAGQATPS		NCAM180IC
	-----		NCAM140IC
	KGVTASSSSPASAPKVAPLVLDSDTPTSAPSASNLSSSTVLANQGAVLSPS		NCAM180IC
	-----		NCAM140IC
	TPASAGETSKAPPASKASPAPTPTPAGAASPLAAVAAPATDAPQARQEAP		NCAM180IC
	-----		NCAM140IC
	STKGPDPPEPTQPGTVKNPPEAATAPASPRSKAATTNPSQGEDLMDEGNF		NCAM180IC
	-----		NCAM140IC
	KTPDIDLAKDVFAALGSPRPATGASGQASELAPSPADSAVPPAPARTEKG		NCAM180IC
	PVETKSEPPPESEAKPAPTEVKTVPNEATQTKENESKA		NCAM140IC
	PVETKSEPPPESEAKPAPTEVKTVPNEATQTKENESKA		NCAM180IC
	Peptid 3		

Abb. 1.5: Aminosäuresequenzvergleich der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180. Die Lage der in den ELISA-Experimenten eingesetzten Peptide Peptid 1 (rot), Peptid 2 (grün) und Peptid 3 (blau) ist farblich hervorgehoben. Die dunkelblau unterlegten Aminosäuren kennzeichnen ein mögliches Calmodulinbindungsmotiv in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180. Das inverse putative Calmodulinbindemotiv „14-8-5-1“ ist in einem Kästchen über der Sequenz von Peptid 1 hervorgehoben.

1.8 Die fokale Adhäsionskinase FAK

Da im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zu FAK durchgeführt wurden, soll FAK im Folgenden eingehender vorgestellt werden. 1992 wurde die fokale Adhäsionskinase (FAK) von unterschiedlichen Forschern unabhängig entdeckt, einerseits als Produkt von viralen Src-Onkogenen und andererseits in gesunden Zellen als hochgradig Tyrosin-phosphoryliertes Protein, welches an Fokalkontakten mit Integrinen co-lokalisiert ist (Hanks et al., 1992; Guan und Shalloway, 1992; Schaller et al., 1992). Schon kurz darauf konnte gezeigt werden, dass die FAK an Tyrosin-Resten phosphoryliert wird, sobald Integrine akkumulieren (Kornberg et al., 1992). Heute ist bekannt, dass die Protein-Tyrosin-Kinase eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung durch Integrine spielt (Parsons, 2003). FAK oder PTK2 (*protein-tyrosine kinase 2*) gehört zusammen mit Pyk2 (*Proline-rich tyrosine kinase 2*), welche auch RAFTK (*related adhesion focal tyrosine kinase*), CAK β (*cell adhesion kinase β*) oder CADTK (*calcium dependent protein-tyrosine kinase*) genannt wird, zu der Familie der Nicht-Rezeptortyrosin-Kinasen (Avraham et al., 1995; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995; Yu et al., 1996). Während FAK in fast allen Geweben in allen Zellen vorkommt (Schaller et al., 1992), findet man das strukturell sehr ähnliche Pyk2 hauptsächlich im Gehirn und in kleineren Mengen in den inneren Organen (Avraham et al., 1995; Lev et al., 1995; Sasaki et al., 1995). Die Tyrosinkinase FAK weist ein apparentes Molekulargewicht von 125kDa auf und wird in der Zelle zu jedem Zeitpunkt synthetisiert (Mitra et al., 2005). In der Mitte des Proteins befindet sich die katalytische Domäne. Am N-terminalen Ende findet man eine Sequenz, welche stark einer FERM-Sequenz gleicht, welche zuerst in einer Proteinfamilie beschrieben wurde, die die Proteine *erythrocyte band 4.1 protein*, *e_zrin*, *moesin* und *radixin* umfasst, die mit dem kortikalen Zytoskelett interagieren (Chisti et al., 1998, Girault et al., 1999) (FERM= *FAK N-terminal band 4.1*, *e_zrin*, *radixin*, *moesin homology*) (Girault et al., 1999; Sun et al., 2002). Die Mitglieder der Proteinfamilie, die diese Domäne enthalten, sind dafür bekannt, durch FERM transmembrane Glykoproteine mit dem Aktinzytoskelett zu verbinden. Durch diese FERM-Domäne regelt FAK die Interaktionen mit den Integrinen und Wachstumsfaktoren (Parsons, 2003). Schaller et al. (1995) konnten *in vitro* eine Verbindung von FERM an β -Integrinuntereinheiten erzeugen, wohingegen Schlaepfer et al. (2004) vermuten, dass eine Bindung über Talin und Paxillin an die Integrine lediglich *in vivo* erfolgt. Am C-terminalen Ende befindet sich die sogenannte FAT-Region (*focal adhesion targeting*), welche FAK mit neu gebildeten oder schon bestehenden Adhäsionskomplexen verbindet (Martin et al., 2002). Es gibt innerhalb des Moleküls mehrere Positionen, an denen bei Anhäufung von Integrinen innerhalb sehr kurzer Zeit Phosphat angelagert wird. Die meisten

dieser Stellen befinden sich innerhalb der FAT-Region, die wichtigste Region befindet sich jedoch direkt am Übergang zwischen der FERM-Domäne und der katalytischen Region. Die Phosphorylierung dieses Tyr397 (Tyr = Tyrosin) führt zu einer Steigerung der katalytischen Wirkung von FAK (Calalb et al., 1995) und ist notwendig für die Tyrosin-Phosphorylierung von vielen Fokalkontaktproteinen (Cobb et al., 1994; Schaller und Parsons, 1994c; Schaller et al., 1999). Innerhalb der katalytischen Region befinden sich Tyr567 und Tyr577, deren Phosphorylierung ebenfalls abhängig von der Tyr397-Phosphorylierung und wichtig für die maximale adhäsionsinduzierte Aktivierung von FAK ist (Calalb et al., 1995; Owen et al., 1999). Auf molekularer Ebene hat FAK zwei Funktionen: zum einen ist FAK Teil von Signalkaskaden und zum anderen unterstützt es als Skelettprotein die Stabilität der Zelle. Die Tatsache, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von FAK innerhalb kürzester Zeit nach Kontakt von β 1-Integrin mit Fibronektin erfolgt, lässt eine Bedeutung von FAK genau in dieser Signalkette vermuten (Abedi und Zachary, 1995). Es sind mehrere verschiedene Signalwege bekannt, für die FAK relevant ist (Vuori, 1998). Insgesamt spielt FAK eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und Migration von Zellen (Schaller und Parsons, 1994; Abedi und Zachary, 1995; Mitra et al., 2005). Zum Beispiel erhöht eine stärkere Signalgebung durch FAK die Zellmotilität und das Zellüberleben (Cary et al., 1996). Es ist daher nicht erstaunlich, dass die Expression von FAK in vielen hochmalignen Zellen erhöht ist (Cance et al., 2000) und positiv mit der Invasivität von Tumoren korreliert (Abedi und Zachary, 1995; Jones et al., 2000). Diejenigen Zellen, welche keine fokale Adhäsionskinase produzieren können, sind nicht in der Lage, durch Bewegungsrichtungsänderung oder Formierung von Adhäsionsstellen auf äußere Einwirkungen zu reagieren (Wang et al., 2001).

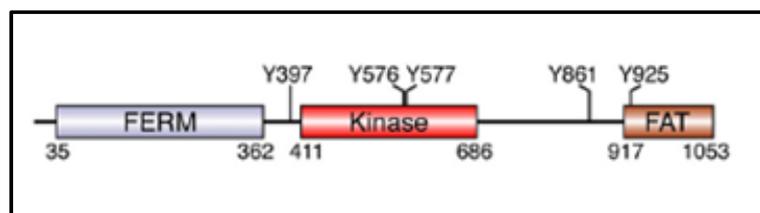


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der fokalen Adhäsionskinase FAK. FAK ist ein 125kDa-Protein, welches mit zahlreichen Proteinen interagieren kann. Tyr397 kennzeichnet die Autosphosphorylierungsstelle des Proteins. Die Kinasedomäne liegt mittig, umgeben von etwa gleichgroßen C- und N-terminalen Strukturen. Der C-terminale Teil trägt die FAT-Region und der N-terminale Teil trägt eine FERM-Domäne (Abbildung aus Lietha et al., 2007).

1.9 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Interaktion zwischen dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM und dem Kalziumsensor Calmodulin zu charakterisieren und ihre Bedeutung für physiologische Prozesse des zentralen Nervensystems näher zu untersuchen. Calmodulin kann als intrazellulärer Bindungspartner von NCAM eine wichtige Aufgabe bei der neuronalen Entwicklung einnehmen. Solche NCAM-Bindungspartner sind an Prozessen der Zellerkennung, der Neuritogenese, der Förderung des axonalen Wachstums und der axonalen Wegfindung, der Bildung und Erhaltung von Myelinscheiden und vielen anderen Prozessen beteiligt. Derartige Funktionen erfordern die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere und sind daher häufig auf die Existenz zytoplasmatischer Interaktionspartner angewiesen. Auf Grund bisheriger Ergebnisse zur Interaktion von NCAM und Calmodulin stellen sich viele Fragen, die hier unter anderem untersucht werden sollten:

1. Wird die Interaktion zwischen NCAM und Calmodulin über eine direkte Bindung vermittelt?
2. Hat Calmodulin einen Einfluss auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum?
3. Beeinflusst eine gestörte Interaktion zwischen NCAM und Calmodulin die Wechselwirkung zwischen NCAM und anderen, bereits bekannten Bindungspartnern?

2. Material

2.1 Lösungen, Puffer, Nährmedien

2.1.1 Lösungen und Puffer

(in alphabetischer Reihenfolge)

Soweit nicht anders erwähnt, wurde je 1l der Lösungen und Puffer mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

ABTS	250 μ l	2% ABTS
	3,5 μ l	30% H ₂ O ₂
	4,75 ml	0,1 M Natriumacetat , pH 5,0
BCA-Reagenz A (<i>BCA-Test</i>)	1 % (v/v)	Bicinchoninsäure Dinatriumsalz
	1,7 % (w/v)	Na ₂ CO ₃ x H ₂ O
	0,16 % (w/v)	Natriumtartrat
	0,4 % (w/v)	NaOH
	0,95 % (w/v)	NaHCO ₃ , pH 11,25
BCA-Reagenz B (<i>BCA-Test</i>)	4 % (w/v)	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
Blockierungslösung (<i>Western-Blot</i>)	3 % (w/v)	fettfreies Milchpulver in TBS
Blockierungslösung (1) (<i>ELISA</i>)	1 %	BSA in PBS
Blockierungslösung (2) (<i>ELISA</i>)	1 %	BSA in PBST
	1 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
Blottingpuffer (5 x) (<i>Western-Blot</i>)	72 g	Glycin
	15 g	Tris
Coomassie-Lösung (<i>Proteingele</i>)	40 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R250
Coomassie-Entfärber (<i>Proteingele</i>)	30 % (v/v)	Ethanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

Elutionspuffer (für His-Fusionsproteine)	250	mM	Imidazol
	300	mM	NaCl
	50	mM	NaH ₂ PO ₄
LB-Medium	10	g	NaCl
	10	g	Bakto-Trypton
	5	g	Hefeextrakt
Lysispuffer (für His-Fusionsproteine)	1	x	PBS
	1	%	Triton-X-100
PBS (10 x)	1,37	M	NaCl
	100	mM	Na ₂ HPO ₄
	27	mM	KCl
	20	mM	KH ₂ PO ₄
PBST	0,05	%	Tween 20 in 1 x PBS
RIPA-Puffer	50	mM	Tris
	150	mM	NaCl
	1	mM	EDTA
	1	%	NP-40
poly-L-Lysin Lösung	0,01	%	PLL (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad PBS
Sammelgel (5%ig) (für SDS-PAGE)	3,77	ml	bidestilliertes Wasser
	0,32	ml	1 M Tris, pH 6,8
	0,05	ml	10 % SDS
	0,83	ml	Acrylamid-Bis 29:1
	25	µl	10 % APS
	5	µl	TEMED
5 x SDS-Probenpuffer	2,2	ml	bidestilliertes Wasser
	0,5	ml	Tris/HCl, pH 6,8
	1,6	ml	10 % SDS
	3,2	ml	Glycerol
	0,1	ml	2 % Bromphenolblau
	0,4	ml	β-Mercaptoethanol
10 x SDS-Laufpuffer	10	g	SDS
	30,2	g	Tris
	144,2	g	Glycin
Stripping-Lösung	0,5	M	NaCl
	0,5	M	Essigsäure

10 x TBS	1,5	M	NaCl
	100	mM	Tris/HCl, pH 8
TBST	1	x	TBS
	0,05	%	Tween 20
TFB I	30	mM	K-Acetat
	50	mM	MnCl
	100	mM	RbCl
	10	mM	CaCl
	15	%	Glycerin
	0,2	N	HAc, pH 5,8
TFB II	10	mM	Na-MOPS
	75	mM	CaCl
	10	mM	RbCl
	15	%	Glycerin, pH 7 mit NaOH
Trenngel (10%ig)	3,92	ml	bidestilliertes Wasser
(für SDS-PAGE)	5,26	ml	1 M Tris, pH 8,8
	0,14	ml	10 % SDS
	4,7	ml	Acrylamid-Bis 29:1
	70	µl	10 % APS
	7	µl	TEMED
Waschpuffer 1	10	mM	Imidazol
(für His-Fusionsproteine)	600	mM	NaCl
Waschpuffer 2	20	mM	Imidazol
(für His-Fusionsproteine)	300	mM	NaCl
Waschpuffer 3	40	mM	Imidazol
(für His-Fusionsproteine)	300	mM	NaCl
Waschpuffer 4	60	mM	Imidazol
(für His-Fusionsproteine)	300	mM	NaCl

2.1.2 Nährmedien und Zellkulturmedien

LB-Medium	10	g/l	Bacto-Trypton, pH 7,4
	10	g/l	NaCl
	5	g/l	Hefeextrakt

LB ^{amp} -Medium	100	mg/l	Ampicillin in LB-Medium
LB ^{amp} -Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
	100	mg/l	Ampicillin
LB ^{kan} -Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
	30	µg/ml	Kanamycin
BME-Medium (1 x) (Invitrogen, Karlsruhe)	2,2	mg/ml	NaHCO ₃
	1	mM	Natriumpyruvat (100 mM)
	2	%	Penicillin (10.000 Units/ml)
	10	mg/ml	Streptomycin (100 x)
	1	%	L-Glutamin (200 mM, 100 x)
	0,1	%	BSA
	10	µg/ml	Insulin
	4	nM	L-Thyroxin
	100	µg/ml	Transferrin
	0,027	TIU/ml	Aprotinin
	30	nM	Natriumselenit
GMEM (Glasgow's Minimal Essentiell (GME-) Medium)	10 %	(v/v)	fötale Kälberserum
	50	U/ml	Penicillin/Streptomycin
	4	mM	L-Glutamin

2.2 Chemikalien

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Biorad, Calbiochem, Invitrogen, Roth, Serva und Sigma-Aldrich. Die Ni-NTA-Agarosebeads stammten von Qiagen und die Anti-Phosphotyrosin Agarose-*beads* (4G10) von der Firma Upstate (Millipore).

2.3 Enzyme, Reagenzien und Marker

Enzyme wurden von New England Biolabs und Invitrogen bezogen. Die 100-bp-Leiter und die 1-kb-Leiter waren von Invitrogen. Von Bio-Rad wurde der *Precision Plus Protein Dual Color Standards* Protein Marker bezogen [s. Anhang].

2.4 Kits

Verwendet wurden folgende Kits: das QIAquick® PCR Purification Kit, das QIAquick® Gel Extraction Kit, das Qproteome® Nuclear Protein Kit, das Plasmid Maxi Kit sowie das Plasmid Mini Kit von Qiagen.

2.5 Plasmide

Die untere Tabelle 2.5 gibt einen Überblick über die verwendeten Expressionskonstrukte und den zugrunde liegenden Plasmiden. Die entsprechenden Plasmidkarten sind dem Anhang zu entnehmen.

Tab. 2.5: Verwendete Plasmide und Expressionskonstrukte

Plasmide	Charakteristika	Herkunft / Referenz
pcDNA3	CMV-Promotor; fl-origin; Ampicillinresistenz-Gen; Neomycinresistenz-Gen; SV40-Promotor; ColE1 origin, BGH pA; Säugetier-Expressionsvektor für Transfektionen	Invitrogen
pQE30	T5-Promoter; <i>lac</i> Operator; Ampicillinresistenz-Gen, ColE1 origin; prokaryontischer Expressionsvektor zur rekombinanten Expression von Proteinen mit Polyhistidin-Domäne (6xHis) am 5' Ende der multiplen Klonierungssequenz zur Aufreinigung über Nickel	Qiagen
NCAM140 in pcDNA3	dient der Expression des Volle-Länge-NCAM140 Fragments in Säugetierzellen, Insertgröße 2600bp	Dr. P. Maness, University of South Carolina, USA
NCAM140ΔCaM in pcDNA3	zur Expression des NCAM140 volle Länge mit deletierter Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne	diese Arbeit
NCAM180 in pcDNA3	dient der Expression des Volle-Länge-NCAM180 Fragments in Säugetierzellen, Insertgröße 3400b	Dr. P. Maness University of South Carolina, USA

zu Tab. 2.5: Verwendete Plasmide und Expressionskonstrukte

Plasmide	Charakteristika	Herkunft / Referenz
NCAM180ΔCaM in pcDNA3	zur Expression des NCAM180 volle Länge mit deletierter Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne	diese Arbeit
NCAM140ICD in pQE30	dient der bakteriellen Expression der 6 x Histidin-markierten intrazellulären Domäne von NCAM140	Dr. M. Delling Dissertation 2001 ZMNH
NCAM140ICDΔCaM in pQE30	Expression der intrazellulären Domäne mit deletierter Calmodulinbindestelle, 6 x Histidin-markiert	diese Arbeit
NCAM180ICD in pQE30	dient der bakteriellen Expression der 6 x Histidin-markierten intrazellulären Domäne von NCAM180	Dr. M. Delling Dissertation 2001 ZMNH
NCAM180ICDΔCaM in pQE30	Expression der intrazellulären Domäne mit deletierter Calmodulinbindestelle, 6 x Histidin-markiert	diese Arbeit

2.6 Oligonukleotide

Die untere Tabelle 2.6 gibt einen Überblick über die verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 2.6: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'	Verwendung
NCAMcalmut-up	GACATCACCTGCTACTACATGAACAAGTGTGGC ATGCTCATGTGCATCGCTGTTAACATGTGTGGCA AAGCTGG	Mutagenese Primer, Mutation des CaM - Bindemotivs
NCAMcalmut-down	CCAGCTTTGCCACACATGTTAACAGCGATGCAC ATGAGCATGCCACACTTGTTTCATGTAGTAGCAG GTGATGTC	Mutagenese Primer, Mutation des CaM - Bindemotivs
NCAMpcDNA3up	CTGATTGGACAGGAGTCCTTGG	Sequenzierung
NCAMpcDNA3down	CTAGAAGGCACAGTCGAGGCTGA	Sequenzierung

2.7 Bakterienstämme

Die folgende Tabelle 2.7 führt die *E. coli*-Stämme auf, die im Zuge der Klonierung von DNS-Konstrukten zum Einsatz kamen.

Tab. 2.7: Verwendete *E. coli* Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp und relevanter Phänotyp	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ (lacZYA-argFV169), Φ 80lacZ Δ M15, F ⁻ .	Clontech (Heidelberg)
<i>E. coli</i> M15(pREP4)	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Lac ⁻ , Ara ⁻ , Gal ⁻ , Mtl ⁻ , recA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ , F ⁻ .	Qiagen

2.8 Zelllinien

Die unten aufgeführte Tabelle 2.8 gibt einen Überblick über die verwendeten Zelllinien und deren charakteristische Eigenschaften.

Tab. 2.8: Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften

Zelllinie	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
Chinese hamster ovary (CHO)	Dehydrofolatreduktase defiziente Hamsterzelllinie,	ATCC CRL - 9096 (Stanley und Siminovitch, 1977)
CHO - NCAM140	NCAM140 exprimierende, stabil transfizierte CHO Zellen	diese Arbeit
CHO - NCAM140 Δ CaM	NCAM140 Δ CaM exprimierende, stabil transfizierte CHO Zellen	diese Arbeit
CHO - NCAM180	NCAM180 exprimierende, stabil transfizierte CHO Zellen	diese Arbeit
CHO - NCAM180 Δ CaM	NCAM180 Δ CaM exprimierende, stabil transfizierte CHO Zellen	diese Arbeit

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

Die Tabelle 2.9.1 führt die verwendeten Primärantikörper und ihre Charakteristika sowie Einsatzgebiete auf.

Tab. 2.9.1: Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Epitop	Verdünnung ELISA	Verdünnung Immunoblot- Analyse
NCAM 5B8	Maus	intrazelluläre Domäne von NCAM140 und NCAM180, monoklonal	1:1000	1:500 – 1:1000
NCAM D3	Maus	intrazelluläre Domäne von NCAM180 (Exon18), monoklonal	1:1000	1:1000
NCAM P61	Maus	intrazelluläre Domäne von NCAM140 und NCAM180, C-terminal, monoklonal	-	1:500 – 1:1000
NCAM 1β2	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von NCAM140 und NCAM180, polyklonal	-	1:5000
NCAMH28	Maus	extrazelluläre Domäne von NCAM140 und NCAM180, monoklonal	-	1:1000
FAK (C20)	Kaninchen	C-Terminus von FAK, detektiert FAK p125, polyklonal, 200µg/ml (Santa Cruz)	-	1:500
FAK (A17)	Kaninchen	detektiert N-Terminus von FAK, FAK p125, polyklonal 200µg/ml (Santa Cruz)	-	1:500
Non-phospho- Src (Tyr527)	Kaninchen	detektiert endogenes Fyn bei De-Phosphorylierung am Tyr 527 (aktivierte Form), polyklonal	-	1:5000

TrkB (H181)	Kaninchen	gegen die extrazelluläre Domäne von TrkB, detektiert die Aminosäuren 160-340, polyklonal	-	1:1000
-------------	-----------	--	---	--------

2.9.2 Sekundäre Antikörper

Die für die Immunoblot-Analyse [s. Pkt. 3.2.3] und für ELISA-Experimente [s. 3.2.7] verwendeten Sekundäantikörper wurden von Dianova (Hamburg) bezogen.

Die eingesetzten Antikörper waren mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish-peroxidase*) gekoppelt und wurden in der Immunoblot-Analyse in einer Verdünnung von 1:10000 bis 1:20000 und im ELISA in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

2.10 Computergestützte Sequenzanalyse

Sequenzanalysen und -vergleiche wurden mit Hilfe des Lasergene-Programms DNASTAR durchgeführt (www.dnastar.com). Die folgenden Datenbanken wurden für die Untersuchungen genutzt: Medline-, BLASTN- und BLASTP-Server der NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov), ExPASy Molecular Biology Server (<http://us.expasy.org/>), BCM Search Launcher (Baylor College of Medicine, <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>), PROF-secondary structure prediction system (University of Wales, Aberystwyth, <http://www.aber.ac.uk/~phiwww/prof/>).

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (DH5 α)

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien des Stammes DH5 α wurde eine Bakterienkolonie auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht (ü. N.) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde von einem Klon eine 10 ml ‚ü. N.‘-Kultur in LB-Medium angeimpft und ü. N. bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser ‚ü. N.‘-Kultur wurden mit 100 ml LB-Medium versetzt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ 0,3-0,4 kultiviert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis gekühlt, anschließend 5 min bei 5000 rpm, 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 30 ml TFB I Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis gekühlt und erneut 5 min bei 5000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 4 ml TFB II Puffer resuspendiert, erneut 10 min auf Eis gekühlt und anschließend in 100 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

3.1.2 Erhaltung von Bakterienstämmen (Glycerol-Stock)

Ausgewählte Bakterienstämme wurden in Flüssigkultur (OD₆₀₀ 0,5-0,6) 1:1 mit 100% Glycerol gemischt und bei -80°C gelagert.

3.1.3 Chemische Transformation kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 2001)

Bei dieser Methode wurden 100 μ l Bakteriensuspension langsam auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA (10-100 ng) oder einem Ligationsansatz (50 ng DNA) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C wurde 500 μ l eiskaltes LB-Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei einer für die Bakterien optimalen Temperatur unter stetigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l

Transformationsansatz auf eine LB-Platte, der restliche Ansatz wurde auf eine zweite LB-Platte (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausgestrichen. Die Platten wurden ü. N. bei einer Temperatur von 37°C kultiviert.

3.1.4 Plasmidisolierung aus 1,5 ml *E. coli* Bakterienkulturen

(GFX. Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Biosciences)

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14000 g und Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durchgeführt. 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 150 µl Lösung II und 10-15-maliges Invertieren lysiert. Das Lysat wurde 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 300 µl Lösung III (10-15 x invertieren) gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 5 min zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu präzipitieren. Der Überstand wurde auf eine GFX-Säule pipettiert, 1 min zentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die an die Säule gebundene DNA mit 500 µl PE-Puffer gewaschen. Nach 1minütiger Zentrifugation wurde der Durchlauf wieder verworfen und die Säule erneut für 1 min zentrifugiert, um alle Ethanolrückstände zu entfernen. Die Säule wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und 50 µl TE-Puffer in die Mitte der Säule pipettiert. Nach 1minütiger Inkubation bei RT wurde die Säule 1 min zentrifugiert, um die DNA zu eluieren.

3.1.5 Plasmidisolierung aus 200 ml *E. coli* Bakterienkulturen

(Plasmid Maxi Kit, Qiagen)

Zur Isolierung großer Mengen DNA wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. Alle verwendeten Puffer sind den Herstellerangaben zu entnehmen. 200 ml Übernachtskultur (mit entsprechenden Antibiotika versetzt) wurde durch Zentrifugation mit $6000 \times g$ für 15 min bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml Resuspensionspuffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 10 ml Puffer P2, 5-maligem Invertieren und 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde 10 ml Neutralisationspuffer P3 hinzu pipettiert,

6-mal invertiert und das Lysat in eine QIAfilter Spritze, die unten verschlossen wurde, gekippt. Nach 10minütiger Inkubation bei RT wurde der Überstand auf eine Qiagen Säule gespritzt, welche zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert wurde. Nachdem die Lösung durchgelaufen war, wurde zweimal mit jeweils 30 ml Puffer QC gewaschen, und die DNA mit 15 ml Puffer QF in ein 30 ml Corex Glasröhrchen eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und anschließender 30minütiger Zentrifugation bei 4°C und 10000 x g gefällt. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (10000 x g; 15 min; 4°C) in 100-300 µl TE-Puffer oder dH₂O gelöst.

3.1.6 Restriktionsverdau von DNA

(Sambrook et al., 1989)

Für die Reaktionen wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer benutzt. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die vom Hersteller vorgeschlagenen Pufferbedingungen gewählt. Bei Inkompatibilität wurde ein sequentieller Verdau durchgeführt und das Enzym durch Hitze (20 min bei 65°C) inaktiviert. Das Volumen eingesetzter Enzymlösung sollte maximal 1/10 des Gesamtrestriktionsvolumens betragen.

Für einen analytischen Restriktionsansatz wurden 50-500 ng DNA mit 1 µl 10 x Restriktionspuffer, 1 µl 10 x BSA und 1-5 U Enzym in einem Gesamtrestriktionsansatz von 10 µl vereint und bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 30-60 min inkubiert.

Das Restriktionsprodukt wurde je nach Verwendungszweck entweder direkt eingesetzt oder mittels *PCR Purification* System (Qiagen) aufgereinigt.

Für einen präparativen Restriktionsansatz wurden 1-7 µg DNA mit 5-20 U Enzym und dem Gesamtvolumen von 30-50 µl entsprechenden Mengen 10 x Puffer und 10 x BSA versetzt. Der Restriktionsansatz wurde bei der für das Enzym optimalen Temperatur für 2-3 Stunden inkubiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung [s. Pkt. 3.1.9] aus dem Gel eluiert [s. Pkt.3.1.10].

3.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

(Sambrook et al., 1989)

Ligationen wurden entweder mittels T4-Ligase (Roche) oder mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche) durchgeführt. In einem 10 µl Ligationsansatz wurde 50 ng dephosphorylierte Plasmid-DNA mit dem 5-10fachen molaren Überschuss an *Insert*-DNA, 1 µl 10 x T4 Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase versetzt. Der Ansatz wurde entweder für 2-3 h bei RT oder ü. N. bei 4°C inkubiert.

Bei Benutzung des Rapid DNA Ligation Kits wurden Insert und Plasmid im molaren Verhältnis 3:1-10:1 eingesetzt und gemäß den Angaben des Herstellers 5-15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

5 µl der Ligationsansätze wurden im Anschluss direkt für die bakterielle Transformation [s. Pkt. 3.1.3] eingesetzt.

3.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

(MiniElute™ PCR Purification Kit, Qiagen)

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (1 min, 13000 x g, RT) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit dem 5fachen Volumen PB-Puffer und mit dem einfachen Volumen Isopropanol versetzt, anschließend auf ein QIAQuick-Säulchen überführt und 1 Minute bei 13000 x g zentrifugiert. Die auf der Säule gebundene DNA wurde mit 500 µl PE-Puffer gewaschen, zentrifugiert und nachdem der Durchlauf verworfen wurde, erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 30 µl TE-Puffer oder H₂O in die Mitte der Säule pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (1 min, 13000 x g, RT) eluiert.

3.1.9 Gelelektrophorese von DNA

(Sambrook et al., 1989)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele in 1 × TAE Puffer gefahren. Je nach Fragmentgrößen wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegele

verwendet. Die DNA wurde mit der entsprechenden Menge 5 x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein angemessener Längenstandard mit aufgetragen. Je nach Anwendung und Gelgröße wurde die Elektrophorese bei 80-120 V durchgeführt. Die Laufzeit wurde entsprechend der erwarteten DNA-Fragmente angepasst. Anschließend wurden die Gele 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in 1 × TAE Puffer) gefärbt und die DNA-Banden mit Hilfe eines Dokumentationssystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB) unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.1.10 DNA-Isolierung aus Agarosegelen (MiniElute™ Gel Extraction Kit, Qiagen)

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (1 min, 13000 x g, RT) durchgeführt. Nach Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht (360 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wurde bei 50°C in dreifachem Volumen Gelsolubilisierungspuffer QG für 10 min aufgelöst, anschließend mit einfachem Volumen Isopropanol versetzt und auf eine MinElute-Säule pipettiert. Die Säule wurde zentrifugiert und mit 700 µl PE-Puffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen und der restliche Puffer durch erneute Zentrifugation entfernt. Die Säule wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, 30 µl TE-Puffer in die Mitte pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und die DNA durch Zentrifugation (1 min, 13000 x g, RT) eluiert.

3.1.11 Mutagenese-PCR nach *Stratagene* - „site directed mutagenesis“

Bei der Erstellung von Punktmutationen innerhalb von DNA-Fragmenten wurde das Prinzip der Quik Change „site directed mutagenesis“ der Firma *Stratagene* angewendet. Die Methode ist den Herstellerangaben zu entnehmen [s. Pkt. 4.1]. Die Mutagenese-Primer wurden so erstellt, dass sie vier Aminosäuren austauschen, welche sich innerhalb der Calmodulinbindestelle befinden. Neben dem Einfügen der Punktmutationen muss der Primer so beschaffen sein, dass die übrige Sequenz mit der Plasmid-DNA identisch ist. Nach den

Angaben von *Stratagene* sollten die Primer eine Länge von mindestens 25 bis maximal 45 Basenpaaren aufweisen.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

(Laemmli, 1970)

Proteine wurden zur Analyse ihres Molekulargewichtes eindimensional in reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen unter Verwendung von Mini-Protean III Elektrophoresekammern (Biorad, München) nach Angaben des Herstellers elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden Gele von 1 mm Dicke mit einer Laufstrecke von 0,5 cm im Sammelgel und 5 cm im Trenngel verwendet.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit Probenpuffer (6) versetzt, bei 95°C für 5 min erhitzt und kurz zentrifugiert. Als Größenvergleich wurde zusätzlich ein Proteinmarker (*Precision Plus Protein Dual Color Standards* von Biorad) aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde für das Sammelgel bei 80V durchgeführt. Beim Übergang der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 130-160V erhöht. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden Proteine unspezifisch und direkt auf dem Gel angefärbt (Coomassie-Färbung) oder mit Hilfe der Immunoblot-Analyse spezifisch über einen Antikörper nachgewiesen werden.

3.2.2 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Alle Schritte erfolgten bei RT unter leichtem Schütteln. Das Gel wurde 1 h in die Coomassie-Lösung inkubiert. Danach wurde es in die Coomassie-Entfärberlösung gelegt. Es wurde so lange entfärbt, bis sich die Banden deutlich vom Hintergrund absetzten. Danach wurde das Gel in 1 x PBS aufbewahrt.

3.2.3 Immunoblot-Analyse

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

3.2.3.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

(Towbin et al., 1979)

Bei der Immunoblot-Analyse werden Proteine durch SDS-Gelelektrophorese [s. Pkt. 3.2.1] aufgetrennt und anschließend vom SDS-Gel auf eine Membran (Nitrocellulose) transferiert. Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine von SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (Protan® Nitrocellulosemembran, Schleicher & Schuell, Daßel) wurden MINI TRANSBLOT-Apparaturen von Biorad (München) verwendet. Das Transfer-Sandwich, bestehend aus drei *Whatman*-Filtern (*Whatman* BIOMETRA, Göttingen), dem SDS-Gel, der Nitrocellulose-Membran und wiederum drei *Whatman*-Filtern wurde nach Angaben des Herstellers in die Blotting-Apparatur eingesetzt. Alle Bestandteile des Sandwiches wurden vor dem Gebrauch in Blotpuffer eingeweicht. Der Transfer dauerte in der Regel 1 h 45 min bis 2 h bei einer Stromstärke von 400 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine Stunde bei RT mit 3 % Blockierungslösung inkubiert.

3.2.3.2 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 3 % Blockierungslösung 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 Waschschriffe wurden bei RT durchgeführt. Nach vier Waschschriffen à 10 min mit TBST wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 1 h inkubiert. Nach vier weiteren Waschschriffen mit TBST à 10 min wurde die Nachweisreaktion [s. Pkt. 3.2.3.4] angeschlossen.

Die verwendeten Primärantikörper und ihre Charakteristika sind der Tab. 2.9.1 zu entnehmen. Alle verwendeten Sekundärantikörper [s. Pkt. 2.9.2] wurden hier in einer Verdünnung von 1:10000 in TBST eingesetzt.

3.2.3.3 Stripping einer Western Blot Membran

Zur Detektion eines zusätzlichen Antikörpers auf einer bereits benutzten Nitrocellulose-Membran wurde diese mit einer *Stripping*-Lösung versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Dies führt zum Ablösen der bereits gebundenen Antikörper. Nach einer 5 bis 10minütigen anschließenden Inkubation mit 1 M Tris-HCl (pH 8,0) wurde mit der Methode wie in Pkt. 3.2.3.2 fortgefahren.

3.2.3.4 Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz

Die Nachweisreaktion erfolgte über das an die verwendeten Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish-peroxidase*), das chemilumineszente Substrate umsetzen kann. Für die Nachweisreaktion wurden die Reagenzien *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.

3.2.4 Proteinfällung mittels Aceton

Zur Fällung von Proteinlösungen wurde die Probe mit 7 Volumina eiskaltem Aceton vermischt und für mehr als 24 h bei -20°C eingefroren. Die ausgefällten Proteine wurden für

30 min bei 3000 x g und 4°C sedimentiert, der Überstand verworfen und das an der Luft getrocknete Sediment in Probenpuffer für SDS-PAGE aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Immunoblot-Analyse [s. Pkt. 3.2.3].

3.2.5 Proteinbestimmung (BCA-Test)

(Smith et al., 1985)

Die Bestimmung der Konzentration von Proteingemischen wurde mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent Kits* der Firma Pierce (Bonn) in Mikrotiter-Platten durchgeführt. Zur Herstellung der BCA-Lösung wurden Reagenz A und B in dem Verhältnis 1:50 gemischt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 210 µl. 10 µl der zu analysierenden Probe wurden mit 200 µl BCA-Lösung versetzt, der Ansatz gemischt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach 45minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 560 nm). Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe bestehend aus 0 µg/ml - 1000 µg/ml BSA (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml) in oben beschriebener Weise angesetzt und mit den zu analysierenden Proben inkubiert. Mit Hilfe der linearen Regression wurde anhand der gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt.

3.2.6 Rekombinante Expression His-markierter Proteine mit dem pQE-System in *E.coli* und deren Aufreinigung

(The QIAexpressionist™ Handbuch, Qiagen, 2002)

Die intrazellulären Domänen von Wildtyp-NCAM140 und Wildtyp-NCAM180 und deren mutierten Formen NCAM140ICDΔCaM und NCAM180ICDΔCaM wurden mit Hilfe des pQE-Systems rekombinant in *E. coli* hergestellt. Bakterien vom *E. coli*-Stamm M15 (pREP4) wurden mit den Expressionskonstrukten im pQE30-Vektor [s. Anhang] transformiert und auf LB^{amp/kan}-Platten ausgestrichen. 100 ml LB^{amp/kan}-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. 5 l LB^{amp/kan}-Medium wurden mit

der Vorkultur inokuliert und bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 geschüttelt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Kultur weitere 4,5 h bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3500 x g sedimentiert und bis zur Lyse bei -20°C gelagert. Die Bakterien wurden in Lysispuffer resuspendiert und durch dreimalige Behandlung mit der French Press aufgeschlossen. Die native Proteinaufreinigung aus den aufgeschlossenen Bakterien erfolgte mit Hilfe des N-terminalen His-tags und Nickelbeads nach Protokoll 12 (mit Ausnahme der Waschschrte) des QIAexpressionist™ Handbuches. Die Nickelbeads wurden je einmal mit jedem Waschpuffer 30 min bei 4°C gewaschen. Elutionsfraktionen wurden vereinigt und bei 3000 x g in Vivaspin-Aufkonzentrierungsröhrchen (Vivascience) zentrifugiert. Die His-Fusionsproteine wurden auf diese Weise in 1 x PBS eingengt.

3.2.6.1 Bakterienlyse mit der French Press

Die Bakterien wurden sedimentiert (Zentrifugation bei 3500 x g, 4°C, 10 min) und bis zur Lyse bei -20°C gelagert. In nativem Lysispuffer wurden die Pellets resuspendiert (20 ml pro 500 ml Kultur) und die Suspension wurde in eine vorgekühlte French-Pressure-20K-Kammer (Kapazität: 40 ml) überführt. Die Suspension wurde komprimiert (Spectronic Instruments/SLM Amico, 10000 psi, 5 min) und die Zellen durch vorsichtiges Öffnen des Ventils lysiert. Die Prozedur wurde dreimal wiederholt und die erhaltene Suspension zentrifugiert (15000 x g, 4°C, 15 min).

3.2.7 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die Interaktion der intrazellulären Domänen von Wildtyp-NCAM140 und Wildtyp-NCAM180 und deren mutierten Formen NCAM140ICDΔCaM und NCAM180ICDΔCaM mit Calmodulin wurden in ELISA-Studien untersucht.

Der Bindungspartner Calmodulin (aus Rindergehirn isoliert, Sigma-Aldrich) wurde auf der Polyvinylchlorid-beschichteten Oberfläche einer 96-well Microtiter-Platte (Nunc-

Immunomodule Maxisorb, Nunc, Roskilde, Dänemark) durch Inkubation mit einer 10 µg/ml enthaltenden Calmodulinlösung, gelöst in 1 mM CaCl₂ in dH₂O, ü. N bei 4 °C auf einem Schüttler immobilisiert. Als Kontrolle diente steriles Wasser. Nicht gebundenes Calmodulin wurde durch drei Waschschriffe mit PBS entfernt. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit der Blockierungslösung 1 für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler abgesättigt. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBST wurde eine Inkubation von immobilisiertem Calmodulin mit den potentiellen Bindungspartnern, den intrazellulären Domänen von wildtypischem und mutiertem NCAM140 bzw. NCAM180 für 2 h bei RT auf einem Schüttler angeschlossen. Die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 wurden in Blockierungslösung 2 gelöst.

Ein Nachweis der spezifischen Bindung der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 an Calmodulin erfolgte über die Inkubation mit einem Primärantikörper für 1,5 h bei RT auf einem Schüttler. Für den Nachweis der intrazellulären Domäne von NCAM140 wurde der NCAM-Antikörper 5B8 [s. Tab. 2.9.1] in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Für die Detektion der intrazellulären Domäne von NCAM180 wurde der NCAM-Antikörper D3 [s. Tab. 2.9.1] in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt. Die Primärantikörper wurden in Blockierungslösung 2 verdünnt. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBST folgte eine einstündige Inkubation bei RT auf einem Schüttler mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in der Blockierungslösung 2 eingesetzt. Der ELISA-Ansatz wurde weiteren drei Waschschriffen mit PBST unterzogen, dem ein vierter Waschschriff mit PBS angeschlossen wurde.

Der Nachweis des gebundenen Anteils der Bindungspartner erfolgte mit Hilfe einer durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish-peroxidase*) katalysierten Farbreaktion. Das Enzym HRP setzt das ABTS in der Färbelösung in Gegenwart von H₂O₂ um, so dass eine Farbvertiefung entsteht. Die Absorption des Farbstoffs wurde abhängig von der Intensität nach verschiedenen Zeitpunkten (10 min bis 30 min) bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen. Die Farbintensität korreliert mit dem gebundenen Teil des Bindungspartners.

3.2.8 Co-Immunpräzipitation

3.2.8.1 Co-Immunpräzipitation über Protein A/G-Agarose-beads

Hierbei wurden 1 mg Gesamtprotein (z. B. aus lysierten CHO-Zellen) in 1 ml RIPA-Puffer aufgelöst und bei 4°C unter vorsichtigem Schütteln für 1 h inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Lysate bei 20000 g für 10 min wurde der Überstand mit 30 µl Protein A/G-Agarose-beads (*beads* = Kügelchen) der Firma Santa Cruz Biotechnology versetzt und für 1 h bei 4°C auf einem *head-over-tail* Rotor inkubiert (*preclearing*). Nach dem Pelletieren der *beads* bei 500 g für 10 min wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Überstände wurden nun mit dem entsprechenden Antikörper oder den Negativ-Kontroll-Ig für mindestens 3 h bei 4°C auf dem *head-over-tail* Rotor inkubiert. Anschließend wurden 50 µl *beads* zu jeder Probe hinzugefügt und ü. N. weiter bei 4°C auf einem *head-over-tail* Rotor inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die *beads* dreimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit PBS gewaschen und abschließend in SDS-Probenpuffer für 5 min aufgekocht. Das eluierte Material wurde im *Western Blot* zur Analyse eingesetzt.

3.2.8.2 Co-Immunpräzipitation über Anti-Phosphotyrosin-Agarose-beads

Bei dieser Methode der Präzipitation wurden die transient oder stabil transfizierten CHO-Zellen geerntet und lysiert. Der hier eingesetzte RIPA Puffer ist zusätzlich mit den Phosphatase Inhibitor Cocktails 1 und 2 der Firma Sigma-Aldrich versetzt. Zu 1 mg Gesamtprotein werden mit RIPA Puffer vorab gewaschene Anti-Phosphotyrosin-Agarose-beads (40 µl je Ansatz) hinzugefügt und ü. N. bei 4°C auf einem *head-over-tail* Rotor inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die *beads* dreimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit TBS gewaschen und abschließend in SDS-Probenpuffer für 5 min aufgekocht. Das eluierte Material wurde im *Western Blot* zur Analyse eingesetzt.

3.2.9 Oberflächenbiotinylierung

Alle Schritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C. Die verwendeten Zellen wurden zweimal mit PBS²⁺ (1 x PBS versetzt mit 1 mM Kalzium und 1 mM Magnesium) gewaschen und zweimal für eine Zeit von 10 min mit 0,5 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin in PBS²⁺ inkubiert. Zum Absättigen der freien Bindungen wurden die Zellen anschließend 5 min bei 20 mM Glycin belassen und erneut vorsichtig zweimal mit PBS²⁺ gewaschen. Die Lyse erfolgte mit RIPA-Puffer für 30 min und die folgende 10minütige Zentrifugation bei 700 g trennte Zellkerne und Detritus ab. Von dem Überstand wurde die Proteinkonzentration mittels BCA-Test ermittelt, währenddessen die Streptavidin-Kügelchen zweimal mit RIPA-Puffer gewaschen worden sind. Dann wurden entsprechend gleiche Proteinkonzentrationen mit der gewaschenen Streptavidin-Emulsion rotierend über Nacht bei 4°C inkubiert und diese am folgenden Tag dreimal mit RIPA-Puffer und einmal mit PBS gewaschen. Die Elution erfolgte mittels Probenpuffer für SDS-PAGE durch eine Inkubation für eine Zeit von 5 min bei 95°C. Die so erhaltenen Proben wurden mit Hilfe der SDS-PAGE und *Western Blot*-Analyse untersucht.

3.2.10 Fluorographische Messung von mit Palmitinsäure inkubierten CHO-Zellen

Stabil transfizierte CHO-Zellen [s. Tab. 2.8] wurden in 35 mm Kulturschalen ausgesät und 16 h in Medium ohne Serum (FCS) inkubiert. Nach Zugabe von ³[H]Palmitinsäure (300 µCi/ml, 30-60 Ci/mmol) wurden die Zellen für weitere vier Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 600 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Die Überstände wurden ü. N. mit polyklonalem NCAM-Antikörper (1β2, 1:100) bei 4°C auf einem *head-over-tail*-Rotor inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Protein A/G-Agarose-*beads* zu jeder Probe hinzugefügt und für 3 h weiter bei 4°C auf einem *head-over-tail*-Rotor inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die *beads* dreimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit PBS gewaschen und abschließend in nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer für 5 min aufgekocht. Das eluierte Material wurde im *Western Blot* zur Analyse eingesetzt. Radiomarkierte Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden mit einer *Amplify*-Lösung von Amersham für 30 min behandelt und unter Luftausschluss auf *Whatman*-Papier getrocknet. Anschließend wurden die aufgelegten Filme (Amersham, Hyperfilm MP) bei -80°C für mindestens 6 Wochen exponiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

Die Zelllinien wurden bei einer Temperatur von 37°C, einem CO²-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % in geeigneten Brutschränken kultiviert. Die für die Kultivierung von Zellen verwendeten Kulturflaschen oder -schalen wurden von der Firma Nunc bezogen.

3.3.1 Auftauen von CHO-Zellen

Die Zellen wurden im 37°C Wasserbad schnell aufgetaut und in 5 ml GMEM (*Glasgow's Minimal Essential Medium*) der Firma PAA Laboratories (Cölbe) aufgenommen. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 900 rpm wurde das Medium vorsichtig abgenommen und das Pellet in entsprechendem Volumen GMEM resuspendiert und in der Kulturflasche ausgesät.

3.3.2 Kultivierung von CHO-Zellen

Für die Kultivierung der CHO-Zelllinie (*chinese hamster ovary*) wurde GMEM verwendet. Dem Basalmedium GMEM wurden die in Pkt. 2.1.2 aufgeführten Zusätze zugegeben. Für die Kultivierung wurden Kulturflaschen in einer Größe von 75 cm² 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 HBSS-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 Trypsin (1:5000, Invitrogen, Karlsruhe). Nach einer Zugabe von weiteren 7 ml des GMEM Kulturmediums wurden die Zellen resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10 ausgesät. Für Transfektionsansätze wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:20 in 6-well-Kulturschalen (d = 35 mm; area = 6,96 cm²) 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.

3.3.3 Langzeitlagerung der Zelllinien

Für die Langzeitlagerung der Zelllinien wurden die Zellen einer konfluenten Kulturflasche, einmal mit 10 ml HBSS gewaschen, wie beschrieben trypsinisiert und anschließend in 7 ml HBSS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1-2 ml Einfriermedium aufgenommen. 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 bei -169°C.

3.3.4 Transiente Transfektion von CHO-Zellen

Die Transfektion der in Tabelle 2.5 aufgeführten pcDNA3 Vektoren, welche die NCAM-Isoformen exprimieren, wurde mit Hilfe des FuGENE 6 Transfektionskits der Firma Roche durchgeführt. Hierfür wurden 1 - 3 x 10⁵ Zellen in 6-well-Platten ausgesät und inkubiert, bis sie eine Wachstumsdichte von 50 - 80 % erreicht haben (~ 24 h). Dann wurden 3 µl FuGENE 6 Reagenz mit 1-2 µg DNA pro Ansatz und *well* in 100 µl GMEM ohne Zusätze gemischt und nach 15 bis 45minütiger Inkubation auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für mindestens 18 h im Inkubator belassen.

3.3.5 Stabile Transfektion von CHO-Zellen

Für die stabile Transfektion wurden CHO-Zellen verwendet. Die Transfektion wurde mit Hilfe des Transfektionskits der Firma Invitrogen (Lipofektamin, Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-well-Platten ausgesät und in Kulturmedium kultiviert. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von 80-90 % wurde das Kulturmedium gegen serumfreies Kulturmedium ausgetauscht. Die Zellen wurden pro *well* mit 2 µg DNA transfiziert. Dazu wurden 6 µl Plus Reagenz und 4 µl Lipofektamin inkubiert und die Transfektion wurde nach drei Stunden durch Zugabe von Serum- und Antibiotika-haltigem Kulturmedium gestoppt.

Nach 2 Tagen Kultivierung wurden die Zellen gewaschen und so in *6-well*-Platten mit Selektivmedium ausgesät, dass eine Konfluenz von 20 % erhalten wurde. Das Selektivmedium wurde in dreitägigem Abstand erneuert. Nach ca. 3 Wochen waren alle nicht stabil transfizierten Zellen aufgrund fehlender Resistenz gegenüber Geneticin abgestorben und einzelne Kolonien stabil transfizierter Zellen wurden sichtbar. Diese Kolonien wurden durch Picken mit einer Pipette in *12-well*-Platten vereinzelt, und bei einer Konfluenz von 80% geerntet, lysiert und das Vorhandensein der hineingebrachten Proteine mittels *Western-Blot*-Analyse überprüft. Positive Klone wurden eingefroren oder für weitere Experimente verwendet.

3.3.6 Lyse von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden zunächst mindestens einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 200-400 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Hierbei mussten die Zellen mit einem Schaber abgekratzt und der Ansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden, wo sie zur Lyse im RIPA-Puffer unter ständigem Schütteln bei 4°C inkubiert wurden. Nach einer Zentrifugation (15000 x g, 4°C, 10 min) wurden die Überstände zur weiteren Analyse eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

3.3.7 Stimulation von CHO-Zellen oder Kleinhirn-Neuronen

Für die Stimulation von CHO-Zellen oder Kleinhirn-Neuronen in *6-wells* wurden die Zellen für 5 h in Medium ohne Serum (FCS) inkubiert. Nach Zugabe von polyklonalem NCAM-Antikörper (1β2, 10 µg/ml, 1:1000) wurden die Zellen für 20 min (CHO-Zellen) oder 1 h (Kleinhirn-Neurone) im Inkubator belassen. Abschließend wurden die Zellen lysiert und weiter verarbeitet.

3.3.8 Primärzellkultur

3.3.8.1 Beschichtung von Deckgläsern mit PLL (poly-L-Lysin)

Die Deckgläser (Durchmesser 15 mm) wurden für eine halbe Stunde in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler mit Aceton gewaschen. Es wurden drei Waschschrirte mit Wasser angeschlossen, um das Aceton zu entfernen. Die Beschichtung der Deckgläser mit poly-L-Lysin erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Dazu wurden die gewaschenen Deckgläser in einer 0,01 %igen PLL-Lösung aufgenommen. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser erneut dreimal mit Wasser gewaschen und im Anschluss unter der Sterilbank in einer zuvor mit UV-Licht bestrahlten und mit Alu-Folie ausgelegten Wanne für 1,5-2 h getrocknet. Nach 15minütiger Bestrahlung der getrockneten Deckgläser mit UV-Licht wurden diese unter sterilen Bedingungen aufbewahrt.

3.3.8.2 Einzelzellkulturen von Kleinhirn-Neuronen

(Loers et al., 2005)

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 Dekapitierung 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 mit dem Kleinhirn assoziierte Blutgefäße und die Hirnhaut entfernt, das Kleinhirn in frische eiskalte HBSS-Lösung überführt und mit einer feinen Pinzette in drei Teile geteilt. Die Gewebestücke wurden mit eiskalter HBSS-Lösung gewaschen (5 ml HBSS je drei Kleinhirne) und anschließend mit Trypsin/DNase I-Lösung (0,2 g Trypsin, 20 mg DNase I, 200 µl MgCl₂ (80 mM) ad 20 ml HBSS, pH 7,8), (1 ml je 3 Kleinhirne) 15 min bei RT inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschschrirte mit HBSS. Nach Zugabe der DNase I-Lösung (10 mg DNase I, 50 mg Glukose ad 20 ml BME-Medium), (1 ml/3 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/3 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 resuspendiert.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit Medium X-1 entsprechend verdünnt. Für Immunfärbungen wurden die Zellen in einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/ml und für die Analyse des Neuritenwachstums der Kleinhirnneuronen 1×10^5 Zellen/ml und 2×10^5 Zellen/ml auf ein gewaschenes, mit PLL beschichtetes Deckgläschen ausgesät.

3.3.8.3 Einzelzellkulturen von hippocampalen Neuronen

Die Präparation der hippocampalen Neuronen wurde von G. Dityateva durchgeführt. Für die Präparation von hippocampalen Neuronen wurden 1-3 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57Bl/6J verwendet. Die Präparation wurde auf Eis durchgeführt. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Dekapitierung. Nach Eröffnen der Schädeldecke wurde das Gehirn entfernt und der Hippocampus präpariert. Das Gewebe wurde in 1 mm dicke Stücke geteilt und dreimal mit Präparationslösung und im Anschluss einmal mit HBSS-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde dem Gewebe Trypsin-DNase I-Lösung hinzugefügt und eine Inkubation für 5 min angeschlossen. Nach weiteren zwei Waschschritten mit Präparationslösung wurde der Ansatz für 5 min mit Trypsin-Inhibitorlösung versetzt, das Gewebe erneut mit Präparationslösung gewaschen und für 10 min mit einer Mischung aus Präparationslösung und Serum (Verhältnis 1:5) inkubiert. Der Ansatz wurde erneut mit Trypsin-Inhibitorlösung versetzt und die nachfolgenden Arbeitsschritte wie oben beschrieben durchgeführt. Daraufhin wurden zwei Waschschrritte mit Präparationslösung angeschlossen, DNase I-Lösung hinzugefügt und die Gewebestücke mit Hilfe einer abgerundeten Glaspasteurpipette mit abnehmendem Durchmesser durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zu einer homogenen Zellsuspension verarbeitet. Der Zellsuspension wurde Präparationslösung hinzugefügt und für 15 min bei $80 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden ein weiteres Mal in Präparationslösung gewaschen. Die nach der Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden in Präparationslösung aufgenommen und in einer Dichte von 1000 Zellen/mm² ausgesät.

In den ersten drei Tagen wurden die Zellen in Kulturmedium mit 10 % Serum kultiviert. Am dritten Tag und jeweils zwei Tage später wurde die Hälfte des Mediums entfernt und durch Kulturmedium mit den Zusätzen 5% Serum, 2 % B-27 supplement (Life Technologies, Karlsruhe) und 5 μ M Ara C (Cytosine b- D-Arabinofuranoside, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ersetzt.

3.3.8.4 Transfektion von hippocampalen Neuronen

Die Transfektion der hippocampalen Neuronen wurde von Dr. A. Dityatev durchgeführt. Für die Transfektion wurde das SCN Nucleofactor Kit von Amaxa eingesetzt. Eine Zellzahl von 2×10^5 wurde pro Transfektionsansatz benötigt. Für jeden einzelnen Ansatz wurden 0,1 μ g - 0,6 μ g DNA (in pcDNA3) mit 0,4 μ g pmax EGFP in 3 μ l Basic Neuron SCN Nucleofactor-Lösung vermischt. Die Zellen wurden in 20 μ l Basic Neuron SCN Nucleofactor-Lösung resuspendiert und mit dem vorbereiteten DNA Gemisch versetzt. Die Probe wurde anschließend in eine Amaxa-Küvette überführt und das Programm 7 wurde gemäß Herstellerangaben ausgeführt. Dann wurden 80 μ l des Primärkulturmediums zu der Probe in die Küvette gegeben und abschließend die Gesamtprobe auf ein zuvor präpariertes Deckgläschen in eine 96-well-Platte übertragen. Die transfizierten Zellen wurden im Inkubator (37°C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit) belassen und nach 4 h einem Mediumwechsel unterzogen, wobei das Transfektionsmedium durch Primärkulturmedium ersetzt wurde. Die Fixierung der Zellen wurde nach 24 h durchgeführt.

3.3.8.5 Stimulation von hippocampalen Neuronen und Neuritenwachstum

Die Stimulation der hippocampalen Neurone erfolgte an lebenden, noch nicht fixierten Zellen. Hierfür wurden die mit NCAM und die mit dem pcDNA3-Leervektor transfizierten Zellen auf mit NCAM-Fc (4 μ g/ml) beschichteten Deckgläschen inkubiert und für 24 h belassen. Als Kontrollansatz wurden die Zellen zudem auf mit PLL beschichteten Deckgläschen inkubiert. Die Zellen wurden nach Fixierung an einem Axiophot 2 Mikroskop der Firma Zeiss (Jena) mit einer AxioCam HRc Digitalkamera (Zeiss) analysiert. Hierbei kam die AxioVision

Software (Version 3.1, Zeiss) und das Plan-Neofluar 40 x Objektiv (0,75, Zeiss) zum Einsatz. Für die Analyse des Neuritenwachstums wurden ausschließlich Neuriten von einzelnen Neuronen gewertet, welche nicht in direktem Zellkontakt mit anderen Neuronen standen. Es wurden nur Neuriten gezählt, die in der Länge den Zellkörper übertrafen. Für jeden Ansatz des Experiments wurde die Länge von 100 einzelnen Neuriten benötigt.

3.3.8.6 Fixierung von hippocampalen Neuronen

Zur Fixierung der hippocampalen Neurone, wurde das Medium der auf Deckgläschen befindlichen Zellen entfernt und die Zellen mit je 1 ml 4 %igem Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in PBS bei 4°C aufbewahrt

3.3.8.7 Immunzytochemie an fixierten Cerebellum-Neuronen

Die auf Deckgläschen adhärenierten Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und anschließend zum Fixieren in 4 % Paraformaldehyd in PBS bei RT für 15-20 min inkubiert. Danach wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei RT mit 1 % BSA/PBST blockiert. Der in 1 % BSA/PBST verdünnte Primärantikörper wurde ü. N. bei 4°C auf den Zellen belassen. Zu diesem Zweck wurden 50 µl der Antikörperlösung in einer feuchten Kammer auf Parafilm getropft und das Deckgläschen mit der mit Zellen bedeckten Seite voran auf den Tropfen aufgelegt. Am nächsten Tag wurde dreimal für 5 min mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem in 1 % BSA/PBST 1:200 verdünnten Sekundärantikörper. Diese wurde für 1 h bei RT in der feuchten Kammer und unter Lichtausschluss durchgeführt. Es schlossen sich drei weitere Waschschrte über 5 min mit eiskaltem PBS an.

Abschließend wurden die Proben eingebettet, indem die Deckgläschen zunächst kurz mit ddH₂O gewaschen und gleich darauf mit Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, USA) auf Objektträger gedeckelt wurden. Zum Deckeln wurde ein Tropfen Fluoromount G

auf den Objektträger getan und das Deckgläschen mit der mit Zellen bewachsenen Seite voran auf den Tropfen aufgesetzt.

Die fertigen Präparate wurden einer eingehenden mikroskopischen Analyse unterzogen und ansonsten bei 4°C unter Lichtausschluss gelagert.

3.3.8.9 Konfokale Laser *scanning* Mikroskopie (LSM)

Alle Aufnahmen von Cerebellum-Neuronen und hippocampalen Neuronen wurden mit einem Zeiss LSM510 Argon-Krypton konfokalen Laser *scanning* Mikroskop gemacht. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 512x512 gescannt. Die Signalverstärkung und Tiefendiskriminierung wurden derart eingestellt, dass ein optimales Verhältnis von Signal zu Hintergrund vorlag.

3.3.9 Kernfraktionierung - Isolierung von Kernproteinen aus CHO-Zellen und Cerebellum-Neuronen

(Qproteome™ Nuclear Protein Handbook, Qiagen)

Die Zellen wurden einmalig mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500 µl Puffer NL abgekratzt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden je Probe 25 µl der Detergens-Lösung NP zugegeben und für 10 s mittels Vortex-Schüttler gemischt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 10000 x g und 4°C wurde der Überstand (enthält zytosolische und solubilisierte Membranproteine, Fraktion C) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt. Das Zellkern enthaltende Pellet wurde in 500 µl Puffer NL resuspendiert und für 5 s gevortext. Nach 5minütiger Zentrifugation (10000 x g, 4°C) der Zellkernsuspension und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet in 50 µl Puffer NX1 aufgenommen und für 30 min unter leichtem Schütteln (750 rpm, im Thermomixer) bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze für 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände, welche die löslichen Kernproteine enthalten (Fraktion D), bei -80°C aufbewahrt. Zur Extraktion der unlöslichen Kernproteine wurden die

übrigen Pellets in 100 µl Puffer NX2 aufgenommen und für 1 h unter leichtem Schütteln (750 rpm, im Thermomixer) bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 x g, 10 min) werden die Überstände gesammelt und bei -80°C gelagert. Sie enthalten die Fraktion der unlöslichen Kernproteine (Fraktion I).

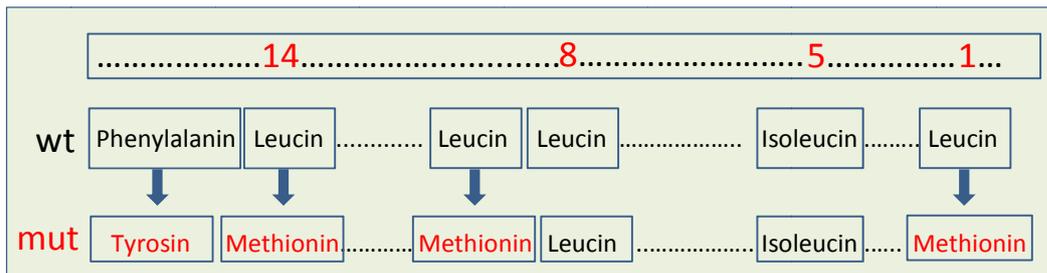


Abb. 4.2: Die Mutation des Calmodulinbindungsmotivs und der daraus resultierende Aminosäureaustausch. Die vier ausgetauschten Aminosäuren befinden sich innerhalb des putativen Calmodulinbindungsmotivs und führen zu einem konservativen Aminosäureaustausch.

Die für das Gesamt-NCAM-Protein (NCAM140 und NCAM180) codierende DNA befand sich im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3, im Gegensatz zu den intrazellulären Domänen, die in den prokaryontischen pQE30 Expressionsvektor kloniert waren. Die aufgereinigten Proteine, die nur den intrazellulären Teil von NCAM140 und NCAM180 umfassen, sollten später für Bindungsanalysen in z. B. ELISA-Experimenten eingesetzt werden. Für alle vier Plasmidkonstrukte wurde nach demselben Prinzip verfahren. Die Mutagenese-Primer wurden in einer PCR so eingesetzt, dass sie an einer überlappenden DNA Region an die Ziel-DNA anlagern können und durch einzelnen Basenaustausch die Aminosäurekodierung verändern.

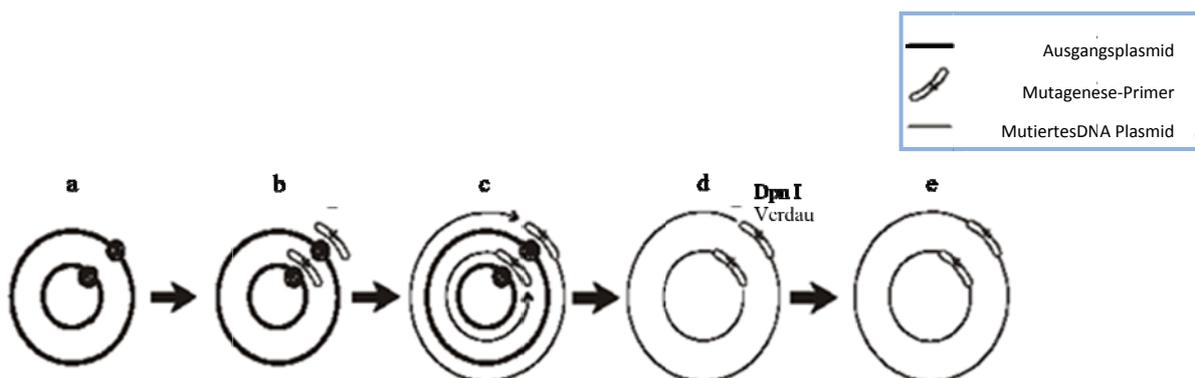


Abb. 4.3: „Site directed mutagenesis“ des Calmodulinbindungsmotivs. Im ersten Schritt (a) befindet sich die Zielsequenz im Ausgangsvektor, der durch Denaturierung (b) in Einzelstränge getrennt wird, wodurch sich die Mutagenese-Primer anheften können. Bei einer PCR (c) mit den Mutagenese-Primern werden die gewünschten Punktmutationen eingefügt und eine *nicked* DNA entsteht. (d) Methylierte, nicht mutierte Ausgangs-DNA wird durch DpnI Verdau abgebaut und die mutierte DNA wird in einen geeigneten Bakterienstamm transformiert. Das Resultat (e) ist die punktmutierte DNA ohne PCR-bedingte Lücken.

Durch Verdau mit Dpn I wurde die methylierte, nicht mutierte Ausgangs-DNA abgebaut und nachfolgend die mutierte DNA durch eine anschließende Transformation in einen geeigneten Bakterienstamm gebracht. Die nun erhaltene DNA wurde durch Sequenzierung überprüft und es konnte in allen vier Ansätzen der Einbau der Punktmutationen nachgewiesen werden. Die mutierten DNA-Sequenzen wurden dann anschließend über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NotI herausgeschnitten und mit den entsprechenden Ausgangsvektoren (Gesamt-NCAM in pcDNA3 und ICD in pQE30), welche zuvor über die EcoRI- und NotI-Schnittstellen geöffnet wurden, ligiert [s. Abb. 4.3].

4.2 Die Bedeutung der putativen invertierten „14-8-5-1“ Calmodulinbindestelle des NCAM für die Interaktion zwischen Calmodulin und NCAM

Zur Expression der intrazellulären Domänen von NCAM wurde der pQE30-Vektor verwendet [s. Anhang]. Mit Hilfe der N-terminalen Histidinmarkierung wurden die exprimierten Proteine über die Bindung an Nickel-*beads* (=Kügelchen) aus dem Lysat der Bakterien unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Die Integrität und Reinheit der exprimierten Konstrukte wurde durch Coomassiefärbung eines SDS-Polyacrylamidgels überprüft. Die intrazelluläre Domäne von NCAM180 konnte als Bande bei ca. 40kDa und die kleinere Domäne von NCAM140 bei ca. 24kDa detektiert werden. Gleiches gilt für die intrazellulären Domänen der mutierten NCAM-Isoformen, welche ein identisches Laufverhalten im SDS Gel zeigten [s. Abb. 4.4].

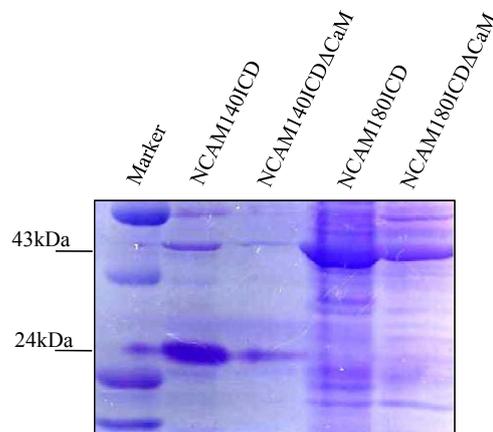


Abb. 4.4: Expression der intrazellulären Domäne von NCAM in geeignetem *E. coli*-Stamm

Zu Abb. 4.4: Expression der intrazellulären Domäne von NCAM in geeignetem *E. coli*-Stamm
Histidin-markierte Proteine der intrazellulären Domänen der zu untersuchenden Wildtyp- und mutierten NCAM-Isoformen wurden aufgereinigt und in einem Coomassie angefärbten SDS-Gel sichtbar gemacht. Die kleinere intrazelluläre Domäne von NCAM140 wurde bei 24kDa detektiert, die intrazelluläre Domäne von NCAM180 ist bei 43kDa sichtbar.

Frühere ELISA-Studien zeigten eine sowohl für die intrazelluläre Domäne von NCAM140 als auch für die intrazelluläre Domäne von NCAM180 konzentrationsabhängige Bindung an Calmodulin. Das Einfügen der Punktmutationen in die putative invertierte „14-8-5-1“ Calmodulinbindestelle innerhalb der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 soll näheren Aufschluss über die Interaktion zwischen NCAM und Calmodulin geben. Hierzu wurden ELISA-Studien durchgeführt

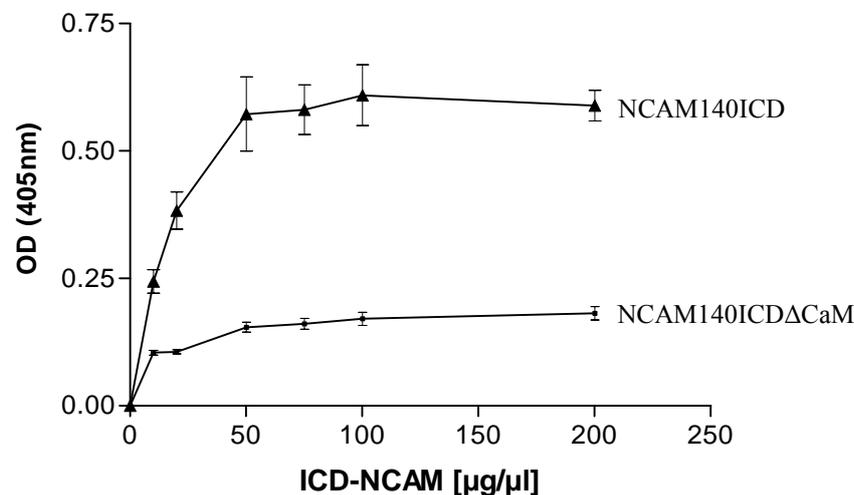


Abb. 4.5: Interaktion der intrazellulären Domänen (ICD) von NCAM140 und NCAM140ΔCaM mit Calmodulin. Mit Calmodulin in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM140ΔCaM in steigenden Konzentrationen von je 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml und 200 µg/ml inkubiert. Die Bindung von NCAM an Calmodulin wurde mit Hilfe des NCAM-Antikörpers 5B8 nachgewiesen.

Es konnte für die intrazelluläre Domäne von NCAM140 gezeigt werden, dass nach Punktmutation der potentiellen Calmodulinbindestelle die Bindung zwischen Calmodulin und NCAM140 vollständig inhibiert wird. Eine Bindung zwischen dem mutierten NCAM140 und dem Substrat Calmodulin blieb aus [s. Abb. 4.5]. Das gleiche Bild zeigt sich für die NCAM180-Isoform.

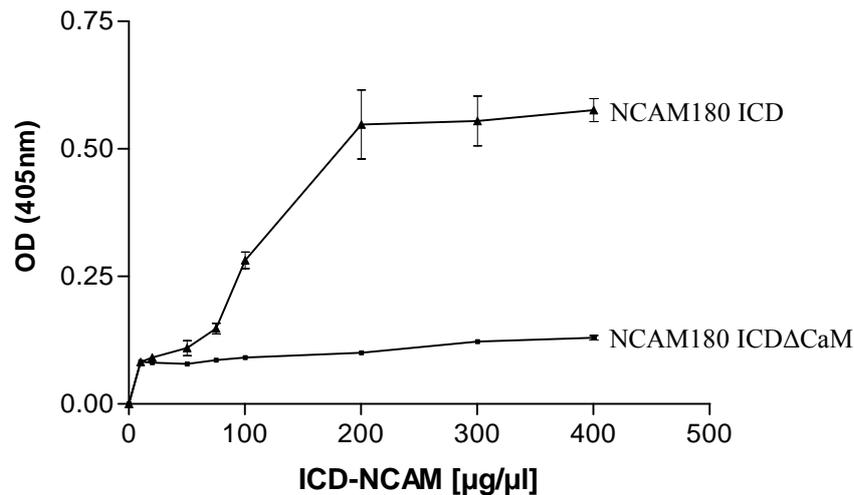


Abb. 4.6: Interaktion der intrazellulären Domänen (ICD) von NCAM180 und NCAM180 Δ CaM mit Calmodulin. Mit Calmodulin in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit den intrazellulären Domänen von NCAM180 und NCAM180 Δ CaM in steigenden Konzentrationen von je 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert. Die Bindung von NCAM an Calmodulin wurde mit Hilfe des NCAM-Antikörpers D3 nachgewiesen.

Die Abb. 4.6 zeigt, dass zwischen Calmodulin und Wildtyp-NCAM180 eine hohe Affinität gemessen werden konnte. Die Bindung zwischen der intrazellulären Domäne von NCAM180 Δ CaM und Calmodulin ist durch das mutierte Calmodulinbindungsmotiv signifikant reduziert. Diese Ergebnisse unterstützen die frühere Vermutung, dass die intrazellulären Domänen beider NCAM-Isoformen eine direkte Bindung über das invertierte „14-8-5-1“-Bindungsmotiv zwischen Calmodulin und NCAM eingehen. Durch die Mutation von NCAM140 und NCAM180 in diesem Bereich konnte eine Interaktion zwischen beiden NCAM-Isoformen und dem Kalziumsensor Calmodulin vollständig unterbunden werden.

4.3 Die Bedeutung von Kalzium für die Interaktion zwischen NCAM und Calmodulin

Die Untersuchungen zur Interaktion zwischen den intrazellulären Domänen der unterschiedlichen NCAM-Isoformen und Calmodulin im ELISA wurden alle mit einer festgelegten Kalziumkonzentration durchgeführt. Diese betrug stets 1 mM Kalzium und ist für diesen *in vitro* Versuch aus vorherigen Experimenten etabliert. Calmodulin gilt als weit verbreiteter Kalziumsensor in allen eukaryontischen Zellen und verfügt über vier Kalziumbindestellen. Die Kalziumkonzentration an lebenden Membranen unterliegt einer

hohen Schwankung, abhängig von zellulären sich ständig wechselnden Prozessen. Die unter Ruhebedingungen vorliegende Kalziumkonzentration an einer Membran beträgt ~ 100 nM und liegt damit um ein vielfaches unter der *in vitro* Bedingung des ELISA-Experiments. Um zu untersuchen, ob die Interaktion zwischen NCAM und Calmodulin auch unter „physiologischen“ Bedingungen in Bezug auf die Kalziumkonzentration nachweisbar ist, wurden ELISA-Studien mit dieser niedrigen Kalziumkonzentration durchgeführt.

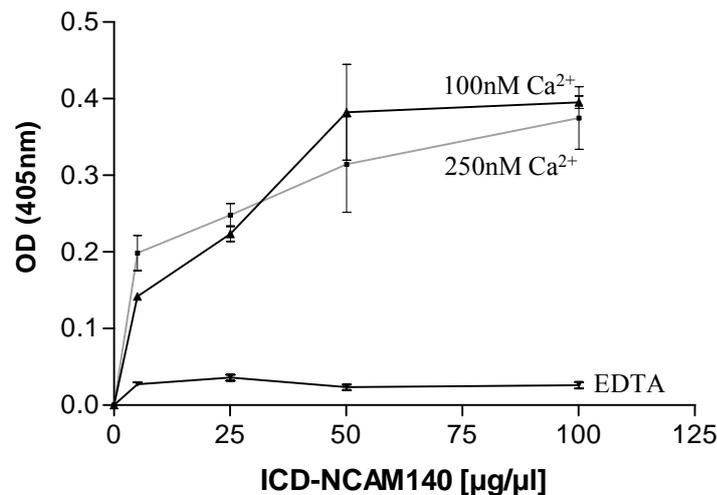


Abb. 4.7: Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne von NCAM140 und Calmodulin bei physiologisch niedriger Kalziumkonzentration. Mit Calmodulin in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit der intrazellulären Domäne von NCAM140 in steigenden Konzentrationen von je 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml in Anwesenheit von 100 nM und 250 nM Kalzium inkubiert. Die Bindung von NCAM wurde mit dem Antikörper 5B8 nachgewiesen.

In diesem Ansatz wurden sämtliche Proteine, Antikörper und Waschlösungen in der vorgegebenen Kalziumkonzentration angesetzt. Die Abb. 4.7 zeigt, dass selbst unter niedriger Kalziumkonzentration eine Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne von NCAM140 und Calmodulin nachgewiesen werden kann. Calmodulin bindet scheinbar bereits bei niedrigen Konzentrationen Kalzium und ist somit in der Lage, mit der intrazellulären Domäne von NCAM zu interagieren. Dass die Bindung kalziumabhängig ist, lässt sich durch die mit EDTA versetzten Proben veranschaulichen. Hier konnte keinerlei Bindungsaktivität nachgewiesen werden, was auch frühere Ergebnisse bestätigt.

4.4 Regulation der Prozessierung von NCAM durch Calmodulin

Der Kalziumsensor Calmodulin ist an der Regulation des *ectodomain shedding* der Transmembranproteine APP (*amyloid precursor protein*) (Diaz-Rodriguez et al., 2000), Tyrosin-Rezeptor-Kinase A (TrkA) (Diaz-Rodriguez et al., 2000; Llovera et al., 2004), L-Selektin (Kahn et al., 1998; Diaz-Rodriguez et al., 2000) oder L1 (Kalus et al., 2003) beteiligt. Calmodulin-Inhibitoren stimulieren die Freisetzung der extrazellulären Domäne dieser Moleküle (Diaz-Rodriguez et al., 2000; Kalus et al., 2003).

Auch die proteolytische Prozessierung der membranständigen Isoformen von NCAM wird durch Calmodulin beeinflusst. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Calmodulin-Inhibitor CGS 9343 B die Freisetzung des löslichen Fragmentes NCAM110 nach der Transfektion von Zellen der Zelllinie CHO mit dem Expressionskonstrukt NCAM140, stimulierte. Die Zunahme des löslichen NCAM110 in Anwesenheit des Calmodulin-Inhibitors war um das 1,5fache erhöht (Kalus et al., 2006). Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse auch durch die Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne von NCAM140 wiederholt und somit eventuelle Nebeneffekte des Inhibitors ausgeschlossen werden können, wurden CHO-Zellen mit Wildtyp-NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM transfiziert und Zellkulturüberstände analysiert. Durch die Mutation und die daraus resultierende unterbundene Interaktion von Calmodulin und NCAM lässt sich eine Zunahme des NCAM110 Fragments im Zellkulturüberstand messen. Die Freisetzung des löslichen NCAM Fragments ist um das 1,3fache erhöht, wenn Calmodulin nicht an NCAM binden kann. Damit wird das vorangegangene Experiment mit dem Calmodulin-Inhibitor CGS 9343 B bestätigt und der Einfluss, den Calmodulin auf die Prozessierung von NCAM zu haben scheint, weiter verifiziert.

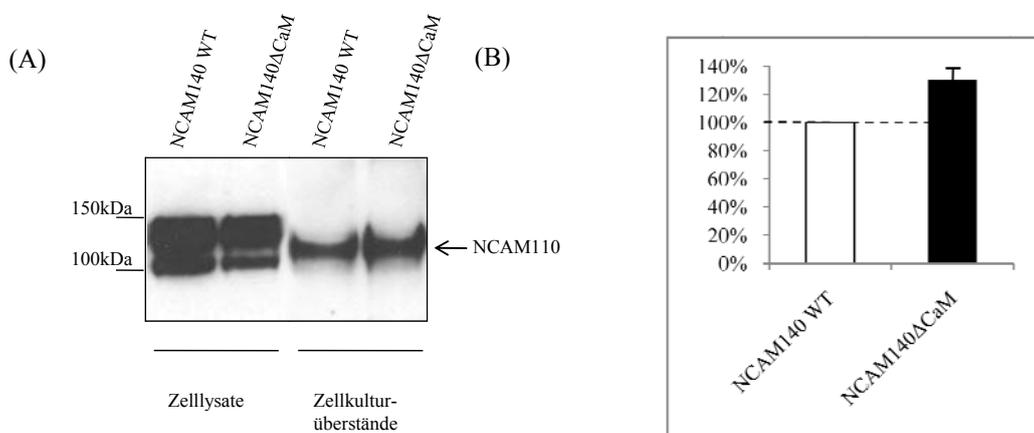


Abb. 4.8: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit NCAM140 und NCAM140 Δ CaM transfizierten CHO-Zellen.

Zu Abb. 4.8: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit NCAM140 und NCAM140 Δ CaM transfizierten CHO-Zellen. (A) Die Zellen der Zelllinie CHO wurden transient mit NCAM140 und NCAM140 Δ CaM transfiziert und anschließend wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des NCAM-Antikörpers 1 β 2 untersucht. Das Blockdiagramm in (B) zeigt die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Die Menge des Wildtyp-NCAM im Zellüberstand wurde relativ zur NCAM-Gesamtmenge auf 100 % gesetzt und die Menge des NCAM Δ CaM im Zellüberstand relativ zur Gesamtmenge darauf bezogen.

4.5 Oberflächenlokalisierung der verschiedenen NCAM-Konstrukte

Die Mutation der Calmodulinbindestelle innerhalb der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 inhibiert die Interaktion zwischen NCAM und Calmodulin. Um zu überprüfen, ob die mutierten NCAM-Isoformen in der gleichen Art und Weise wie die Wildtyp-NCAM-Isoformen an die Zelloberfläche gelangen, wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Hierfür wurden CHO-Zellen transient mit den wildtypischen und den mutierten NCAM-Isoformen transfiziert. Anschließend erfolgte die Detektion der an der Zelloberfläche lokalisierten Proteine.

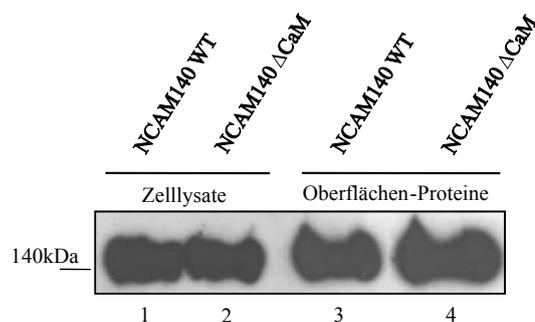


Abb. 4.9: Oberflächenlokalisierung von mutiertem NCAM140 Δ CaM. CHO-Zellen wurden mit Wildtyp-NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM transfiziert und nach 16 h biotinyliert. Durch Zugabe von Glycin wurde die Biotinylierung gestoppt, die biotinylierten Zellen lysiert und mit magnetischen Streptavidin-*beads* versetzt. Nach mehrmaligem Waschen der *beads* wurde SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proteine bei 100°C für 5 min aufgekocht. Die erhaltenen Proben wurden auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und NCAM wurde mit dem Antikörper 5B8 detektiert. In Spuren 1 und 2 wurden Zelllysate aufgetrennt, Spuren 3 und 4 zeigen die Auftrennung biotinylierter Zelloberflächenproteine.

Der *Western Blot* in der Abb. 4.9 zeigt, dass sowohl Wildtyp- als auch mutiertes NCAM140 an der Oberfläche der CHO-Zellen lokalisiert ist. Die Mutation der Calmodulinbindestelle hat damit keinen negativen Effekt auf die NCAM140-Lokalisation an der Zelloberfläche. Das gleiche sollte anschließend bei den NCAM180-Isoformen (Wildtyp und Mutante) überprüft werden.

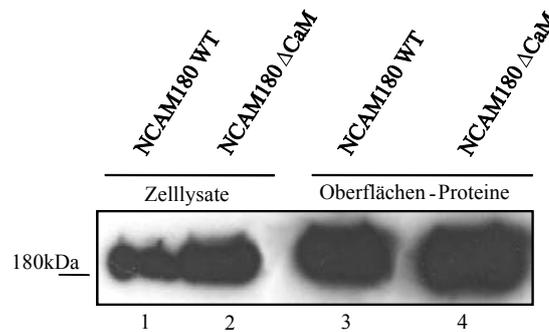


Abb. 4.10: Oberflächenlokalisierung von mutiertem NCAM180ΔCaM. CHO-Zellen wurden mit Wildtyp-NCAM180 und mutiertem NCAM180ΔCaM transfiziert und nach 16 h biotinyliert. Durch Zugabe von Glycin wurde die Biotinylierung gestoppt, die biotinylierten Zellen lysiert und mit magnetischen Streptavidin-*beads* versetzt. Nach mehrmaligem Waschen der *beads* wurde SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proteine bei 100°C für 5 min aufgekocht. Die erhaltenen Proben wurden auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und NCAM wurde mit dem Antikörper D3 detektiert. In Spuren 1 und 2 wurden Zelllysate aufgetrennt, Spuren 3 und 4 zeigen die Auftrennung biotinylierter Zelloberflächenproteine.

Die Oberflächenbiotinylierung an CHO-Zellen, welche mit Wildtyp-NCAM180 und mutiertem NCAM180ΔCaM transfiziert wurden, zeigte keine Unterschiede in der Lokalisation beider NCAM-Isoformen an der Zelloberfläche [s. Abb. 4.10]. Somit konnte auch für NCAM180 nachgewiesen werden, dass die mutierte Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne den Transport des Proteins an die Zelloberfläche nicht beeinflusst.

4.6 Bedeutung des Moleküls Calmodulin für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum

Zur Untersuchung des Effekts von Calmodulin auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum wurden in früheren Experimenten Kleinhirnexplantate der Maus in An- bzw. Abwesenheit des Calmodulin-Inhibitors CGS 9343 B kultiviert. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich das

NCAM-abhängige Neuritenwachstum inhibiert wurde (Kalus et al., 2006). Im Vergleich dazu hatte der Calmodulin-Inhibitor keinen Einfluss auf PLL- (poly-L-Lysin), Laminin- oder L1-induziertes Neuritenwachstum (Kalus et al., 2006). Hier sollte nun der Effekt der mutierten Calmodulinbindestelle der NCAM140-Isoform für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum untersucht werden. Dazu wurden hippocampale NCAM-defiziente Neurone mit Wildtyp-NCAM140 und dem mutierten NCAM140 Δ CaM transfiziert, auf NCAM und PLL im Kontrollansatz kultiviert und die Länge der Neuriten bestimmt. Das Kultivieren auf NCAM-Fc-Protein simuliert den Effekt der homophilen Bindung zwischen NCAM-Molekülen und stimuliert auf diese Weise Neuritenwachstum.

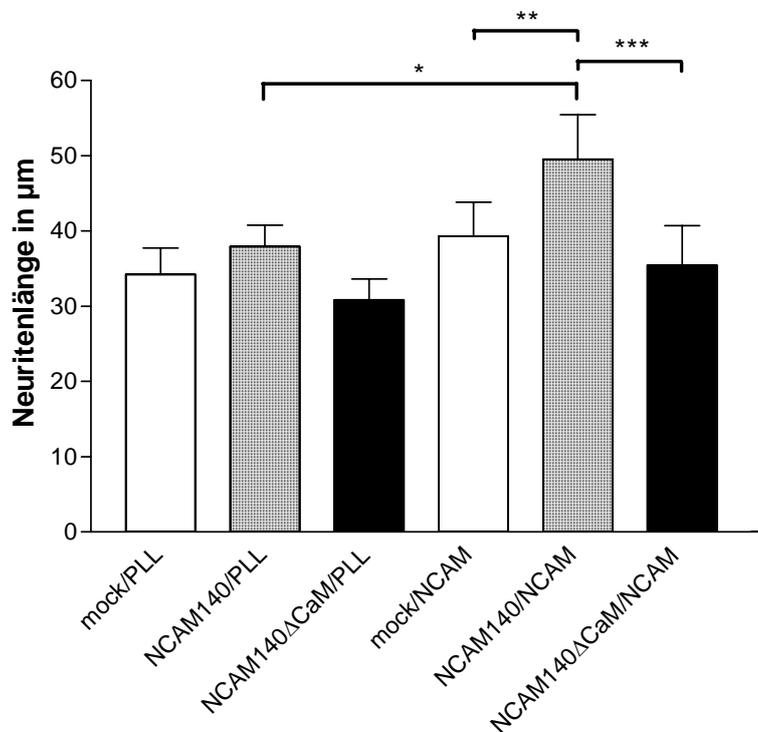


Abb. 4.11: Effekt der inhibierten NCAM-Calmodulin Interaktion auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum. Hippocampus-Zellen aus NCAM-defizienten Mäusen wurden mit dem Leervektor (mock), Wildtyp-NCAM140 und NCAM140 Δ CaM transfiziert und auf PLL oder auf einer Kombination aus PLL- und NCAM-Beschichtung kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Neuritenlängen am Mikroskop ausgewertet. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

Die Auswertung zeigt, dass das NCAM-abhängige Neuritenwachstum durch die ausbleibende Interaktion zwischen NCAM140 und Calmodulin signifikant reduziert wurde [s. Abb. 4.11]. Zellen, die mit Wildtyp-CAM140 transfiziert wurden, zeigen eine signifikante Zunahme in den Neuritenlängen, wenn sie auf stimulierendem NCAM-Fc kultiviert werden. Das

Wachstum der Neuriten auf PLL zeigt keine Unterschiede zwischen den drei Ansätzen und dient als Kontrolle für den Effekt der homophilen Bindung von NCAM auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum. Zellen, welche lediglich mit dem Leervektor transfiziert wurden, zeigten auch auf NCAM-Fc keinen stimulationsabhängigen Effekt. Erstaunlich ist, dass die Neuritenlängen der mit mutiertem NCAM140 Δ CaM transfizierten Zellen auf NCAM-Fc unterhalb des Kontrollansatzes [siehe Balken mock/NCAM, Abb. 4.11] liegen. Dies zeigt, dass Calmodulin einen deutlichen Effekt auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum hat.

4.7 Oberflächenlokalisierung von NCAM140 und NCAM140 Δ CaM in NCAM-defizienten Hippocampus-Neuronen

An NCAM-defizienten hippocampalen Neuronen, welche aus ein Tag alten Mäusen präpariert wurden, sollte die Oberflächenexpression der Wildtyp-NCAM140-Isoform und der mutierten NCAM140 Δ CaM-Isoform untersucht werden. Für das Experiment wurde eine Lebendzellfärbung mit NCAM-spezifischem Antikörper durchgeführt, um ein *clustering* (=Zusammenlagerung) von NCAM an der Zelloberfläche zu erzielen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Vektor pcDNA3, welcher kein NCAM-Konstrukt trägt, transfiziert und gefärbt.

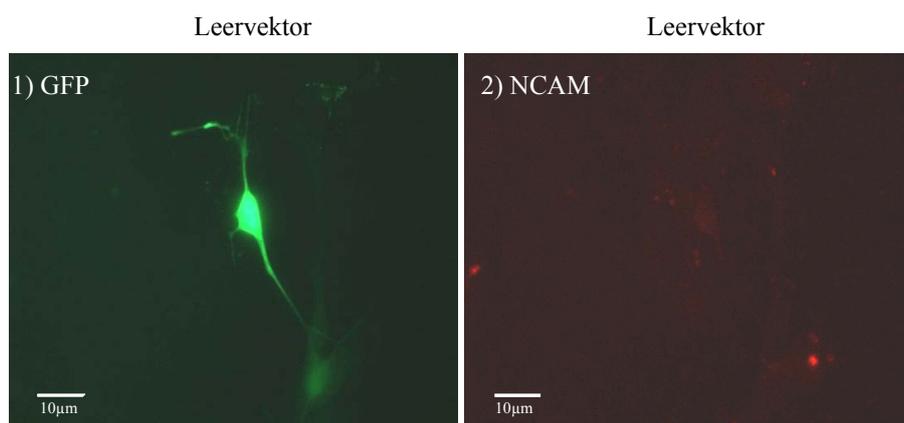


Abb. 4.12: Lebendzellfärbung an hippocampalen NCAM-defizienten Zellen. Mit dem Leervektor (pcDNA3) und dem GFP-exprimierenden Vektor co-transfizierte, NCAM-defiziente Hippocampus-Neurone wurden auf NCAM-Fc beschichteten Deckgläsern für 24 h ausgesät und anschließend für 20 min bei 37°C mit NCAM-Antikörper inkubiert. Nach Fixierung erfolgte die Applikation des Zweitantikörpers. Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe der GFP-Expression detektiert.

Die Abb. 4.12 zeigt eine hippocampale Zelle, welche mit dem Leervektor pcDNA3 und einem GFP-exprimierenden Vektor (*green fluorescent protein*) als Markerprotein co-transfiziert wurde, was durch die deutliche, grüne Färbung zu sehen ist [s. Abb. 4.12, Bild 1]. Da NCAM-defiziente Mausneurone eingesetzt wurden, zeigt das NCAM-labelling (=Markierung) [s. Abb. 4.12, Bild 2] kein Anfärben der Zelle. Zudem ist auffällig, dass diese Zellen nur über kurze Neuriten verfügen. Die mit dem Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen zeigen nach Inkubation mit dem NCAM-spezifischen Antikörper eine deutliche Anfärbung der Zellen, welche in Abb. 4.13, Bild 2 zu sehen ist.

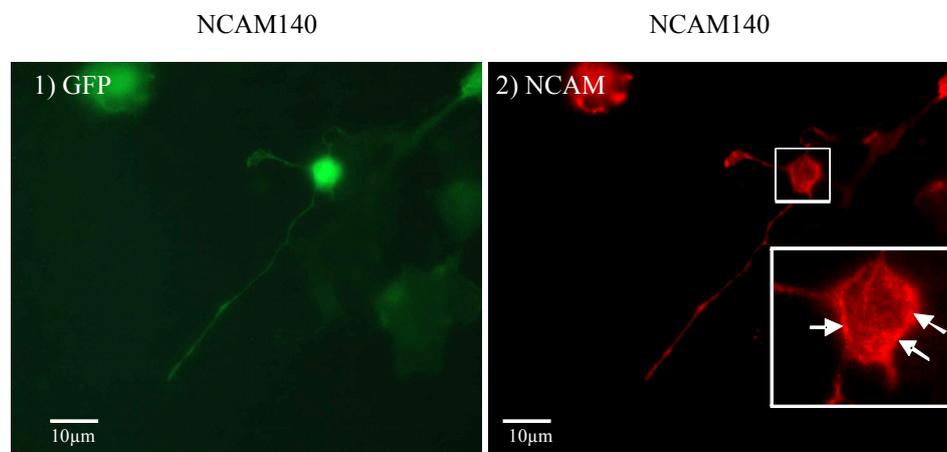


Abb. 4.13: Lebendzellfärbung an hippocampalen NCAM-defizienten Zellen. Mit Wildtyp-NCAM140 und dem GFP-exprimierenden Vektor co-transfizierte, NCAM-defiziente Hippocampus-Neurone wurden auf NCAM-Fc beschichteten Deckgläschen für 24 h ausgesät und anschließend für 20 min bei 37°C mit NCAM-Antikörper inkubiert. Nach Fixierung erfolgte die Applikation des Zweitantikörpers. Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe der GFP-Expression detektiert. Die Pfeile zeigen eine Akkumulation von NCAM an der Zelloberfläche.

Die Abbildung zeigt eine Zelle mit einem langen Neuriten, wobei über die gesamte Zelle verteilt eine Expression von NCAM zu sehen ist. In der Vergrößerung zeigt sich, dass die Zellkörper eine Akkumulation von NCAM an der Oberfläche aufweisen, welche durch die weißen Pfeile angezeigt wird. Die Neurone zeigen bezüglich der Morphologie der Zelle sowie der Expressionsverteilung von NCAM im Soma und entlang der Neuriten keine Unterschiede zu NCAM-Wildtyp-Neuronen (Daten nicht gezeigt).

Die Zellen, die mit dem mutierten NCAM140 Δ CaM transfiziert wurden, zeigen in Abb. 4.14 ebenfalls eine Oberflächenlokalisierung von NCAM. Damit kann gezeigt werden, dass die Expression von NCAM140 an der Zelloberfläche durch die veränderte Calmodulinbindestelle nicht inhibiert wird. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die physiologische Aktivität der mutierten NCAM-Isoform dar. Mit diesem Ergebnis lässt sich ausschließen, dass das

NCAM-abhängige, reduzierte Neuritenwachstum im Pkt. 4.6 auf eine reduzierte NCAM-Expression an der Zelloberfläche zurückzuführen ist. Hätte die Lebendzellfärbung eine veränderte Oberflächenlokalisierung in den mit dem mutierten NCAM transfizierten Zellen gezeigt, könnte man die beobachteten negativen Effekte auf einen gestörten Transport von NCAM zur Plasmamembran zurückführen. Das reduzierte Neuritenwachstum wäre dann das Ergebnis einer reduzierten NCAM-Lokalisation und somit reduzierten homophilen Bindungsaktivität an der Zelloberfläche. Dieses Ergebnis bestätigt diejenigen aus der Oberflächenbiotinylierung [s. Pkt. 4.5], welche bereits gezeigt haben, dass die mutierte NCAM140-Isoform in gleichem Maße wie das Wildtyp-NCAM140 an die Oberfläche transportiert wird.

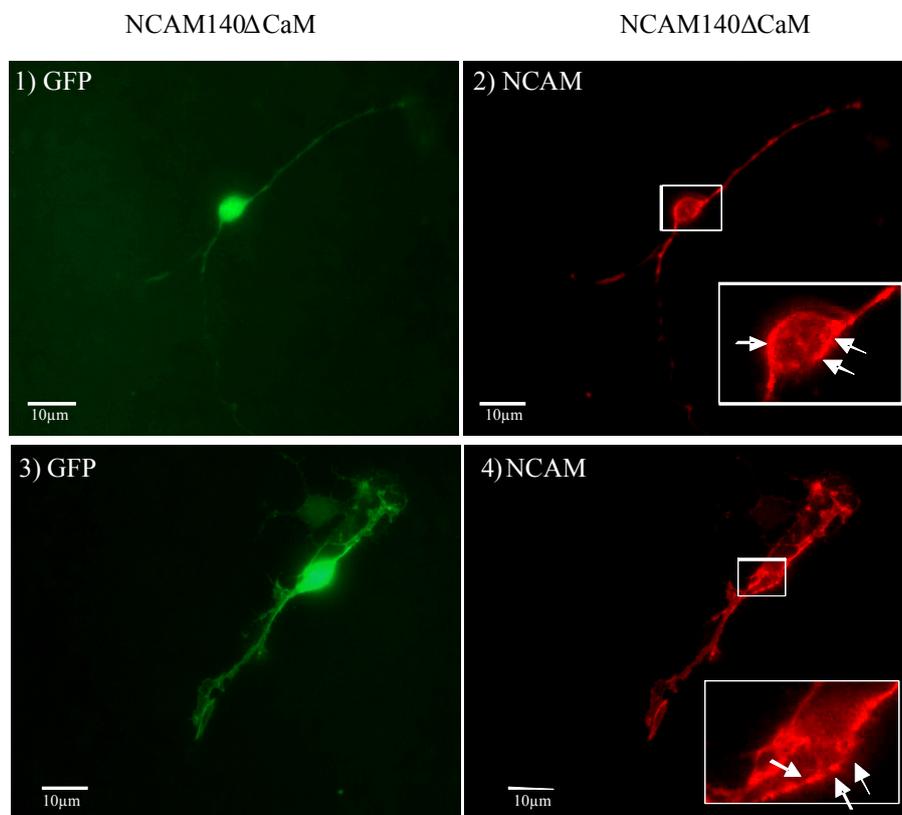


Abb. 4.14: Lebendzellfärbung an hippocampalen NCAM-defizienten Zellen. Mit mutiertem NCAM140 Δ CaM und den GFP-exprimierenden Vektor co-transfizierte, NCAM-defiziente Hippocampus-Neurone wurden auf NCAM-Fc beschichteten Deckgläschen für 24 h ausgesät und anschließend für 20 min bei 37°C mit NCAM-Antikörper inkubiert. Nach Fixierung erfolgte die Applikation des Zweitantikörpers. Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe der GFP-Expression detektiert.

4.8 Die Mutation der Calmodulinbindestelle führt zu einer veränderten Zellmorphologie von Hippocampus-Neuronen

Bei der Untersuchung der mit dem mutierten NCAM140 Δ CaM transfizierten hippocampalen NCAM-defizienten Zellen fiel neben der normalen NCAM-Oberflächenexpression eine veränderte Morphologie einer Vielzahl dieser Zellen auf. Die Fortsätze der Zellen wiesen dornartige Verlängerungen und Auswüchse auf [s. Abb. 4.15, Bild 1 bis 6]. Teilweise konnte auch beobachtet werden, dass kurze und lange Fortsätze direkt vom Zellkörper selbst abgingen und ungewöhnliche Verzweigungen bildeten [s. Abb. 4.15, Bild 6]. Entlang mancher Neuriten konnte ebenso eine punktuelle Akkumulation an NCAM beobachtet werden [s. Abb. 4.15, Bild 6]. Eventuell führt die Mutation hier zu einem *clustering* (=Zusammenlagerung) von NCAM in den Neuriten und an der Zelloberfläche [s. Abb. 4.15, Bild 4]. Die NCAM-Verteilung an der Oberfläche und in den Neuriten der mit dem Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen sah im Vergleich einheitlicher aus.

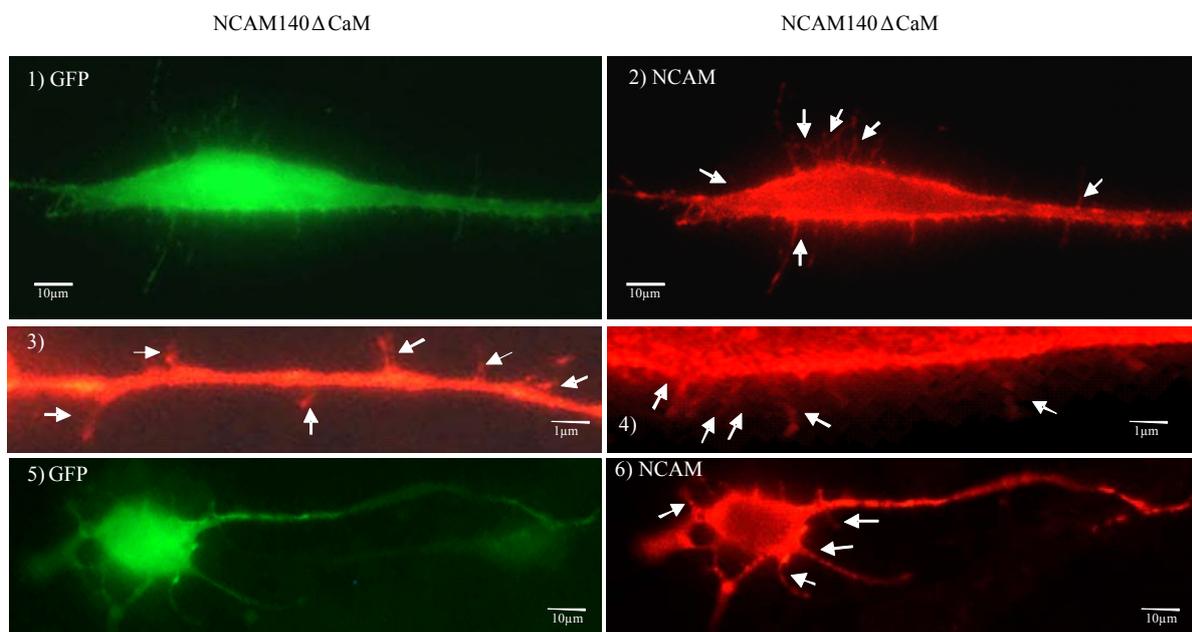


Abb. 4.15: Lebendzellfärbung an hippocampalen NCAM-defizienten Zellen. Mit mutiertem NCAM140 Δ CaM und dem GFP-exprimierenden Vektor co-transfizierten, NCAM-defizienten Hippocampus-Neurone wurden auf NCAM-Fc beschichteten Deckgläschen für 24 h ausgesät und anschließend für 20 min bei 37°C mit NCAM Antikörper inkubiert. Nach Fixierung erfolgte die Applikation des Zweitantikörpers. Transfizierten Zellen wurden mit Hilfe der GFP-Expression detektiert. Anormale Strukturen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Bild 3 zeigt ungewöhnliche Verzweigungen von einem Neurit abgehend und in 2, 4 und 6 von einem Neurit und vom Zellkörper abgehende Verzweigungen.

4.9 Der Einfluss der mutierten Calmodulinbindestelle auf die *lipid raft*-Lokalisation von NCAM140

Die Palmitoylierung von NCAM ist notwendig für die Rekrutierung des NCAMs in *lipid rafts* und daraus resultierend erforderlich für die Aktivierung des Nicht-Rezeptortyrosin-Signalwegs (Niethammer et al., 2002). Die Fraktionierung von Hirnhomogenat aus neonatalen Mäusen zeigte, dass alle drei NCAM-Isoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180 in *lipid rafts* nachzuweisen sind. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass nur die Isoform NCAM140 als homophiler Rezeptor in Hippocampus-Neuronen das Neuritenwachstum beeinflussen kann. Die Störung der NCAM140-Lokalisation in *lipid rafts* durch Mutation der NCAM140-Palmitoylierungsstellen oder Störung der *lipid rafts*-Formierung unterbindet das Neuritenwachstum vollständig (Niethammer et. al., 2002). Als Palmitoylierungsstellen fungieren vier Cysteinreste in der intrazellulären Domäne von NCAM140, die der Transmembrandomäne benachbart sind. Der Austausch der Cysteine durch Serine unterbindet die *lipid raft*-Lokalisation von Proteinen (Kabouridis et. al., 1997; Zhang et. al., 1998).

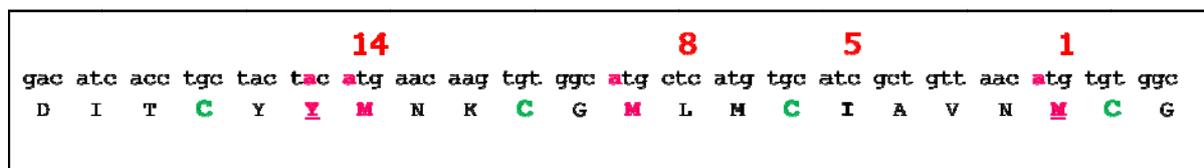


Abb. 4.16: Intrazelluläre Domäne von NCAM im Bereich des Calmodulinbindungsmotivs. Die Abbildung zeigt in roten Buchstaben die Punktmutationen innerhalb des Calmodulinbindungsmotivs, welche mit den vier Cysteinen (grün gekennzeichnet) überlappen, die für die Palmitoylierung von NCAM essentiell sind.

Die in dieser Arbeit eingefügten Mutationen in der Calmodulinbindestelle des NCAMs überlappen mit den bekannten Palmitoylierungsstellen [s. Abb. 4.16] und führen so zu der Frage, ob die Mutation auch zu einer Störung oder Inhibition der NCAM140-Lokalisierung in *lipid rafts* führt. Es könnte möglich sein, dass an diesem „hot spot“ der intrazellulären NCAM-Domäne bestimmte Moleküle erst binden, wenn eine Konformationsänderung an der Bindestelle erfolgt. Denkbar ist auch, dass eine Bindung von Calmodulin die proteolytische Prozessierung von NCAM ermöglicht, welche notwendig für das Neuritenwachstum ist (Kalus et al., 2006). Zur Untersuchung der Verteilung des mutierten NCAM140 Δ CaM in *lipid rafts* mussten zunächst stabil transfizierte CHO-Zellen hergestellt werden, da für die Gewinnung von *lipid rafts* eine sehr große Menge an Zellmaterial benötigt wird. CHO-Zellen wurden daher mit Wildtyp-NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM transfiziert und

erhaltene Klone auf den Einbau des transfizierten Konstrukts überprüft. Nachdem einige Klone ausgesucht wurden, welche die unterschiedlichen NCAM-DNA-Fragmente in das zelleigene Genom eingebaut hatten, wurden die Zellen kultiviert und aufgearbeitet. Durch Behandlung mit dem Detergens Triton X-100 wurden *lipid raft*-Fraktionen von NCAM140 und NCAM140 Δ CaM isoliert und im *Western Blot* mit polyklonalem NCAM-Antikörper 1 β 2 detektiert [s. Abb. 4.17 A in den Spuren 1 und 3]. Als Referenzprobe wurden Lysate der aufgearbeiteten Zellen eingesetzt [s. Abb. 4.17 A in den Spuren 2 und 4]. Hierauf wurden die *lipid raft*-Proben bei der densitometrischen Auswertung normiert [s. Abb. 4.17 B].

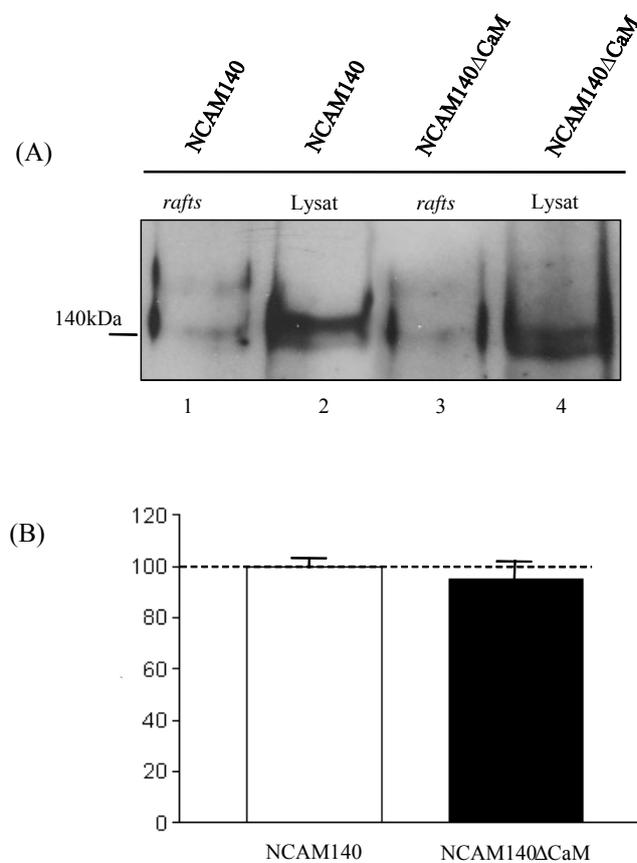


Abb. 4.17: Lipid rafts-Fraktionierung aus CHO-Zellen. Mit Wildtyp-NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM stabil transfizierte CHO-Zellen wurden kultiviert und *lipid rafts* isoliert. Gleiche Proteinmengen (20 μ g) wurden im SDS-Gel aufgetragen und im *Western Blot* mit extrazellulärem NCAM Antikörper (1 β 2) in *lipid rafts* angereichertes NCAM detektiert. Die Spuren 1 und 3 in (A) zeigen *lipid rafts*-Fraktionen, die Spuren 2 und 4 in NCAM-Gesamtprotein zur Kontrolle. Das Blockdiagramm in (B) zeigt die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Die Menge des Wildtyp-NCAM in *lipid rafts* wurde relativ zur NCAM-Gesamtmenge auf 100 % gesetzt und die Menge des NCAM Δ CaM in *lipid rafts* relativ zur Gesamtmenge darauf bezogen.

Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied in der *lipid raft*-Lokalisation von NCAM zwischen dem Wildtyp-NCAM140 und dem mutierten NCAM140 Δ CaM messbar war. Die Veränderung der Calmodulinbindestelle im zytoplasmatischen Teil von NCAM140 inhibiert nicht die Lokalisierung von NCAM in *lipid rafts*. Diese scheint daher nicht Calmodulin-abhängig zu sein, noch scheinen die vier Punktmutationen die Palmitoylierung der Cysteine in der intrazellulären Domäne von NCAM140 zu beeinflussen. Es lässt sich festhalten, dass das Ergebnis des Neuritenwachstumsexperiments nicht auf eine verringerte Rekrutierung der mutierten NCAM140 Δ CaM in *lipid rafts* zurückzuführen ist.

4.10 Der Einfluss der mutierten Calmodulinbindestelle auf die Palmitoylierung von NCAM140

Für den Transfer von NCAM in *lipid rafts* ist die Palmitoylierung an den vier Cysteinresten in der intrazellulären Domäne von NCAM notwendig, wie Niethammer et al. zeigen konnten. Die Störung der NCAM140-Lokalisation in *lipid rafts* durch Mutation der NCAM140 Palmitoylierungsstellen unterbindet das Neuritenwachstum vollständig (Niethammer et al., 2002). In dieser Arbeit konnte [s. Pkt. 4.9] gezeigt werden, dass die Rekrutierung in *lipid rafts* durch die Mutation der Calmodulinbindestelle im NCAM nicht beeinflusst und der Transport des mutierten NCAM140 Δ CaM an die Zelloberfläche nicht inhibiert wird [s. Pkte. 4.5 und 4.7]. Dennoch wurde NCAM-abhängiges Neuritenwachstum signifikant reduziert. Um zu untersuchen, ob die Mutation einen Einfluss auf die Palmitoylierung von NCAM hat, wurden stabil mit NCAM140 und NCAM140 Δ CaM transfizierte CHO-Zellen mit 3 [H]-Palmitinsäure radioaktiv markiert. Anschließend wurde NCAM aus dem Zelllysats mit einem polyklonalen NCAM-Antikörper (1 β 2) immunpräzipitiert und die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und darauf folgender Fluorographie unterzogen. Um den NCAM-Expressionspegel der stabil transfizierten Zellen zu bestimmen, wurden Proben des Zelllysats per *Western Blot* unter Zuhilfenahme eines monoklonalen NCAM-Antikörpers detektiert. Die Analyse im *Western Blot* zeigte, dass der NCAM-Expressionslevel des mutierten NCAM140 Δ CaM niedriger war, als der des Wildtyp-NCAM140. Im Vergleich dazu zeigte sich, dass auch weniger palmitoyliertes NCAM in den mit NCAM140 Δ CaM transfizierten Zellen präzipitiert werden konnte. Deutlich mehr palmitoyliertes NCAM konnte aus den Zellen präzipitiert werden, welche mit Wildtyp-NCAM140 transfiziert wurden.

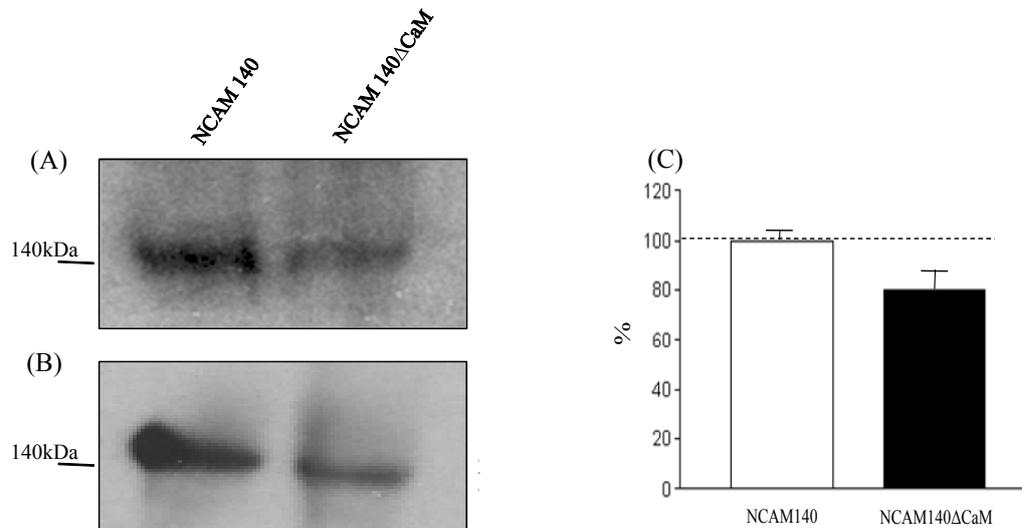


Abb. 4.18: Untersuchung der Palmitoylierung von NCAM140. Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden mit $^3\text{[H]}$ -Palmitinsäure radioaktiv markiert, die Zellysate mit polyklonalem NCAM-Antikörper (1 β 2) immunpräzipitiert und die Präzipitate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (A) zeigt eine Fluorographie der Proben, welche bei -80°C für mindestens 8 Wochen mit einem geeigneten Film (Amersham MP) lagerten. In (B) wurde NCAM im Zellysate durch *Western Blot* mit NCAM-Antikörper (5B8) nachgewiesen und zur densitometrischen Auswertung dreier unabhängiger Experimente in (C) herangezogen.

Die Mutation der Calmodulinbindestelle interferiert nicht mit den Palmitoylierungsstellen des NCAM, wie man anhand der Abb. 4.18 sehen kann. Die densitometrische Auswertung zeigt einen nicht signifikanten Unterschied an. Demzufolge ist das durch Mutation des Calmodulinbindungsmotivs reduzierte NCAM-abhängige Neuritenwachstum der Hippocampus-Neurone nicht auf eine reduzierte Anwesenheit von NCAM in *lipid rafts* oder inhibierte Palmitoylierung von NCAM140 zurückzuführen.

4.11 Untersuchung der NCAM-Phosphorylierung in Bezug auf die mutierte Calmodulinbindestelle

Betrachtet man die funktionelle Vielfältigkeit der intrazellulären Domäne von NCAM, so fallen neben des hier beschriebenen Calmodulinbindungsmotivs auch die hier untersuchten Cysteinreste auf, welche für die *lipid raft*-Lokalisation notwendig sind (Niethammer et. al., 2002). Interessanterweise findet sich auch ein membrannahes Tyrosin, welches eine der vielen Phosphorylierungsstellen von NCAM darstellt.

			14		
WT	tac	ttc	ctg	aac	
	Y	F	L	N	
mut	tac	tac	atg	aac	
	Y	<u>Y</u>	M	N	

Abb. 4.19 : Transmembrannaher Bereich der intrazellulären NCAM-Domäne. In der oberen Reihe ist die Wildtyp-Sequenz und in der unteren die mit ‚mut‘ gekennzeichnete mutierte NCAM-Sequenz. Am in grün markierten Tyrosin kann NCAM phosphoryliert werden. Die eingefügten Mutationen in der Calmodulinbindestelle in roten Buchstaben befinden sich in unmittelbarer Nähe der Wildtyp-Phosphorylierungsstelle.

Bei Untersuchungen der Interaktion von NCAM mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase TrkB stellte sich heraus, dass dieses Tyrosin essentiell für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum ist (Cassens, Dissertation 2008). Es zeigte sich bei Experimenten mit NCAM140-Tyrosin-Austauschmutanten (Phenylalanin ersetzte Tyrosin), dass die NCAM-Phosphorylierung hierdurch inhibiert wurde. Weiterhin stellte sich heraus, dass die TrkB-abhängige NCAM-Phosphorylierung erhöht bzw. abhängig von der Stimulation durch BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) ist (Cassens, Dissertation, 2008). Mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimente sollte überprüft werden, ob die TrkB-vermittelte NCAM-Phosphorylierung durch die Mutation der Tyrosin-nahen Calmodulinbindestelle beeinflusst wird. In An- und Abwesenheit von BDNF nach Co-Transfektion von CHO-Zellen mit Wildtyp-NCAM140 oder mutiertem NCAM140 Δ CaM und TrkB wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Tyrosinphosphorylierte Proteine wurden durch an Agarose-*beads* immobilisierten Phosphotyrosin-Antikörper präzipitiert und im *Western Blot* durch einen monoklonalen NCAM-Antikörper nachgewiesen.

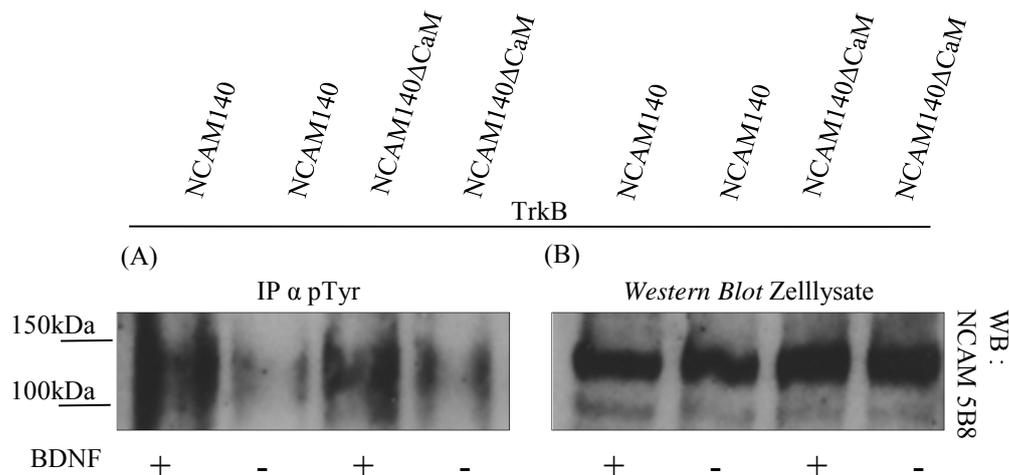


Abb. 4.20: Phosphorylierung von NCAM durch Co-Transfektion von TrkB und nach BDNF-Stimulation. CHO-Zellen wurden transient mit NCAM140 oder NCAM140ΔCaM und TrkB co-transfiziert. Transfizierte Zellen wurden nach 24 h und einer 20minütigen Behandlung mit 100ng/ml BDNF (Kontrolle ohne BDNF) lysiert. Lysate wurden mit an Agarose-beads gekoppeltem Phosphotyrosin-Antikörper präzipitiert, (A) die Präzipitate anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit monoklonalem NCAM Antikörper 5B8 nachgewiesen. In (B) wurden Proben der Zellysate zur Kontrolle der Expressionslevel aufgetragen und NCAM mit dem Antikörper 5B8 nachgewiesen.

Der *Western Blot* in der Abb. 4.20 zeigt, dass sich NCAM140 nur nach BDNF-Stimulation mit dem Phosphotyrosin-Antikörper präzipitieren lies. Die Co-Transfektion von TrkB ist allerdings notwendig für die Tyrosin-Phosphorylierung von NCAM, wie bereits gezeigt wurde (Cassens, Dissertation 2008). Ohne BDNF lässt sich nur ein schwaches Signal detektieren. Interessanterweise scheint die Mutation der Calmodulinbindestelle keinen Einfluss auf die NCAM-Phosphorylierung am Tyrosin zu haben, denn auch hier lässt sich NCAM nach BDNF-Stimulation präzipitieren, wohingegen in Abwesenheit von BDNF kaum eine Bande nachzuweisen ist. Es sind für Wildtyp-NCAM140 und der Mutante fast gleich Mengen an Tyrosin-phosphoryliertem NCAM nachweisbar. Die Mutation hätte bewirken können, dass die Phosphorylierung inhibiert wird oder eventuell NCAM stärker phosphoryliert wird, denn durch eine der ausgetauschten Aminosäuren wurde ein zusätzliches Tyrosin in die intrazelluläre Domäne eingefügt und somit eine zusätzliche, mögliche Phosphorylierungsstelle geschaffen.

4.12 Untersuchung der Fyn-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der mutierten Calmodulinbindestelle von NCAM

Eine der Signalkaskaden, durch die NCAM Neuritenwachstum anregen und Signale weiterleiten kann, stellt der über Fyn-Rekrutierung zum NCAM140-RPTP α -Komplex in *lipid rafts* eingeleitete Weg dar. An Fyn-defizienten Neuronen wurde beobachtet, dass das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in diesen Zellen inhibiert ist (Beggs et al., 1994). Später konnte eine Interaktion zwischen NCAM140 und Fyn, nicht aber zwischen NCAM180 und Fyn durch Co-Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Beggs et al., 1997).

Fyn gehört zu und teilt alle Merkmale der Src-Protein-Kinase-Familie. Studien zu Src, einer nicht Rezeptortyrosin-Kinase, existieren bereits seit 1911 (Martin, 2001). Es gibt 11 Mitglieder der Src-Familie im Menschen: blk, brk, fgr, frk, Fyn, hck, lyn, src, srm und yes (Manning et al., 2002), wobei alle ca. 52-62kDa groß sind und aus sechs unterschiedlichen funktionellen Teilen zusammengesetzt sind (Brown und Cooper, 1996). Obwohl Src-Kinasen ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression von Src und Fyn im Gehirn, in Osteoklasten und in Thrombozyten 5-200 Mal höher als in allen anderen Zelltypen (Brown und Cooper, 1996). Interessant ist die Tatsache, dass NCAM-abhängiges Neuritenwachstum in Fyn-defizienten Zellen inhibiert ist, wohingegen das Fehlen von Src oder yes keinen Einfluss hierauf hat. Dies zeigte, dass Fyn eine essentielle Komponente im NCAM-Signalweg von Neuronen darstellt, wobei in Neuronen lediglich Fyn, aber nicht Src mit NCAM140 co-immunpräzipitiert werden konnte und mit NCAM120 und NCAM180 nicht (Beggs et al., 1997). Später stellte sich heraus, dass NCAM und Fyn keine direkte Bindung eingehen, sondern erst RPTP α die Interaktion vermittelt (Bodrikov et al., 2005). Das *clustering* (= Zusammenlagerung) von NCAM führt zu einer Umverteilung von NCAM hin zu *lipid raft*-Domänen, wobei dies ein palmitoylierungsabhängiger Vorgang ist (Niethammer et al., 2002). Unterliegt die Zelle keiner Stimulation, ist NCAM nur in sehr geringem Maße in *lipid rafts* detektierbar. Fyn hingegen ist hauptsächlich mit *lipid rafts* assoziiert (van't Hof and Resh, 1997; Niethammer et al., 2002; Filip et al., 2003). NCAM co-lokalisiert nicht nur mit Fyn in *lipid rafts* (He und Meiri, 2002). Das Blocken der *lipid rafts*-Rekrutierung von NCAM (sei es durch Mutation der Palmitoylierungsstellen oder durch Zerstörung der *lipid rafts*) verhindert den über Fyn vermittelten Signalweg und resultiert in inhibiertem Neuritenwachstum (Niethammer et al., 2002).

Die Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne von NCAM140 führte zu deutlich reduziertem Neuritenwachstum [s. Pkt. 4.6]. Jedoch ist dies weder auf eine herabgesetzte *lipid raft*-Lokalisierung noch auf eine verminderte NCAM-Phosphorylierung zurückzuführen, wie in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte. Die Vermutung lag nahe, dass möglicherweise durch die Mutation der Calmodulinbindestelle ein Vorgang weiter *downstream* (=abwärts, nachfolgend) beeinflusst sein könnte. Es sollte daher mittels Co-Immunpräzipitation untersucht werden, ob trotz Mutation NCAM und Fyn weiterhin interagieren. Dafür wurden CHO-Zellen transient mit den NCAM-Konstrukten NCAM140 und NCAM140 Δ CaM transfiziert, mit einem polyklonalen NCAM-Antikörper stimuliert und Zelllysate gesammelt. Die Proteine wurden mit Hilfe eines Fyn-Antikörpers präzipitiert und im *Western Blot* detektiert. Am Tyr527 dephosphoryliertes und damit aktives Fyn wurde mit entsprechendem Antikörper nachgewiesen. Zum Abgleich der Proteinmenge wurde ein gegen Gesamt-Fyn gerichteter Antikörper eingesetzt.

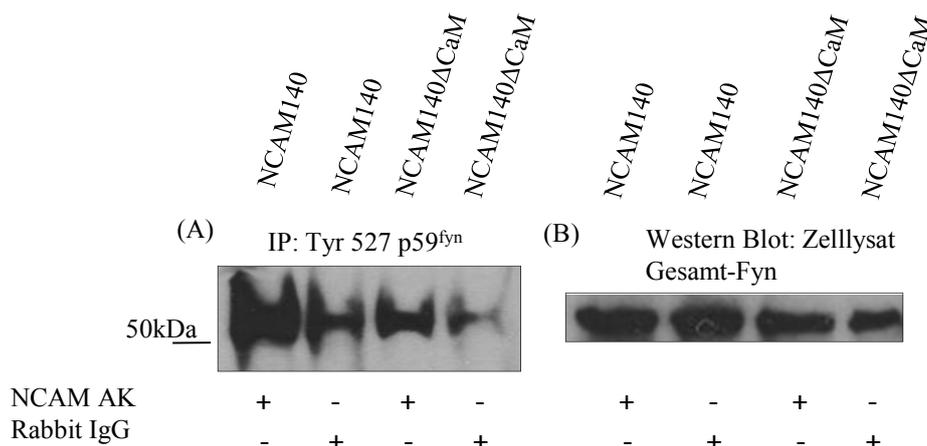


Abb. 4.21: Assoziation von NCAM140 mit aktiviertem Fyn. CHO-Zellen wurden transient mit NCAM140 oder NCAM140 Δ CaM transfiziert und nach 24 h und durch NCAM-Antikörper Zugabe 20 min stimuliert und anschließend lysiert. Lysate wurden mit einem monoklonalen Fyn-Antikörper präzipitiert, (A) die Präzipitate anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und aktiviertes Fyn wurde im *Western Blot* durch polyklonalen Fyn-Antikörper nachgewiesen. In (B) wurden Proben der Zelllysate zur Kontrolle der Expressionslevel aufgetragen und mit gegen Gesamt-Fyn gerichtetem Antikörper detektiert.

Die Untersuchung der Co-Immunpräzipitation im *Western Blot* zeigt in Abb. 4.21 A, dass die Mutation der Calmodulinbindestelle die Assoziation von NCAM140 und aktiviertem Fyn nicht unterbindet. Die NCAM-Antikörper-Stimulation scheint einen Einfluss auf die Phosphorylierung von Fyn zu haben, da sich in den mit Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen nach Stimulation eine im Gegensatz zu den anderen Proben dominanter Fyn-Bande

bei ca. 60kDa nachweisen lies. Es zeigt sich anhand dieses Versuchs, dass das inhibierte Neuritenwachstum nicht auf einer fehlenden Interaktion zwischen Fyn und NCAM beruht. Es lässt sich weiterhin ausschließen, dass die direkte Interaktion zwischen NCAM140 und RPTP α gestört sein könnte, da sonst Fyn nicht hätte präzipitiert werden können. Bekanntermaßen vermittelt RPTP α die Interaktion zwischen NCAM140 und Fyn (Bodrikov et al., 2005). Dass Fyn in allen Ansätzen in gleichen Mengen vorhanden war, zeigt die Abb. 4.21 in B, bei der Gesamt-Fyn-Protein im *Western Blot* nachgewiesen wurde. Dies zeigt auch, dass die Fyn-Menge nicht abhängig von der NCAM-Stimulation ist. Dass aber die Stimulation durch den NCAM-Antikörper einen Effekt auf die Aktivierung von Fyn hat, könnte auf einen *downstream* folgenden Prozess zurückzuführen sein. Wenn NCAM und Fyn in einem Komplex mit RPTP α vorliegen, schließt sich FAK diesem Komplex an und dieser Prozess führt wiederum zu einer erhöhten Phosphorylierung der Kinasen Fyn und FAK (Beggs et al., 1997).

4.13 Die fokale Adhäsionskinase FAK, Calmodulin und NCAM

Der Kalziumsensor Calmodulin kann eine große Anzahl an Proteinen und Kinasen aktivieren wie z.B. die Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII), welche wiederum nach Calmodulinbindung eine Vielzahl anderer Proteine phosphorylieren kann (Tompa und Friedrich, 1998; Soderling, 2000). Es ist weiterhin bekannt, dass die Phosphorylierung von FAK nach Stimulation durch den metabotropen Glutamatrezeptor 1 (mGluR1) eine Signaltransduktionskaskade voraussetzt, welche Calmodulin-abhängig ist (Shinohara et al., 2001). Experimente mit Inhibitoren konnten zeigen, dass die Induktion der FAK-Phosphorylierung durch Kalzium/Calmodulin vermittelt wird und unabhängig vom kalzium-abhängigen PKC- oder dem CaMKII-vermittelten Weg ist (Shinohara et al., 2001). Die fokale Adhäsionskinase wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert und hier vornehmlich im Hippocampus und der Großhirnrinde (Grant et al., 1995; Derkinderen et al., 1996; Girault et al., 1999).

In Immunpräzipitationsexperimenten konnte ein Interaktion von NCAM140, aber nicht NCAM180 mit der fokalen Adhäsionskinase FAK gezeigt werden (Beggs et al., 1997), welche im FGF-Rezeptor-unabhängigen NCAM-vermittelten Signalweg eine wichtige Rolle

spielt (Niethammer et al., 2002). Um zu untersuchen, ob die Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne von NCAM140 einen Einfluss auf die Prozessierung von FAK hat, wurden CHO-Zellen transient mit Wildtyp-NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM transfiziert. Die Zellen wurden dann mit einem polyklonalen NCAM-Antikörper stimuliert und Zellysate gesammelt, welche im *Western Blot* mit einem FAK-spezifischen Antikörper analysiert wurden. Die Abb. 4.22 zeigt bei einer Höhe von 125kDa in allen Spuren eine Bande, welche der Größe von Gesamt-FAK entspricht. In allen Ansätzen ist hier kein Unterschied zu beobachten. FAK ist in allen Spuren in etwa gleichen Mengen detektierbar. Abweichungen kann man jedoch beobachten, wenn man die Banden mit niedrigerem Molekulargewicht betrachtet. In der ersten Spur, in der die Probe von Wildtyp-NCAM140 aufgetragen wurde, lassen sich bei ca. 65kDa und bei 50kDa deutlicher stärkere Banden als in den anderen Spuren erkennen. Im Vergleich zu unstimulierten mit Wildtyp-DNA transfizierten Zellen zeigt sich hier ein stimulationsabhängiger Effekt. Die Prozessierung von FAK scheint durch die NCAM-Antikörper-Stimulation beeinflusst worden zu sein.

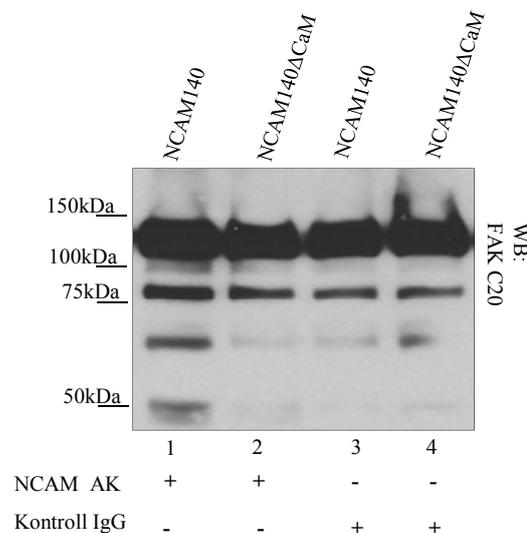


Abb. 4.22: Nachweis von FAK im Zellysat nach NCAM-Stimulation. CHO-Zellen wurden mit Wildtyp-NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM transfiziert und 24 h inkubiert. Zellen wurden dann in Serum-freiem Medium für 5 h inkubiert und anschließend durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, die Proben im SDS-PAGE aufgetrennt und FAK im *Western Blot* mit dem gegen den C-Terminus gerichteten FAK-Antikörper C20 nachgewiesen.

Die Zellen, die mit dem mutierten NCAM140 Δ CaM transfiziert wurden, zeigen keinen stimulationsabhängigen Effekt auf die FAK-Prozessierung [s. Abb. 4.22]. Hier sieht man sowohl in Spur 2 (stimuliert) als auch in Spur 4 (unstimuliert) keinen Unterschied im

Bandenmuster. In beiden Fällen kann man Banden bei 65kDa und 50kDa erkennen, welche aber genauso schwach sind wie die der unstimulierten, wildtypischen Probe [Spur 2]. Die Mutation der Calmodulinbindestelle von NCAM scheint einen negativen Effekt auf eine NCAM-abhängige FAK-Prozessierung zu haben.

4.14 Untersuchung der FAK-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der Calmodulinbindestelle von NCAM

Die Behandlung von COS7-Zellen mit NCAM-Antikörpern resultierte in einer hohen und transienten Tyrosin-Phosphorylierung von FAK (Beggs et. al., 1997). Um zu untersuchen, ob die Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne von NCAM140 einen Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung von FAK hat, wurden CHO-Zellen transient mit Wildtyp-NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM transfiziert. Die Zellen wurden dann mit einem polyklonalen NCAM-Antikörper stimuliert und Zelllysate gesammelt. Tyrosin-phosphorylierte Proteine wurden durch an Agarose-*beads* immobilisierten Phosphotyrosin-Antikörper präzipitiert und im *Western Blot* detektiert. Hierfür wurde ein gegen das N-terminale FAK gerichteter, polyklonaler Antikörper eingesetzt.

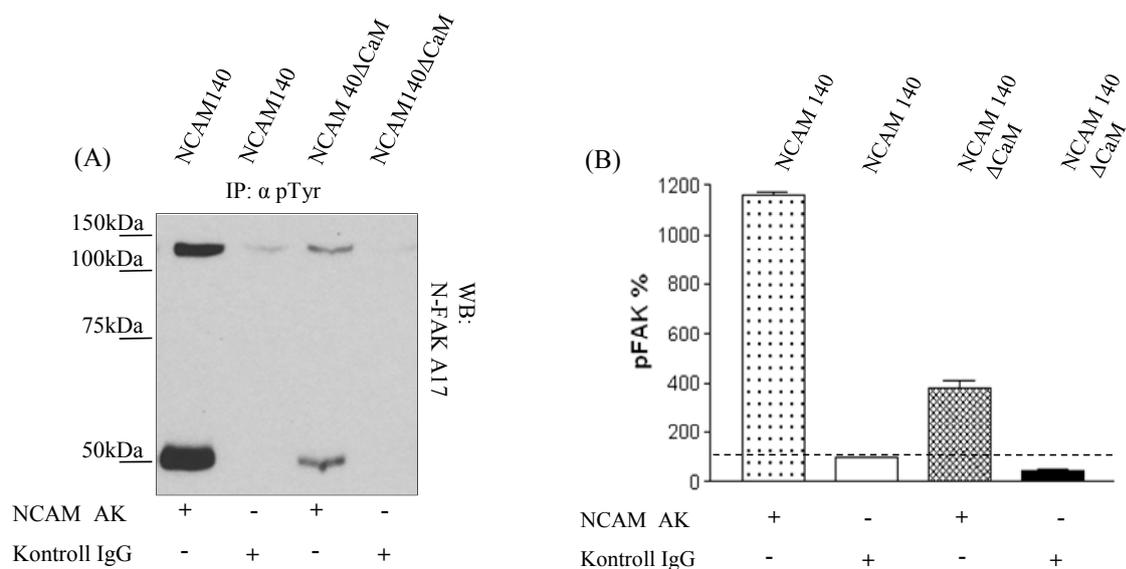


Abb. 4.23: Phosphorylierung von FAK nach NCAM-Stimulation. CHO-Zellen wurden mit NCAM140 und mutiertem NCAM140 Δ CaM transfiziert und 24 h inkubiert. Zellen wurden dann in serumfreiem Medium für 5 h inkubiert und anschließend durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. (A) Bei der anschließenden Immunpräzipitation wurde tyrosinphosphoryliertes FAK durch an Agarose-*beads* immobilisierten Phosphotyrosin-Antikörper präzipitiert und im *Western Blot* mit dem gegen N-terminales

FAK gerichteten Antikörper A17 nachgewiesen. (B) zeigt die densitometrische Auswertung von 3 voneinander unabhängigen Experimenten als Blockdiagramm. Die Menge an phosphoryliertem FAK (pFAK) aus unstimulierten, mit Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt und die Menge des pFAK aus den mit NCAM Δ CaM transfizierten Zellen (stimulierte und unstimulierte) relativ zur Gesamtmenge darauf bezogen.

Wie man anhand der Abb. 4.23 A sehen kann, ist die Phosphorylierung von FAK-abhängig von der NCAM-Antikörper-Stimulation. Phosphoryliertes FAK ist auf der Höhe 125kDa und 50kDa nachweisbar. Die 50kDa-Bande ist ohne Stimulation nicht detektierbar, die 125kDa-Bande nur sehr schwach. Analog dazu das Ergebnis bei den mit mutiertem NCAM transfizierten Zellen. Auch hier ist nur nach Stimulation eine Bande bei 50kDa sichtbar. Allerdings scheint die Menge an phosphoryliertem FAK grundsätzlich geringer als beim Wildtyp zu sein. Die densitometrische Auswertung in Abb. 4.23 B zeigt deutlich, wie abhängig die FAK-Phosphorylierung von der Stimulation durch NCAM-Antikörper ist. Zudem lässt sich festhalten, dass die Mutation der Calmodulinbindestelle am NCAM eine deutliche Reduzierung der FAK-Phosphorylierung bewirkt. Offensichtlich ist die FAK-Phosphorylierung NCAM- und Calmodulin-abhängig, wobei allerdings die NCAM-Stimulation auch bei mit mutiertem NCAM140 Δ CaM transfizierten Zellen noch zu einer signifikanten Phosphorylierung von FAK führt. Die Entstehung des 50kDa-FAK-Fragments scheint allerdings eindeutig stimulations- und damit NCAM-abhängig zu sein.

4.15 Der Einfluss des Calmodulin-Inhibitors CGS 9343 B auf die NCAM-vermittelte FAK-Phosphorylierung

Um zu untersuchen, wie spezifisch der Einfluss der Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären Domäne von NCAM140 auf die NCAM-vermittelte FAK-Phosphorylierung ist, wurde der Calmodulin-Inhibitor CGS 9343 B verwendet. Hierbei wurden transient mit dem Wildtyp-NCAM140 transfizierte CHO-Zellen in An- und Abwesenheit des CGS 9343 B inkubiert und nach Stimulation durch den polyklonalen NCAM-Antikörper für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Tyrosin-phosphorylierte Proteine wurden durch an Agarose-*beads* immobilisierten Phosphotyrosin-Antikörper präzipitiert und im *Western Blot* nachgewiesen. Hierfür wurde ein gegen N-terminales FAK gerichteter polyklonaler Antikörper eingesetzt. Wie in Abb. 4.24 A zu sehen ist, lässt sich nach NCAM-

Stimulation FAK präzipitieren. Es lassen sich 2 Banden (bei 125kDa und bei ca. 50kDa) detektieren, wobei die kleinere, ca. 50kDa-Bande dominanter ist. Nach Stimulation ist hier ein prozessiertes FAK-Fragment zu sehen. Die densitometrische Auswertung zeigt, dass dieses Fragment um 23 % stärker als das 125kDa-Fragment im *Western Blot* zu detektieren ist.

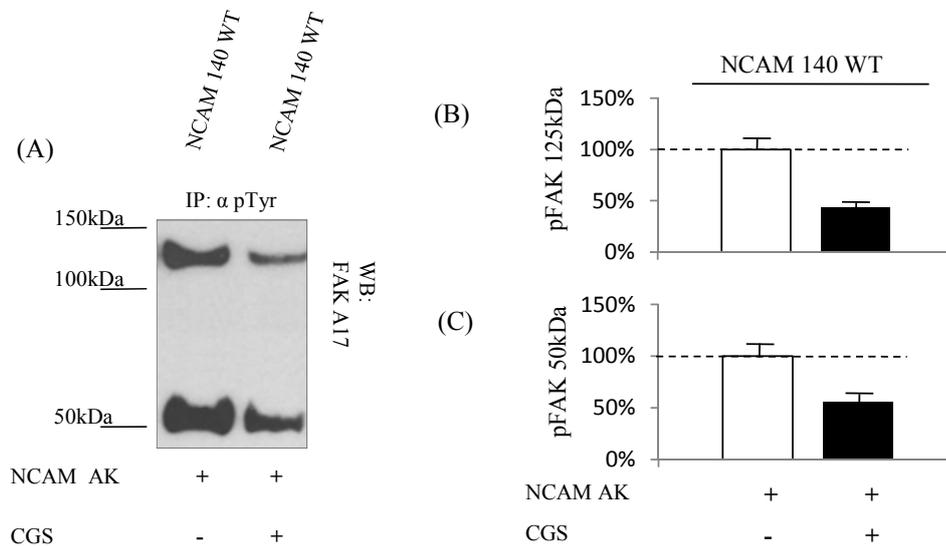


Abb. 4.24: Phosphorylierung von FAK unter Einfluss des Calmodulin-Inhibitors. CHO-Zellen wurden in (A) mit Wildtyp-NCAM140 transfiziert und 24 h inkubiert. Zellen wurden dann in An- bzw. Abwesenheit des Calmodulin-Inhibitor CGS 9343 B (10 μ M, rechte Spur) und Serum-freiem Medium für 5 h inkubiert und anschließend nach Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Bei der anschließenden Immunpräzipitation wurde Tyrosin-phosphoryliertes FAK durch an Agarose-beads immobilisierten Phosphotyrosin-Antikörper präzipitiert und im *Western Blot* nachgewiesen. Die densitometrische Auswertung von 3 voneinander unabhängigen Experimenten wird in (B) und (C) prozentual dargestellt. In (B) wurde die Menge des p125kDa großen FAK-Fragments aus stimulierten, mit Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt und die Menge des p125kDa großen FAK-Fragments aus stimulierten, unter Inhibitor-Einfluss inkubierten und mit Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen darauf bezogen. In (C) wurde die Menge des p50kDa-großen FAK-Fragments aus stimulierten, mit Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen auf 100 % gesetzt und die Menge des p50kDa großen FAK-Fragments aus stimulierten, unter Inhibitor-Einfluss inkubierten und mit Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen darauf bezogen.

Es bestätigt die vorherige Annahme, dass die Stimulation durch NCAM zum einen die FAK-Phosphorylierung aktiviert und zum anderen zur Entstehung eines kleineren, phosphorylierten 50kDa-Fragments führt. Dieses konnte zudem wie hier gezeigt mit dem gegen N-terminales FAK gerichteten Antikörper nachgewiesen werden (die Detektion von phosphoryliertem Gesamt FAK bei 125kDa ist auch mit dem gegen den C-Terminus von FAK gerichteten Antikörper möglich). Der *Western Blot* der Abb. 4.24 A zeigt weiterhin, dass der Calmodulin-Inhibitor CGS 9343 B einen negativen Einfluss auf die Phosphorylierung und zudem Prozessierung von FAK zu haben scheint. Wie die densitometrische Auswertung in Abb. 4.24

B bestätigt, ist die Phosphorylierung von FAK unter dem Inhibitor-Einfluss um 57 % niedriger. Auch auf das prozessierte und phosphorylierte 50kDa-Fragment scheint der Calmodulin-Inhibitor einen reduzierenden Einfluss zu haben. Hier zeigt die densitometrische Auswertung in Abb. 4.24 C ein um 44 % schwächeres Signal für das kleine 50kDa-Fragment, wenn der Inhibitor appliziert wurde. Somit wurde gezeigt, dass neben der NCAM-Stimulation auch Calmodulin eine entscheidende Rolle bei der FAK-Phosphorylierung und Entstehung eines N-terminalen, 50kDa-FAK-Fragments zukommt. CGS 9343 B inhibiert in etwa dem gleichen Maße wie die Mutation der Calmodulinbindestelle des NCAM.

4.16 Untersuchung der Kernlokalisierung des N-terminalen FAK-Fragments in CHO Zellen

Die Stimulation der NCAM-abhängigen Signaltransduktion durch NCAM-Antikörper scheint ebenso wie Calmodulin einen Einfluss auf die Phosphorylierung und Prozessierung von FAK zu haben. FAK ist ein Teil der fokalen Adhäsion in Säugetierzellen (Schaller et al., 1992; Hanks et al., 1992), welche essentiell für die embryonale Entwicklung ist (Ilic et al., 1995). Die fokale Adhäsionskinase ist involviert in verschiedene Zellfunktionen wie Migration (Cary et al., 1996), Adhäsion (Richardson und Parsons, 1996), Zellüberleben (Frisch et al., 1996) und in die Kontrolle des Zellzyklus (Zhao et al., 1998). Untersuchungen zur Regulation von FAK während der Apoptose von HUVEC-Zellen (*human umbilical vein endothelial cells*) zeigten, dass unterschiedlich große Fragmente von FAK nachgewiesen werden können (Lobo und Zachary, 2000). Die Studie ergab, dass ein 50kDa großes, N-terminales Fragment von FAK in Kernfraktionen von HUVEC-Zellen lokalisiert werden konnte. 2002 konnten Stewart et al. in HEK 293 Zellen N-terminales FAK im Kern und an Zell-Zell-Kontakten nachweisen, welches nicht abhängig von der Autophosphorylierungsstelle von FAK am Tyrosin397 (Tyr397 oder Y397) ist.

Die in dieser Arbeit beobachtete Entstehung eines phosphorylierten, ca. 50kDa-großen FAK-Fragments, welches NCAM-stimulationsabhängig ist, führt zu der Frage, ob dieses Fragment im Zellkern nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden CHO-Zellen transient mit Wildtyp-NCAM140 transfiziert und mit polyklonalem NCAM-Antikörper stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem *Qproteome Nuclear Protein Kit* der Firma Qiagen gemäß

Herstellerangaben aufgearbeitet. Entsprechend der Präparation erhält man je Ansatz drei Fraktionen: eine Fraktion aus zytosolischen und solubilisierten Membranproteinen, die nachfolgend als Fraktion **C** bezeichnet wird. Eine Fraktion die an Nukleinsäure-gebundene und lösliche Kernproteine umfasst und als Fraktion **D** bezeichnet wird und eine letzte, die unlösliche Kernproteinfraktion, welche mit **I** gekennzeichnet wird.

Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit einem gegen N-terminales FAK gerichteten Antikörper untersucht.

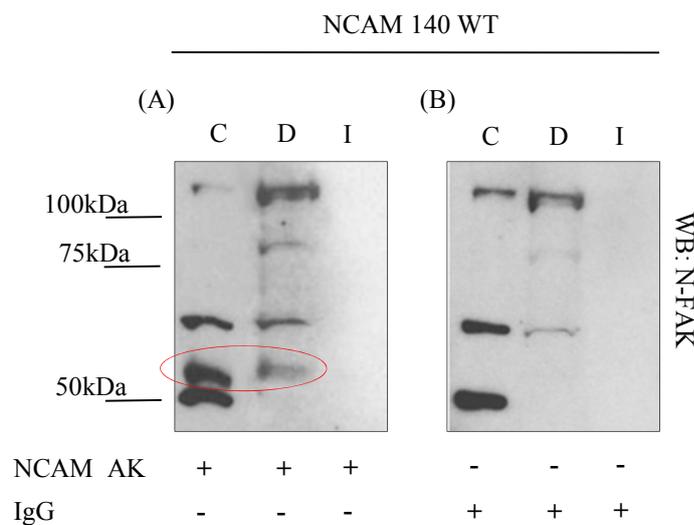


Abb. 4.25: Kernlokalisierung von N-terminalem FAK-Fragment. CHO-Zellen wurden mit NCAM140 transfiziert und 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden dann in Serum-freiem Medium für 5 h inkubiert und anschließend durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Nach Kernaufarbeitung wurden die Fraktionen C (zytosolische und solubilisierter Membranproteine), D (lösliche Kernproteine) und I (unlösliche Kernproteine) über SDS-PAGE aufgetrennt und FAK wurde im *Western Blot* mit einem gegen den N-Terminus von FAK gerichteten Antikörper A17 nachgewiesen. Der rote Kreis in (A) markiert ein ca. 55kDa-großes FAK-Fragment aus stimulierten CHO-Zellen. (B) zeigt Proben der unstimulierten Zellen.

Wie in der Abb. 4.25 zu sehen ist, ließ sich FAK in allen Ansätzen in der zytosolischen Fraktion als 125kDa-Fragment, was Gesamt-FAK darstellt, nachweisen. Die NCAM-Stimulation scheint keinen Einfluss auf dieses Fragment zu haben, wenn man die Proben mit [Abb. 4.25 A] und ohne [Abb. 4.25 B] Antikörperbehandlung vergleicht. Etwas unerwartet zeigte sich, dass man mit dem N-terminalen FAK-Antikörper in den Spuren der Kernfraktionen I und D ein 125kDa-Fragment detektieren kann. Interessant ist allerdings die Entstehung eines kernlokalisierten, ca. 55kDa-großen Fragments, welches nur unter NCAM-Stimulation zu entstehen scheint [s. Abb. 4.25 A, mit einem roten Kreis umrandet]. In der Spur D der stimulierten NCAM140 Proben ist auf dieser Höhe ein Fragment zu erkennen,

welches ohne Antikörperbehandlung nicht zu entstehen scheint. Im Gegensatz zur stimulierten Probe lässt sich bei der unstimulierten Probe in keiner der beiden Kernfraktionen ein 55kDa-Fragment nachweisen.

Ein weiteres, ca. 80kDa-Fragment ließ sich im *Western Blot* ausschließlich in der Fraktion D nachweisen. Dieses Fragment erscheint ohne Stimulation der Zellen nur sehr schwach und die Entstehung dieses Fragments scheint davon abhängig zu sein. Eine ca. 65kDa-Bande hingegen scheint stimulationsunabhängig zu entstehen. Sie erscheint in beiden Ansätzen [Abb. 4.25 A und B] in den Fraktionen der zytosolischen Proteine C und der löslichen Kernproteine D. Die Stimulation zeigte auf die Kernlokalisierung von FAK in den mit mutiertem NCAM140 Δ CaM transfizierten Zellen keinen Einfluss. Durch die Mutation der Calmodulinbindestelle am NCAM wird nämlich die Entstehung eines 50kDa- oder 55kDa-Fragments fast vollständig unterbunden und es konnten keine Fragmente in den Kernfraktionen detektiert werden, welche NCAM-stimulationsabhängig sind (nicht gezeigte Daten). Festhalten lässt sich zudem, dass in keinem Ansatz FAK-Fragmente in der unlöslichen Kernfraktion (I) detektiert werden konnten.

4.17 Untersuchung der Kernlokalisierung des N-terminalen FAK-Fragments in Cerebellum-Neuronen

Die Entstehung eines 55kDa-großen, Nukleinsäure-gebundenen FAK-Fragments in CHO-Zellen nach NCAM-Antikörperstimulation warf die Frage auf, ob dieses Ereignis auch an Kleinhirn-Neuronen aus Wildtyp-Mäusen gezeigt werden kann. Dies würde die biologische Relevanz einer solchen Signaltransduktionskette in den Kern deutlicher machen. Dafür wurden Wildtyp-NCAM Mäuse präpariert und die erhaltenen Cerebellum-Neurone für 24 h inkubiert. Nach Stimulation mit polyklonalem NCAM-Antikörper wurden die Zellen mit dem *Qproteome Nuclear Protein Kit* der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit einem gegen N-terminales FAK gerichteten Antikörper detektiert. Wie in der Abb. 4.26 zu sehen ist, kann man in den Proben C und D der stimulierten Zellen und bei längerer Exposition des Films auch in der unlöslichen Kernproteinfraktion I ein ca. 55kDa N-terminales FAK-Fragment detektieren. Ein 125kDa-großes FAK-Fragment lässt sich in den Fraktionen C und D aus

stimulierten und unstimulierten Zellen nachweisen. Ohne Stimulation entsteht allerdings weder ein kleineres Fragment in der zytosolischen/solubilisierten Membranprotein-Fraktion und daher wohl auch keins, welches dann kernlokalisiert ist.

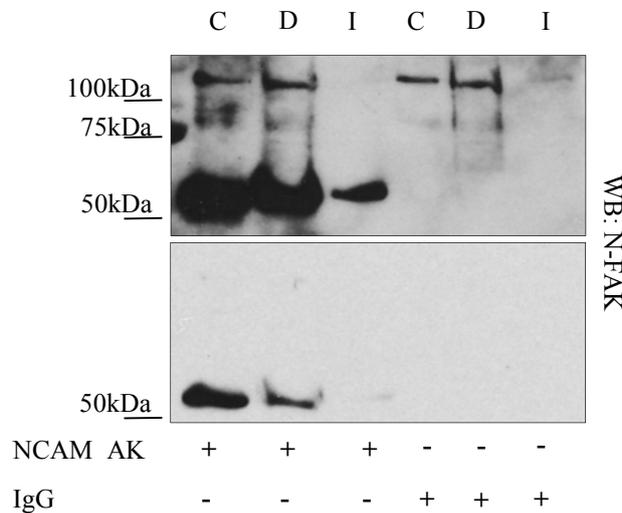


Abb. 4.26: Kernlokalisierung von N-FAK. Aus Wildtyp-Maus-Cerebellum gewonnene Neurone wurden für 24 h inkubiert, anschließend in Serum-freiem Medium für 5 h inkubiert und nach Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Nach Kernfraktionierung wurden die Fraktionen C (zytosolische und solubilisierter Membranprotein), D (lösliche Kernproteine) und I (unlösliche Kernproteine) über SDS-PAGE aufgetrennt und FAK wurde im *Western Blot* mit einem gegen den N-Terminus von FAK gerichteten Antikörper A17 nachgewiesen. Blot nach kurzer (unten) bzw. langer (oben) Exposition des Films ist dargestellt.

Interessant ist auch, dass das 55kDa-FAK-Fragment hier unter NCAM-Stimulation in der unlöslichen Kernfraktion I gezeigt werden kann. In dieser Fraktion konnte in CHO-Zellen in keinem der Experimente ein Fragment detektiert werden. Zudem ist auffällig, dass in Cerebellum-Neuronen offensichtlich das 50kDa-Fragment nicht entsteht oder detektiert werden kann, welches in zytosolischen Kernfraktionen aus CHO-Zellen immer sehr deutlich sichtbar war.

4.18 Untersuchung von FAK in Zelllysaten aus Cerebellum-Neuronen und transfizierten CHO-Zellen

Die Untersuchungen zur Kernlokalisation von FAK in CHO-Zellen und Cerebellum-Neuronen zeigten Unterschiede in der Art der Verteilung der N-terminalen FAK-Fragmente und auch in der Entstehung von Fragmenten, die zelltypspezifisch zu sein scheinen. Dies sieht man deutlich anhand des 50kDa-FAK-Fragments, welches nur in CHO-Zellen in der zytosolischen Fraktion C detektiert werden konnte. Es führte zur Frage nach der Prozessierung von FAK und ob diese durch spezifische Inhibitoren beeinflusst werden kann. Hierfür wurden sowohl transient mit NCAM140 transfizierte CHO-Zellen als auch Wildtyp-Cerebellum-Neurone nach Inhibitor-Behandlung mit NCAM-Antikörper stimuliert und Lysate gesammelt. Anschließend wurden gleiche Mengen der Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit einem gegen N-terminales gerichteten Antikörper untersucht.

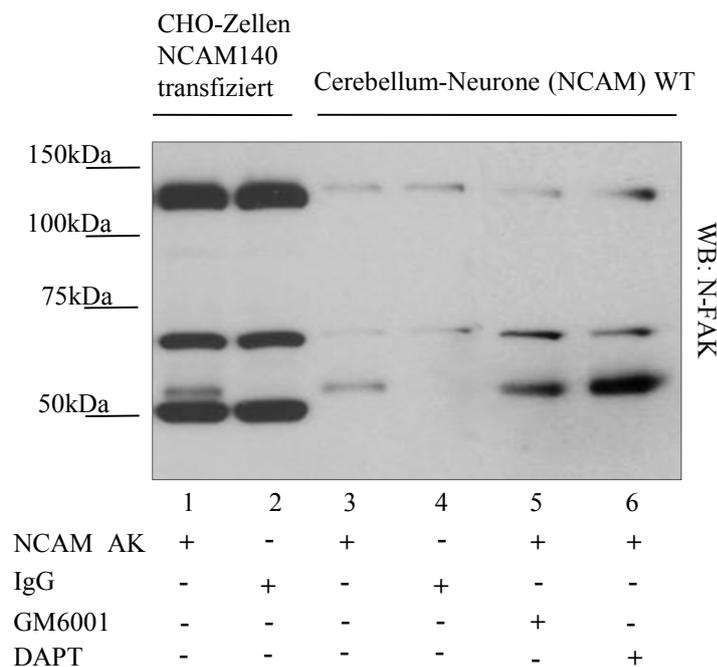


Abb. 4.27: FAK im Zelllysate von CHO-Zellen und Cerebellum-Neuronen. Aus Wildtyp-Mäusen präparierte Cerebellum-Neurone (Spuren 3-6) oder mit NCAM140 transfizierte CHO-Zellen wurden für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden dann in serumfreiem Medium für 4 h inkubiert, Zellen der Spuren 5 und 6 wurden dann für 1 h mit entsprechendem Inhibitor behandelt. Anschließend wurden alle Ansätze nach Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. FAK wurde mit einem gegen den N-Terminus von FAK gerichteten Antikörper nachgewiesen.

In allen sechs Spuren lässt sich FAK bei 125kDa als Gesamt-FAK-Fragment detektieren. Zudem scheint eine ca. 65kDa-Bande ebenfalls in allen Spuren vorhanden zu sein. Diese beiden Banden entstehen unabhängig von der NCAM-Stimulation oder der Inhibitor-Behandlung. In der ersten Spur lässt sich bei den stimulierten CHO-Zellen erneut eine 55kDa-große Bande erkennen, welche in der Spur 2 der unstimulierten Zellen nicht entsteht. Die Größe dieser Bande stimmt mit dem stimulationsabhängigen kernlokalisierten 55kDa-Fragment überein. Das gleiche Bild ergibt sich bei den Spuren 3 und 4, welche stimulierte [3] und unstimulierte [4] Cerebellum-Neurone zeigen. Hier tritt die wohl CHO-spezifische 50kDa Bande nicht auf, sondern es ist nur eine stimulationsabhängige 55kDa-Bande in Spur 3 zu erkennen. In den beiden letzten Spuren 5 und 6 zeigt sich, dass auch hier die NCAM-Antikörperbehandlung zur Entstehung eines N-terminalen FAK-Fragments führt. Allerdings scheinen die hier eingesetzten Inhibitoren für TACE [Spur 5, GM6001] und γ -Secretase [Spur 6, DAPT] die Bildung dieses Fragments zu fördern. Dies ist ein Hinweis auf die Vorgänge, die die Prozessierung von FAK beeinflussen. Interessant ist, dass die Inhibitoren keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die FAK-Prozessierung in CHO-Zellen zu haben scheinen, wie mehrere Experimente zeigten (nicht gezeigte Daten).

4.19 Die Kernlokalisierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM in CHO-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit haben nun nach der gezeigten NCAM-abhängigen Kernlokalisierung von FAK zu der Frage geführt, ob nicht auch NCAM selbst nach Stimulation im Kern nachgewiesen werden kann. Bislang wurde nicht berichtet, dass die Transmembran-Proteine NCAM140 und NCAM180 direkt in den Kern transportiert werden, um z. B. Neuritenwachstum zu fördern. Für NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum sind verschiedene Signaltransduktionswege beschrieben, z. B. über die Interaktion zwischen NCAM140/180 und dem FGF-Rezeptor, welche in einen Signalweg über PLC γ , DAG und der anschließenden Kalziumfreisetzung innerhalb der Zelle mündet und letztlich in Neuritenwachstum resultiert (Williams et al., 1994; Kiselyov et al., 2003; Neiiendam et al., 2004; Anderson et al., 2005). Ein ausschließlich für NCAM140 postulierter Signaltransduktionsweg verläuft über die Interaktion von NCAM mit RPTP α und anschließende Fyn- und FAK-Phosphorylierung (Beggs et al., 1994, 1997; Bodrikov et al., 2005). Dies resultiert in der Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Schmid et al., 1999), der zu

einer ERK-Phosphorylierung und damit zu Neuritenwachstum führt. Um zu untersuchen, ob NCAM selbst in den Kern transportiert wird, wurden CHO-Zellen transient mit NCAM transfiziert. Nach Transfektion der CHO-Zellen mit dem Wildtyp-NCAM140 und dem mutierten NCAM140 Δ CaM und anschließender Stimulation mit polyklonalem NCAM-Antikörper, wurden die in Pkt. 4.16 beschriebenen Kernfraktionen aufgearbeitet. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit einem Antikörper inkubiert, welcher die intrazelluläre NCAM-Domäne detektiert.

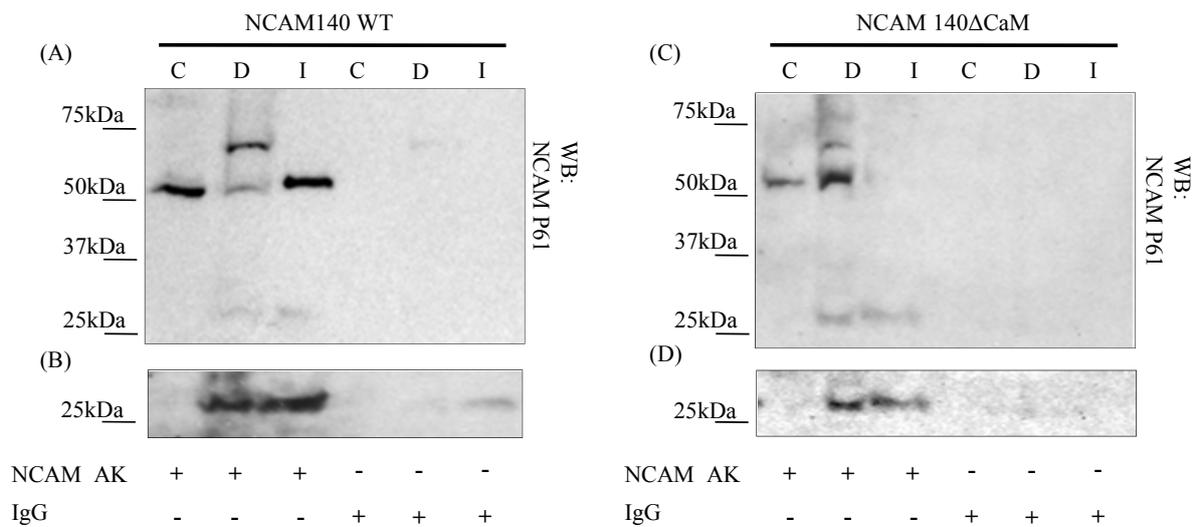


Abb. 4.28: Kernlokalisierung von NCAM. CHO-Zellen wurden (A) und (B) mit NCAM140 und in (C) und (D) mit NCAM140 Δ CaM transfiziert und 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden dann in Serum-freiem Medium für 5 h inkubiert und anschließend durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Nach Kernfraktionierung wurden erhaltenen Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im *Western Blot* mit dem gegen die intrazelluläre Domäne von NCAM gerichteten Antikörper P61 nachgewiesen. (B) sowie (D) zeigen den unteren Teil des *Blot* aus (A) und (B) länger exponiert, um schwächere Banden besser sichtbar zu machen.

Nachdem mit dem gegen die intrazelluläre Domäne gerichtete NCAM-Antikörper 5B8 kein NCAM nachgewiesen werden konnte, wurde der Antikörper P61 eingesetzt, welcher ebenfalls die intrazelluläre NCAM-Domäne erkennt. Allerdings bindet er sehr nah an den membranständigen Teil von NCAM. Damit konnten nun eindeutig Banden für NCAM sichtbar gemacht werden, welche kernlokalisiert sind. In der Abb. 4.28 A kann man in den Spuren D und I der stimulierten Zellen auf der Höhe von ca. 55kDa ein NCAM-Fragment detektiert erkennen. Dieses Fragment findet sich auch in der zytosolischen Fraktion C, wo es ebenso wie in der unlöslichen Kernproteinfraktion I sehr deutlich zu sehen ist. In der löslichen Kernproteinfraktion D ist dieses Fragment schwächer zu sehen, dafür ist aber in dieser Spur

ein zusätzliches Fragment bei ca. 65-70kDa zu erkennen, welches nur hier auftaucht. Eine weitere Bande bei ca. 30kDa ist zudem noch in den beiden Kernfraktionen D und I bei längerer Exposition des Films zu sehen [s. Abb. 4.28 B]. Die Abbildungen zeigen eindeutig, dass die Kernlokalisierung von NCAM in hohem Maße NCAM-stimulationsabhängig ist, da in den Spuren der unstimulierten Proben keine NCAM-Fragmente detektiert werden konnten. Interessant ist ebenso das Ergebnis der mit dem mutierten NCAM140 Δ CaM transfizierten Zellen in den Abbildungen 4.28 C und D. Auch hier ist eindeutig zu sehen, dass unter unstimulierten Bedingungen keine NCAM-Kernlokalisierung stattfindet. Man kann aber bei den stimulierten Proben alle Fragmente detektieren, welche auch in den mit Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen gezeigt wurden. Allerdings gibt es eine Abweichung, denn bei den NCAM140 Δ CaM Proben scheint in der unlöslichen Kernfraktion kein 55kDa-Fragment zu entstehen. Die kleineren, ca. 30kDa-Fragmente sind allerdings auch hier analog zum Wildtyp sowohl in der Fraktion D als auch in der Fraktion I nach längerer Exposition zu erkennen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Kernlokalisierung von NCAM in erster Linie NCAM-stimulationsabhängig ist. Weiterhin ist aber die Entstehung eines 55kDa-Fragments, welches in der unlöslichen Kernfraktion detektierbar ist, zudem auch Calmodulin-abhängig, denn in der NCAM140 Δ CaM Mutante scheint dieses Fragment nicht vorhanden zu sein.

4.20 Die Kernlokalisierung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM in Cerebellum-Neuronen

Hinweise auf unterschiedliche kernlokalisierte NCAM-Fragmente

Die Detektion von NCAM-Fragmenten in Kernfraktionen aus CHO-Zellen nach NCAM-Antikörperstimulation warf die Frage auf, ob dieses Ereignis auch an Kleinhirn-Zellen aus Wildtyp-Mäusen gezeigt werden kann. Dies würde die biologische Relevanz einer solchen Signaltransduktionskette mit der Translokation von Transmembran-Proteinen in den Zellkern deutlicher machen. Dafür wurden Wildtyp-NCAM-Mäuse analog zu der im Punkt 4.16 bereits beschriebenen Methode präpariert. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im *Western Blot* mit einem gegen intrazelluläres NCAM gerichteten Antikörper detektiert.

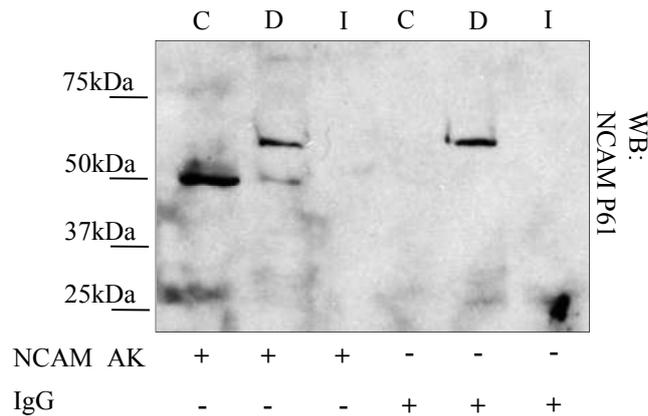


Abb. 4.29: Kernlokalisierung von NCAM. Aus Wildtyp-Maus-Cerebellum gewonnene Neurone wurden für 24 h inkubiert, anschließend in serumfreiem Medium für 5 h inkubiert und nach Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Nach Kernfraktionierung wurden die erhaltenen Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im *Western Blot* mit dem gegen die intrazelluläre Domäne von NCAM gerichteten Antikörper P61 nachgewiesen.

Wie schon in den transient transfizierten CHO-Zellen lässt sich auch an stimulierten Cerebellum-Neuronen NCAM in der löslichen Proteinfraction D im Zellkern nachweisen. Man erkennt auf dem *Blot* eine Bande bei ca. 65kDa in der Fraktion D. Diese Bande kann man auch in der Fraktion D aus unstimulierten Zellen detektieren. Interessanterweise kann man nach Stimulation zudem auch eine ca. 50kDa-Bande in der löslichen Kernproteinfraction nachweisen, welche eindeutig abhängig von der NCAM-Antikörperstimulation entsteht. In der zytosolischen Fraktion lässt sich dieses Fragment auch detektieren. Dieses Ergebnis weicht ein wenig von der Kernlokalisierung in CHO-Zellen ab, da hier unter stimulierten Bedingungen auch in der unlöslichen Fraktion ein 50kDa-Fragment gezeigt werden konnte. Hier deutete sich nur eine ganz schwache Bande in der entsprechenden Probe an, welche sich auch nach langer Expositionszeit und in weiteren Experimenten mit dem intrazellulären NCAM-Antikörper nicht verstärken ließ. Zudem konnte man in Cerebellum-Neuronen auch ohne Stimulation ein 65kDa-Fragment in der löslichen Kernproteinfraction D nachweisen. Es scheint auch für die Prozessierung von NCAM unterschiedliche, zellspezifische Systeme zu geben, wie auch schon die Ergebnisse für die FAK-Phosphorylierung und Kernlokalisierung zeigten.

Nachdem nun die Kernlokalisierung von NCAM mit einem Antikörper nachgewiesen werden konnte, welcher gegen den intrazellulären Teil von NCAM gerichtet ist, stellte sich die Frage, ob nicht weitere NCAM-Fragmente im Kern gefunden werden können. Hierfür wurde ein polyklonaler NCAM-Antikörper (1β2) eingesetzt, welcher gegen die extrazelluläre Domäne

von NCAM gerichtet ist. Es war interessant, zu überprüfen, ob nicht auch ein transmembraner Teil von NCAM in den Kern transportiert wird. Der mit EGF-Rezeptoren (*epidermal growth factor*) verwandte Wachstumsfaktor-Rezeptor C-erbB-4/HER-4 wurde in *Immunostainings* (*staining*=Färbung) im Nukleus einiger Brustkrebs-Zelltypen entdeckt (Srinivasan et. al., 2000). Ebenso ist bekannt, dass der EGF-R nach Stimulation durch seine Liganden in den Kern transportiert wird (Holt et. al., 1995). Imamura et al. (1990, 1992, 1994) konnten in mehreren Studien Aussagen zur Lokalisation des FGF im Kern treffen. Durch den Einsatz eines gegen extrazelluläres NCAM gerichteten Antikörpers können wir hier zeigen, dass auch transmembrane bzw. extrazelluläre NCAM-Fragmente kernlokalisiert zu sein scheinen. Die Abb. 4.30 zeigt die Kernfraktionen von stimulierten und unstimulierten Cerebellum-Zellen, welche im *Western Blot* mit dem 1 β 2 NCAM-Antikörper untersucht wurden. Es ist deutlich zu sehen, dass unter Stimulation sowohl in der zytosolischen Fraktion C als auch in der löslichen Kernproteinfraktion D eine ca. 50kDa-Bande detektiert werden konnte. Überraschenderweise kann mit dem extrazellulären Antikörper eine weitere Bande detektiert werden, welche in der Spur der unlöslichen Kernproteine (I) zu sehen ist. Diese scheint etwas niedriger als 50kDa, aber deutlich stärker exprimiert zu sein.

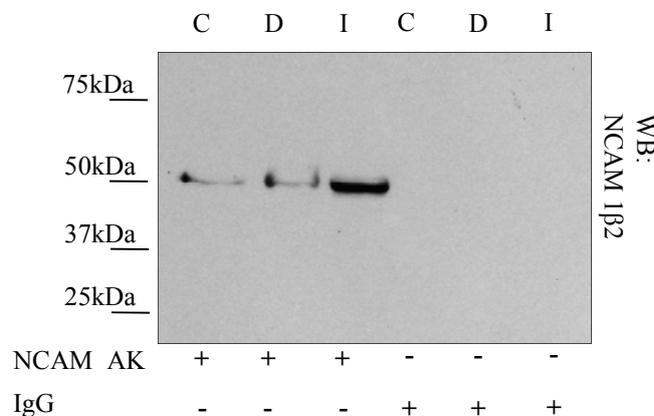


Abb. 4.30: Kernlokalisation von NCAM. Aus Wildtyp-Maus-Cerebellum gewonnene Neurone wurden für 24 h inkubiert, anschließend in serumfreiem Medium für 5 h inkubiert und nach Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Nach Kernfraktionierung wurden die erhaltenen Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im *Western Blot* mit dem gegen die extrazelluläre Domäne von NCAM gerichteten Antikörper 1 β 2 nachgewiesen.

Die unstimulierten Zellen zeigen in den Kernfraktionen D und I keinerlei Banden oder Fragmente, welche mit dem 1 β 2 Antikörper detektiert werden können. Offensichtlich ist

dieses Fragment stark stimulationsabhängig. Auch die Bildung eines 50kDa-Fragments in der zytosolischen Fraktion scheint hier ohne Antikörperstimulation unterbunden zu sein.

4.21 Die NCAM-stimulationsunabhängige Kernlokalisierung von NCAM180

Die bisherigen Untersuchungen zeigten in transient transfizierten CHO-Zellen eine Kernlokalisierung der NCAM-Isoform NCAM140. Die Kernlokalisierung von NCAM in stimulierten Cerebellum-Neuronen kann keinen Hinweis über die jeweils detektierte NCAM-Isoform liefern. Um dies genauer zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit dem wildtypischen NCAM180 und dem mutierten NCAM180 Δ CaM transient transfiziert und anschließend mit polyklonalem NCAM-Antikörper stimuliert. Nach Kernfraktionierung wurden Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit dem Antikörper D3 inkubiert, welcher spezifisch das Exon18 in der intrazellulären Domäne von NCAM180 erkennt.

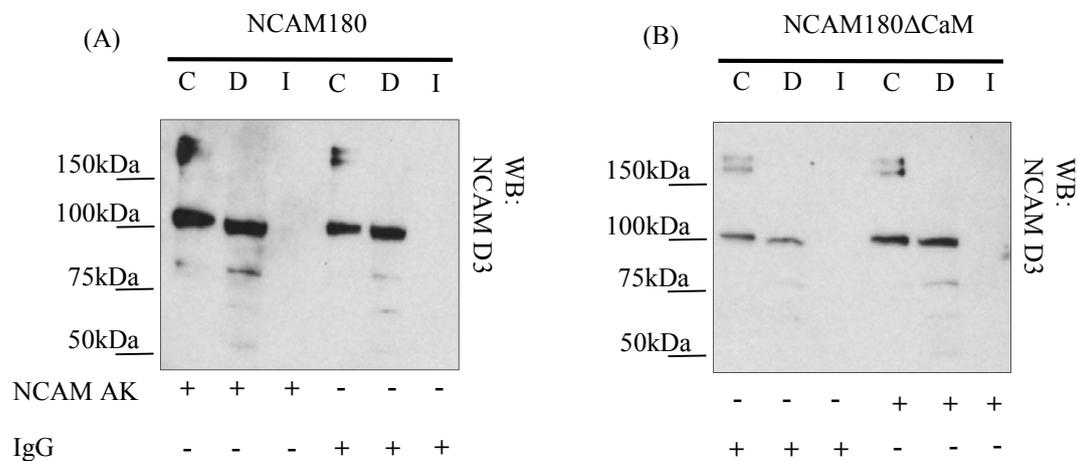


Abb. 4.31: Kernlokalisierung von NCAM180. CHO-Zellen wurden mit (A) NCAM180 und (B) NCAM180 Δ CaM transfiziert und 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden dann in serumfreiem Medium für 5 h inkubiert und anschließend durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Anschließend wurde eine Kernfraktionierung durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM180 im *Western Blot* mit einem gegen das NCAM180-spezifische Exon18 gerichteten Antikörper D3 nachgewiesen.

Anhand der detektierten Banden in den Abb. 4.31 A (NCAM180) und B (NCAM180 Δ CaM) lässt sich eindeutig erkennen, dass NCAM180 in der löslichen Kernproteinfraktion nachgewiesen werden konnte. Sowohl in den stimulierten als auch in den unstimulierten

Proben lassen sich mehrere Banden nachweisen. Am prominentesten ist eine Bande bei ca. 100kDa, welche auch in der zytosolischen Fraktion vorkommt. Eine Bande bei ca. 80kDa scheint stärker in der Fraktion D nachweisbar zu sein. Die Banden sind generell deutlicher in den stimulierten Proben zu sehen. In allen zytosolischen Fraktionen ist zudem NCAM180 als Gesamt-Protein bei 180kDa zu erkennen. Weitere Banden der Größen 65kDa und 50kDa kommen nur in der Fraktion D vor. Die Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären NCAM-Domäne scheint die Entstehung dieser Fragmente nicht zu unterbinden, wenn auch ein leichter Einfluss sichtbar ist, da die Banden der mit NCAM180 Δ CaM transfizierten Zellen schwächer zu sehen sind [s. Abb. 4.31 B]. Damit lässt sich zunächst festhalten, dass die NCAM180-Kernlokalisation mit dem Antikörper D3 nachweisbar ist und die detektierten Fragmente nicht auf Grund der Stimulation entstanden zu sein scheinen. Außerdem ist die Kernlokalisation von NCAM180 Calmodulin-unabhängig.

4.22 Die NCAM-stimulationsabhängige Kernlokalisation von NCAM180

Die Kernlokalisation von NCAM180 konnte mit Hilfe des NCAM-Antikörpers D3 nachgewiesen werden. Der Antikörper erkennt ausschließlich das NCAM180-spezifische Exon18 in der intrazellulären NCAM-Domäne. Die Versuche zur Kernlokalisation von NCAM140 mit dem gegen extrazelluläres NCAM gerichteten Antikörper führten zur überraschenden Detektion von NCAM in Kernfraktionen [s. Pkt. 4.32]. Erstaunlicherweise konnte auch für NCAM180 mit dem extrazellulären Antikörper eine Kernlokalisation nachgewiesen werden, wie in Abb. 4.32 zu sehen ist. Unter Stimulation ist in beiden Kernfraktionen (D und I) ein ca. 50kDa-großes Fragment zu erkennen, welches auch in der zytosolischen Fraktion enthalten ist. Die Entstehung dieses Fragments in der zytosolischen Fraktion scheint Voraussetzung für die Kernlokalisation zu sein, denn in der zytosolischen Fraktion der unstimulierten Zellen ist keine Bande mit dem 1 β 2 Antikörper detektierbar, ebenso wenig wie dementsprechend in den beiden Kernfraktionen.

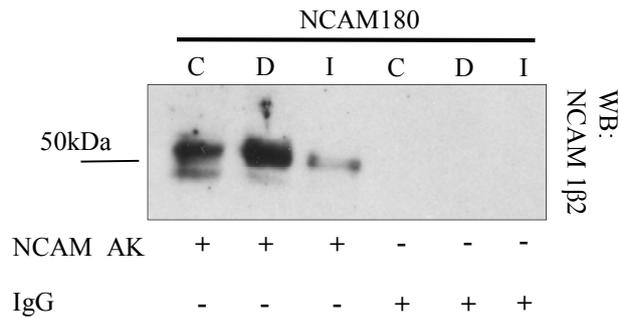


Abb. 4.32: Stimulationsabhängige Kernlokalisierung von NCAM180. Transient mit NCAM180 transfizierte CHO-Zellen wurden für 24 h inkubiert, anschließend in Serum-freiem Medium für 5 h inkubiert und durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Anschließend wurde eine Kernfraktionierung durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von NCAM180 im *Western Blot* erfolgte mit dem gegen die extrazelluläre NCAM-Domäne gerichteten Antikörper 1β2.

Somit scheinen für NCAM180 zwei verschiedene Translokationswege in den Kern zu existieren, welche sich in der Entstehung unterschiedlicher Fragmente und in der Aktivierungsart unterscheiden. Die Entstehung eines ca. 50kDa großen Fragments, welches in löslichen ebenso wie in der unlöslichen Kernproteinfraktion detektiert werden kann, ist NCAM-stimulationsabhängig. Auch Calmodulin scheint hierauf einen leichten Einfluss zu haben. Bei der Mutante NCAM180 Δ CaM entstehen nach Stimulation zwar auch dieses 50kDa-Fragment. Es ist aber deutlich schwächer nachweisbar, was eventuell auf eine geringere Expression von NCAM in der Mutante oder verringerten Bildung dieses NCAM-Fragments schließen lässt (Daten nicht gezeigt).

4.23 Die Entstehung der unterschiedlichen kernlokalisierten NCAM-Fragmente

Die Metalloprotease ADAM17, auch als TACE (*tumor necrosis factor α converting enzyme*) bezeichnet, zählt zu den am besten untersuchten Vertretern der ADAM-Familie. Zahlreiche Substrate der Protease konnten bereits identifiziert werden. Erste Hinweise für eine Beteiligung der Metalloprotease ADAM17 an der Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen lieferten Versuche mit TACE-defizienten Fibroblasten, die mit einem TACE-Expressionskonstrukt retransfiziert wurden. Erst nach der Transfektion war in den Zellkulturüberständen der Fibroblasten ein lösliches NCAM-Fragment mit einem

Molekulargewicht von 110kDa nachweisbar (Bormann, 2001). Daran anschließende Untersuchungen zeigten, dass das lösliche Fragment NCAM110 durch die regulierte proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne der Transmembranproteine NCAM180 und NCAM140 unter Beteiligung der Metalloprotease ADAM17/TACE freigesetzt wird (Kalus et al., 2006).

Die Detektion verschiedener NCAM-Fragmente im Zellkern führte zur Frage, ob und welche Proteasen in die Entstehung dieser Fragmente involviert sein könnten. CHO-Zellen wurden, wie in Pkt. 4.21 beschrieben, behandelt und per Immunoblot-Analyse unter Verwendung des NCAM180-spezifischen Antikörpers D3 untersucht.

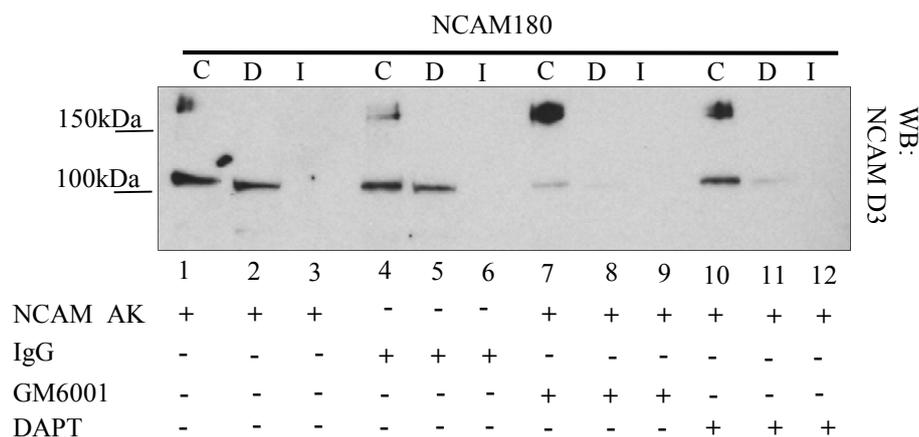


Abb. 4.33: Inhibitorstudie zur Kernlokalisation von NCAM180. CHO-Zellen wurden mit NCAM180 transfiziert und 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden nach 5stündiger Inkubation in serumfreiem Medium in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren (einstündige Behandlung) inkubiert und anschließend durch Zugabe von polyklonalem NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Anschließend wurde eine Kernfraktionierung durchgeführt, die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im *Western Blot* mit einem gegen das NCAM180-spezifische Exon18 gerichteten Antikörper (D3) nachgewiesen.

Die Abb. 4.33 zeigt, dass in Anwesenheit des TACE-Inhibitors (GM 6001) sich eine deutliche Abnahme der Menge des löslichen Kernproteinfragments D erkennen lässt. Das Fragment ist fast nicht mehr detektierbar. Auch in der zytosolischen Fraktion C ist eine deutliche Reduktion feststellbar. Die Entstehung dieses Fragments nach NCAM-Stimulation scheint also TACE-abhängig zu sein. Auch der γ -Sekretase-Inhibitor (DAPT) scheint einen Effekt auf

dieses Fragment in der Fraktion D zu haben. Anders als bei TACE erscheint hier aber in der zytosolischen Fraktion noch ein deutliches Signal dieses NCAM-Fragments.

Die Untersuchung der stimulationsabhängigen Kernlokalisierung von NCAM180 zeigte allerdings, dass TACE keine Rolle bei der Entstehung des 50kDa großen Kernfragments spielt.

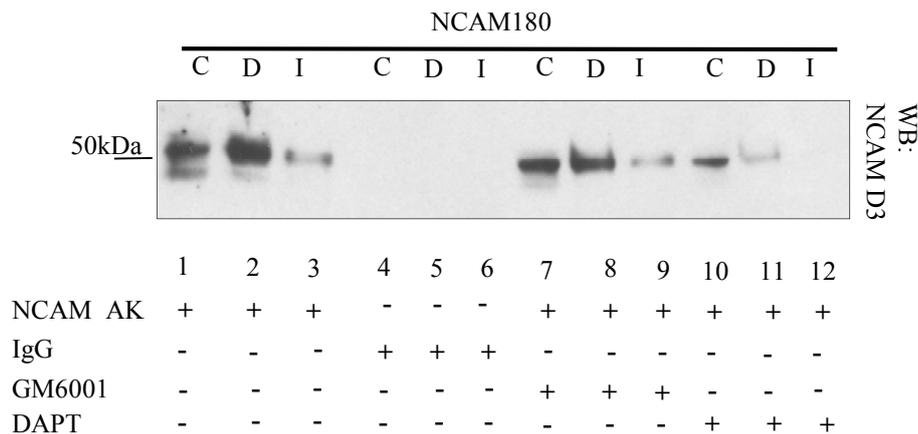


Abb. 4.34: Inhibitorstudie zur Kernlokalisierung von NCAM180. CHO-Zellen wurden mit NCAM180 transfiziert und 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden nach 5stündiger Inkubation in serumfreiem in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren (einstündige Behandlung) inkubiert und anschließend durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Anschließend wurde eine Kernfraktionierung durchgeführt, die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM180 im *Western Blot* mit dem die extrazelluläre NCAM-Domäne erkennenden Antikörper 1 β 2 nachgewiesen.

NCAM ist als 50kDa Bande in den Spuren 7-9 zu erkennen und unterscheidet sich nicht signifikant von den stimulierten, aber ohne Inhibitor-Zugabe inkubierten Zellen (1-3). Interessanterweise scheint der γ -Sekretase-Inhibitor (DAPT) einen negativen Einfluss zu haben, da er zur reduzierten Entstehung des 50kDa-Fragments in den Fraktionen C und D führt und vollständig das Vorkommen dieses Fragments in der unlöslichen Kernproteinfraktion I inhibiert.

Als der Einfluss der Inhibitoren auf die Entstehung der Kernfragmente von NCAM140 untersucht wurde, zeigte sich, dass TACE und γ -Sekretase auf die mit dem P61 detektierten NCAM-Fragmente keine Wirkung hatten. Auch die Detektion mit dem NCAM-Antikörper 1 β 2 zeigte keine Unterschiede zwischen den Zellen, welche mit DAPT bzw. GM 6001 behandelt wurden und denen, die ohne Inhibitoren inkubiert wurden.

Weitere Inhibitoren wurden eingesetzt, um zu untersuchen, welche Proteasen in die Entstehung der kernlokalisierten NCAM-Fragmente involviert sein könnten. Basierend auf der Tatsache, dass die an der Spaltung von Transmembranproteinen beteiligten Enzyme der Gruppe der Aspartylproteasen zugeordnet werden, wurde der unspezifische Aspartylproteaseinhibitor Pepstatin eingesetzt. Ebenso wurde der Serinproteasen-Inhibitor Aprotinin verwendet. Aprotinin hemmt spezifisch die Wirkung diverser Serinproteasen wie z. B. von Plasmin.

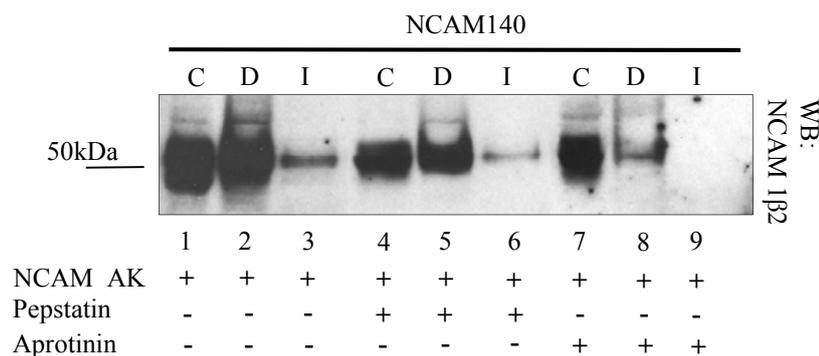


Abb. 4.35: Inhibitorstudie zur Kernlokalisierung von NCAM140. CHO-Zellen wurden mit NCAM140 transfiziert und 24 h inkubiert. Die transfizierten Zellen wurden nach 5stündiger Inkubation in serumfreiem in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren (einstündige Behandlung) inkubiert und anschließend durch Zugabe von NCAM-Antikörper 20 min stimuliert. Anschließend wurde eine Kernfraktionierung durchgeführt, die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im *Western Blot* mit dem NCAM-Antikörper 1β2 nachgewiesen.

Die Immunoblot-Analyse mit dem NCAM-Antikörper 1β2 zeigt, dass Pepstatin keine Wirkung auf die Kernlokalisierung von NCAM hat [s. Abb. 4.35, Spuren 4 bis 6]. Die Banden unterscheiden sich nur minimal von den Proben, die nicht mit den Inhibitoren behandelt wurden [Spuren 1-3]. Im Falle der mit Aprotinin behandelten Zellen zeigt sich jedoch ein Einfluss auf die Entstehung der beiden Kernfragmente. In der löslichen Kernproteinfraction D [Spur 8] entsteht deutlich weniger vom 50kDa-NCAM-Fragment, welches in der unlöslichen Kernproteinfraction I [Spur 9] überhaupt nicht mehr nachweisbar ist.

4.24 Einfluss der NCAM-Antikörper-Stimulation auf die Prozessierung von NCAM

Die Prozessierung der membranständigen Isoformen von NCAM140 und NCAM180 kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden wie z. B. die Bindung von Calmodulin an die intrazelluläre Domäne [s. Pkt. 4.4]. In den bisher gezeigten Ergebnissen dieser Arbeit wurde ein Einfluss der Stimulation durch einen extrazellulären NCAM-Antikörper auf Prozesse untersucht, welche zytosolisch oder nukleär ablaufen. Ob sich die Stimulation möglicherweise auch auf die Prozessierung und die Bildung von extrazellulären NCAM-Fragmenten auswirkt, sollte daraufhin untersucht werden. Dafür wurden CHO-Zellen transient mit NCAM140 und NCAM180 transfiziert, stimuliert und Zellkulturüberstände im Immunoblot analysiert.

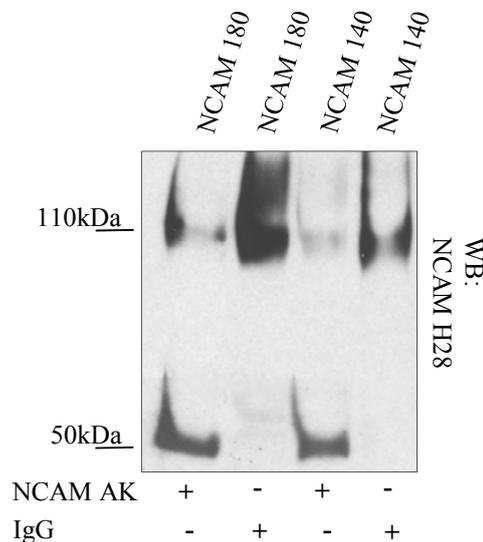


Abb. 4.36: Extrazelluläres NCAM in Zellkulturüberständen nach NCAM-Stimulation. CHO-Zellen wurden transient mit NCAM140 und NCAM180 transfiziert und nach 24 h mit polyklonalem NCAM-Antikörper für 20 min stimuliert. Anschließend wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des monoklonalen, die extrazelluläre Domäne von NCAM erkennenden Antikörpers H28 untersucht.

In den unstimulierten Proben lässt sich auf dem Immunoblot das lösliche, extrazelluläre NCAM110 Fragment für die mit NCAM140 und NCAM180 transfizierten Zellen deutlich nachweisen. Diese Bande ist als einzige in den jeweiligen Spuren zu erkennen. Interessanterweise hat die Stimulation auch Auswirkungen auf die Entstehung löslicher NCAM-Fragmente. Wie in der Abb. 4.36 zu sehen ist, findet sich in den Spuren der stimulierten Zellen neben dem NCAM110 Fragment auch ein ca. 50kDa-großes Fragment.

Das Fragment scheint nicht spezifisch für eine Isoform zu sein, da in beiden Fällen eine identisch große Bande entsteht und keine weiteren Banden detektiert werden können. Da sich NCAM140 und NCAM180 nur in ihren zytoplasmatischen Domänen unterscheiden, wird hier durch den vermutlich gleichen Abbauprozess auch ein gleich großes Fragment abgelöst. Untersuchungen mit den bisher eingesetzten Inhibitoren (GM 6001, DAPT, Pepstatin, Aprotinin) zeigten keine Unterschiede zu den stimulierten Zellen, welche ohne Inhibitoren inkubiert wurden. In allen Fällen konnte man nach Stimulation ein 110kDa und ein 50kDa Fragment detektieren (Daten nicht gezeigt).

4.25 Immunzytochemische Untersuchung der Kernlokalisierung von NCAM

Anhand von Stimulationsexperimenten an CHO-Zellen sowie Cerebellum-Neuronen und anschließender Kernfraktionierung konnte in den Punkten 4.19 bis 4.22 mittels biochemischer Experimente gezeigt werden, dass NCAM140 und NCAM180 nach Antikörper-Stimulation im Zellkern translokalisiert sind. Der Einsatz von Cerebellum-Neuronen bietet die Möglichkeit, diese Kernlokalisierung mittels Immunzytochemie näher zu analysieren. Hierfür wurden Wildtyp-NCAM-Mäuse präpariert und die erhaltenen Cerebellum-Neurone für 24 h inkubiert.

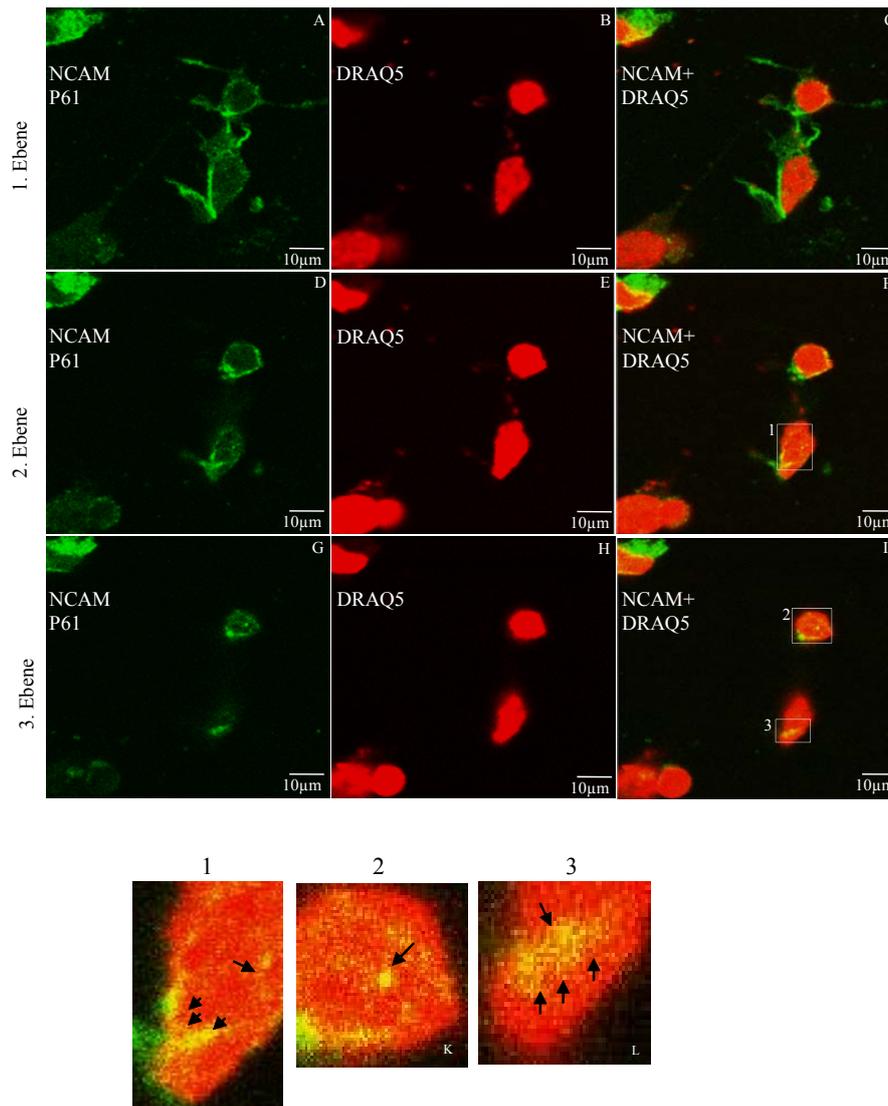


Abb. 4.37: Immunzytochemischer Nachweis von NCAM im Kern von Cerebellum-Neuronen. Auf mit PLL beschichteten Coverslips kultivierte Cerebellum-Neurone aus Wildtyp-NCAM-Mäusen wurden 24 h nach Präparation mit NCAM-Antikörper stimuliert und anschließend fixiert. Nach Permeabilisierung mit 1 % Triton X-100 wurde mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper P61 inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DRAQ5 behandelt und mit Fluoromount G eingedeckelt. NCAM wurde mit Cy2-gekoppeltem Sekundäntikörper (grün) sichtbar gemacht. Der DNA-interkalierende Kernmarker DRAQ5 ist in rot dargestellt. Die Bilder 1, 2 und 3 stellen Vergrößerungen der Bilder F und I dar.

Nach Stimulation mit polyklonalem NCAM-Antikörper wurden die Zellen fixiert und anschließend die Zellmembran sowie die nukleäre Membran permeabilisiert. Nach Behandlung mit Erst- und Zweitantikörpern wurden die Zellen abschließend mit dem Kernmarker DRAQ5 inkubiert und eingedeckelt. Die Zellen wurden am konfokalen Mikroskop sichtbar gemacht. Dabei wurden die Zellen in einem Scan-Verfahren abgetastet, welches von der Oberfläche der Zellen bis ins Zellinnere verschiedene Ebenen aufzeichnet

und darstellt. Die Abb. 4.37 zeigt in den Bildern A bis I drei verschiedene Zellschichten. Die Ebene 1, welche die Zelloberflächenmarkierung mittels NCAM-Antikörper darstellt, zeigt zwei Neurone mitsamt Zellfortsätzen. NCAM ist hier an der Zellmembran und insbesondere entlang der Neuriten deutlich zu erkennen. In der 2. Ebene ist das NCAM-staining (=Färbung) bereits schwächer, wohingegen die Kernfärbung stärker wird. In der 3. Ebene sind keine Neuriten mehr zu sehen und die Kernfärbung ist sehr intensiv. Hier ist das Zellinnere zu sehen. Die Abbildungen 4.37 1, 2 und 3 stellen vergrößerte Bereiche der Zellen oder ganze vergrößerte Zellen dar. Anhand dieser Darstellung kann man erkennen, dass NCAM im Kern lokalisiert ist. Die Co-Lokalisation von NCAM und DRAQ5 resultiert in einer gelblichen Farbgebung, angezeigt durch die Markierungspfeile.

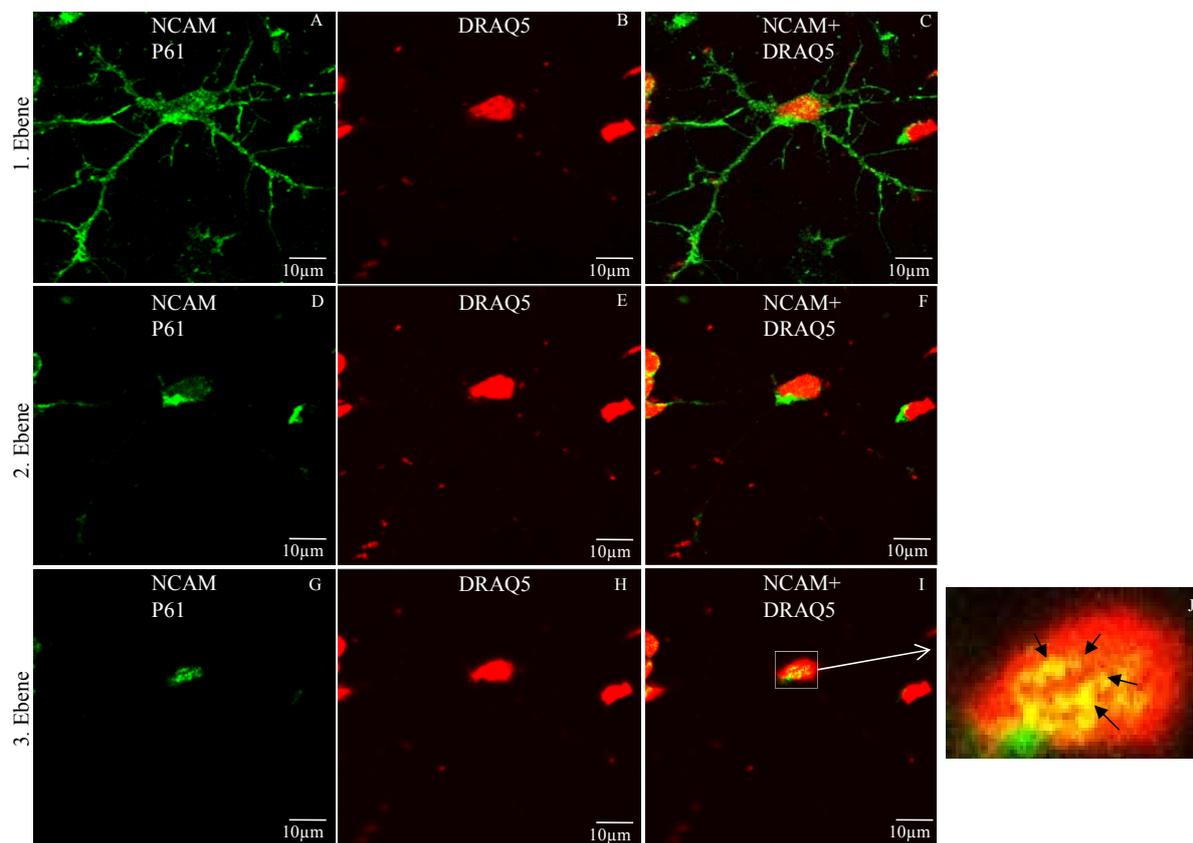


Abb. 4.38: Immunzytochemischer Nachweis von NCAM im Kern von Cerebellum-Neuronen. Auf mit PLL beschichteten Coverslips kultivierte Cerebellum-Neurone aus Wildtyp-NCAM-Mäusen wurden 24 h nach Präparation mit NCAM-Antikörper stimuliert und anschließend fixiert. Nach Permeabilisierung mit 1 % Triton X-100 wurde mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper P61 inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DRAQ5 behandelt und mit Fluoromount G eingedeckelt. NCAM wurde mit Cy2-gekoppeltem Sekundäntikörper grün sichtbar gemacht. Der DNA-interkalierende Kernmarker DRAQ5 ist in rot dargestellt. Das Bild J stellt eine Vergrößerung von Bild I dar.

Auch die Abb. 4.38 zeigt in der dritten Ebene eine deutliche Lokalisation von NCAM im Kern, wie in dem Bild J zu sehen ist. NCAM scheint in punktuellen Arealen angereichert im Kern vorzuliegen und zeigt keine flächige Verteilung über den gesamten Kern.

Die Detektion von kernlokalisierten NCAM-Fragmenten mittels gegen die extrazelluläre NCAM-Domäne gerichteten Antikörpers sollte nach den biochemischen Experimenten [s. Abb. 4.30] ebenfalls durch die Immunzytochemie verifiziert werden. Hierzu wurde statt des NCAM-Antikörper P61, welcher gegen die intrazelluläre NCAM-Domäne gerichtet ist, ein polyklonaler, gegen extrazelluläres NCAM gerichteter Antikörper eingesetzt. Die Verwendung dieses Antikörpers birgt jedoch die Problematik, dass die stimulierten Zellen möglicherweise zu viel Hintergrundsignal liefern könnten und somit das Ergebnis verfälschen würden. Jedoch sieht man auch hier an Hand der Abb. 4.39 und insbesondere der Bilder, welche der 3. Ebene entstammen, dass hier keine Zelloberflächenmarkierung von NCAM mehr zu sehen ist. Umso deutlicher lässt sich allerdings eine Kernlokalisation von NCAM auch hier detektieren, welche überdies stärker und flächiger ist, als es die Detektion mit dem gegen die intrazelluläre NCAM-Domäne gerichteten Antikörpers aufzeigen konnte [s. hierfür die Vergrößerungen in Bild 1 und 2 der Abb. 4.39].

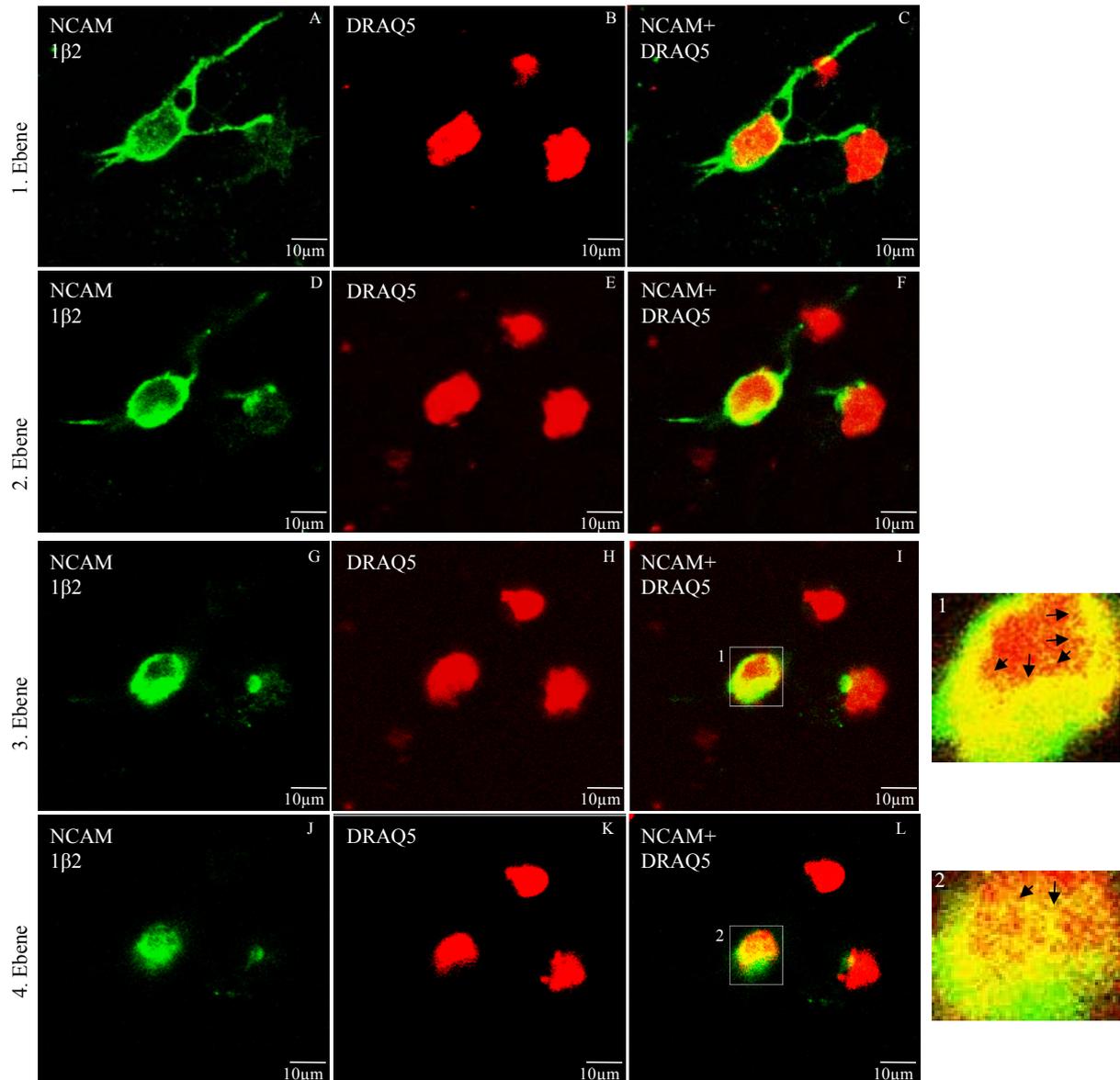


Abb. 4.39: Immunzytochemischer Nachweis von NCAM im Kern von Cerebellum-Neuronen. Auf mit PLL beschichteten Coverslips kultivierte Cerebellum-Neurone aus Wildtyp-NCAM-Mäusen wurden 24 h nach Präparation mit NCAM-Antikörper stimuliert und anschließend fixiert. Nach Permeabilisierung mit 1 % Triton X-100 wurde mit polyklonalem NCAM-Antikörper 1 β 2 inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DRAQ5 behandelt und mit Fluoromount G eingedeckelt. NCAM wurde mit Cy2-gekoppeltem Sekundäntikörper sichtbar (grün) gemacht. Der DNA-interkalierende Kernmarker DRAQ5 ist in rot dargestellt. Die Bilder 1 und 2 stellen Vergrößerungen der Bilder I und L dar.

4.26 Immunzytochemische Untersuchung der Kernlokalisierung von FAK

Der N-terminale Teil der fokalen Adhäsionskinase konnte nach Stimulation mit NCAM-Antikörper und anschließender Kernfraktionierung aus CHO-Zellen und Cerebellum-Neuronen in Teilen des Kerns nachgewiesen werden [s. Pkte. 4.17 und 4.18]. Mittels Immunzytochemie konnte dieses Ergebnis an Cerebellum-Neuronen wildtypischer NCAM-Mäuse bestätigt werden.

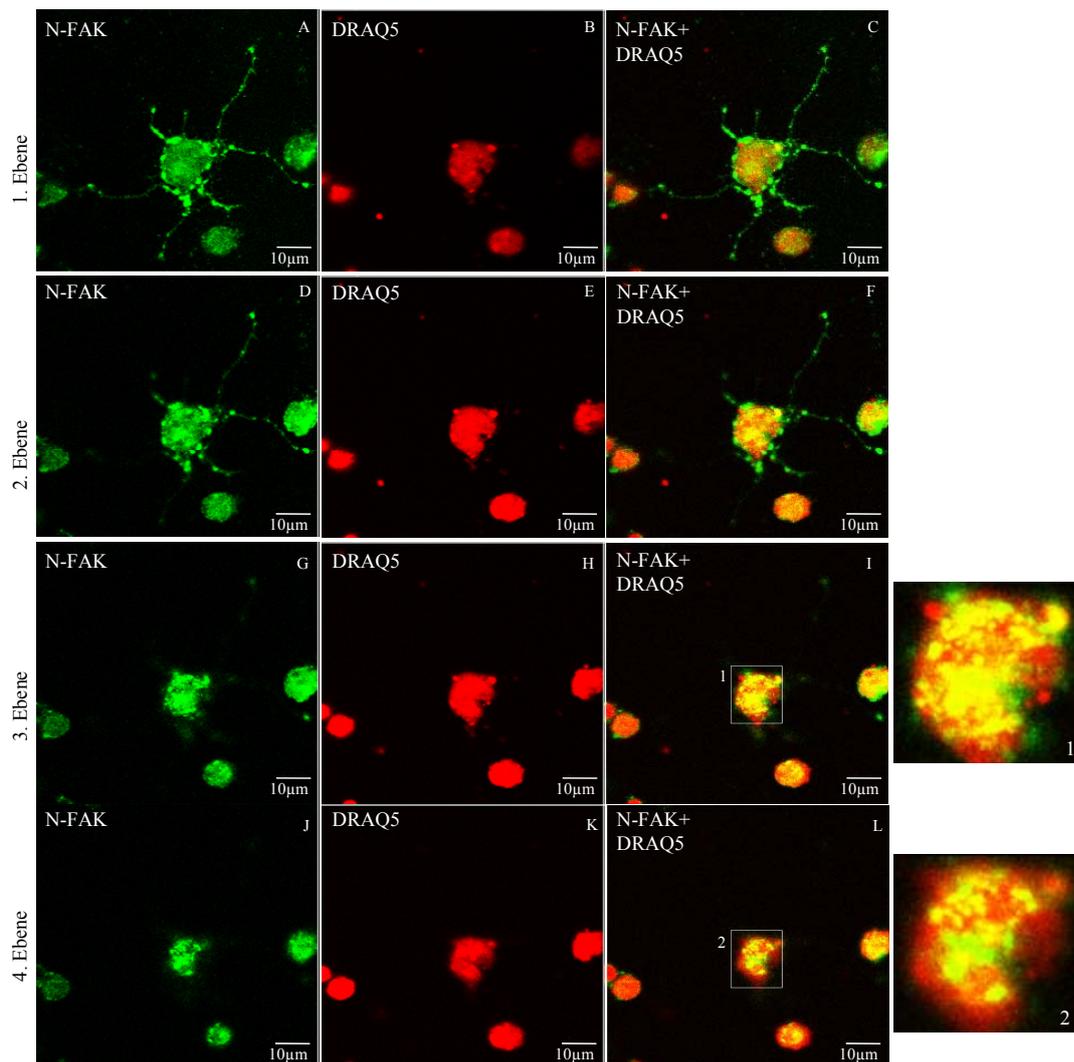


Abb. 4.40: Immunzytochemischer Nachweis von N-terminalem FAK im Kern von Cerebellum-Neuronen. Auf mit PLL beschichteten Coverslips kultivierte Cerebellum-Neurone aus Wildtyp-NCAM-Mäusen wurden 24 h nach Präparation mit NCAM-Antikörper stimuliert und anschließend fixiert. Nach Permeabilisierung mit 1 % Triton X-100 wurde mit dem polyklonalen, gegen N-terminales FAK gerichteten Antikörper A17 inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DRAQ5 behandelt und mit Fluoromount G eingedeckelt. FAK wurde mit Cy2-gekoppeltem Sekundärantikörper sichtbar (grün) gemacht. Der DNA-interkalierende Kernmarker DRAQ5 ist in rot dargestellt. Die Bilder 1 und 2 stellen Vergrößerungen der Bilder I und L dar.

Die Abb. 4.40 zeigt in den Ebenen 3 und 4 der Bilder I und L die Überlagerung der detektierten FAK- und Kernfärbung. Die Vergrößerung dieser Bilder [dargestellt in den Bildern 1 und 2] zeigt eine deutliche Lokalisation von N-terminalem FAK im Zellkern, was durch die gelbe Färbung sichtbar gemacht wird.

Als Kontrolle wurden Cerebellum-Neurone untersucht, welche nicht stimuliert wurden. In der Abb. 4.41 ist zu sehen, dass FAK im Kern nachweisbar ist. Jedoch ist die Lokalisation ohne vorangegangene Stimulation durch NCAM-Antikörper deutlich schwächer, wie man anhand der vergrößerten Ausschnitte der Bilder I und L [Bilder 1 und 2] sehen kann.

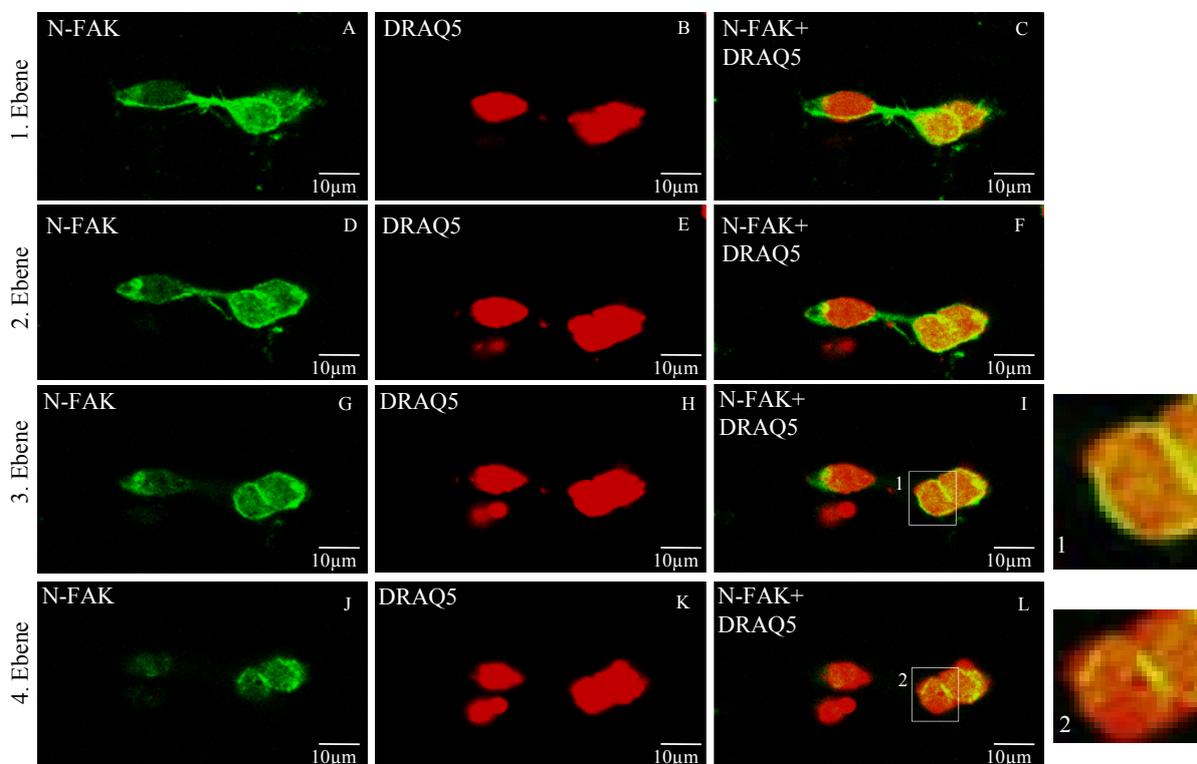
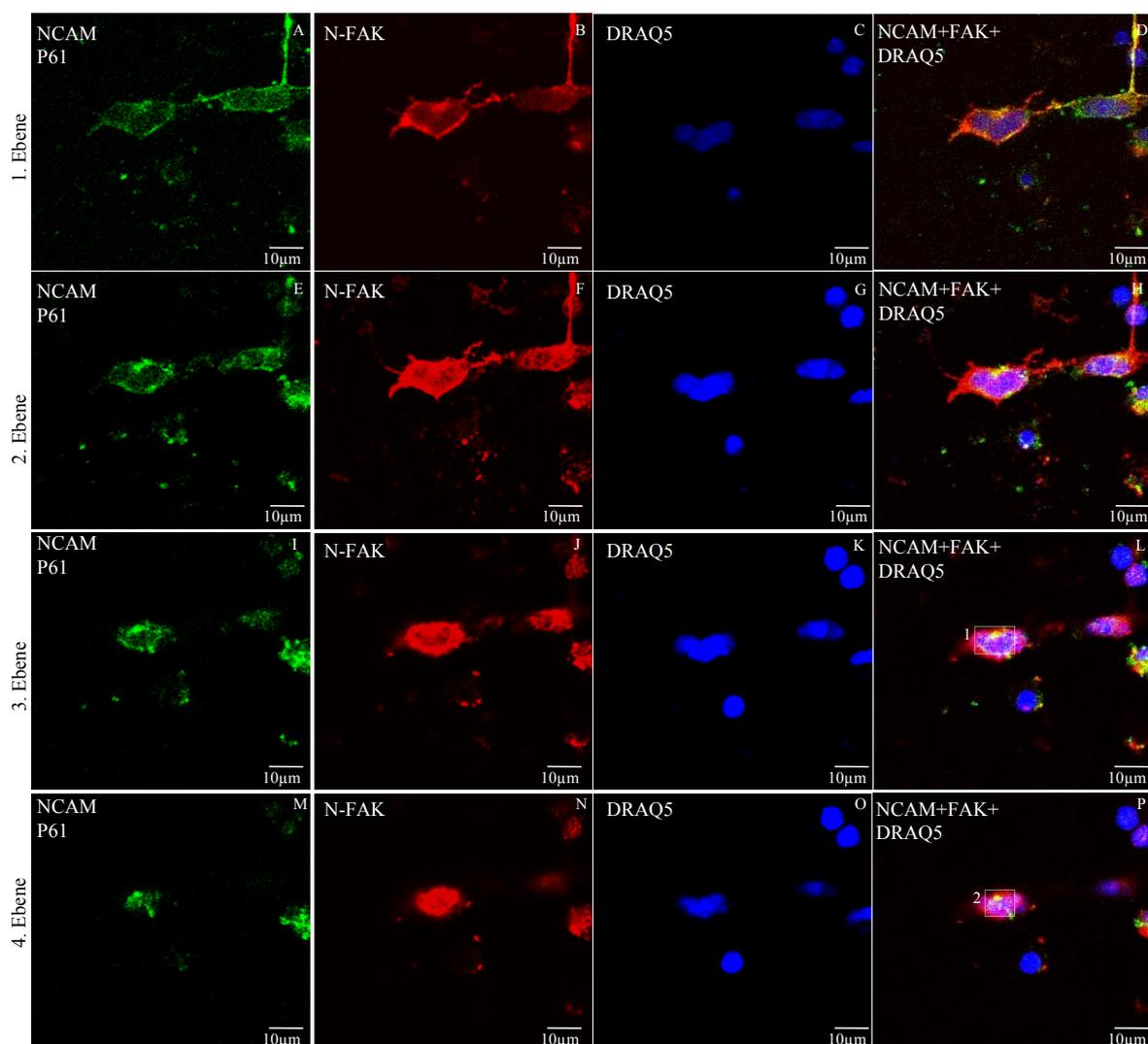


Abb. 4.41: Immunocytochemischer Nachweis von N-terminalem FAK im Kern ohne Stimulation. Auf mit PLL beschichteten Coverslips kultivierte Cerebellum-Neurone aus Wildtyp-NCAM-Mäusen wurden 24 h nach Präparation nicht mit NCAM-Antikörper stimuliert und anschließend fixiert. Nach Permeabilisierung mit 1 % Triton X-100 wurde mit dem polyklonalen, gegen N-terminales FAK gerichteten Antikörper A17 inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DRAQ5 behandelt und mit Fluoromount G eingedeckelt. FAK wurde mit Cy2-gekoppeltem Sekundäntikörper sichtbar (grün) gemacht. Der DNA-interkalierende Kernmarker DRAQ5 ist in rot dargestellt. Die Bilder 1 und 2 stellen Vergrößerungen der Bilder I und L dar.

4.27 Hinweis auf eine Co-Lokalisation von FAK und NCAM im Kern

In Immunpräzipitationsexperimenten konnte eine Interaktion von NCAM140 mit der fokalen Adhäsionskinase FAK gezeigt werden (Beggs et al., 1997), welche im FGF-Rezeptor unabhängigen Signalweg eine wichtige Rolle spielt (Niethammer et al., 2002). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kernlokalisierung von FAK und NCAM aus der Stimulation von CHO-Zellen und Cerebellum-Neuronen mit NCAM-Antikörpern resultiert. Aufgrund der beschriebenen zytosolischen Interaktion von FAK und NCAM stellt sich die Frage, ob beide Proteine nach Stimulation im Kern ebenfalls co-lokalisieren. Hierfür wurden Cerebellum-Neurone aus Wildtyp-NCAM-Mäusen nach NCAM-Antikörper-Stimulation mit einem gegen N-terminales FAK gerichteten Antikörper (rot) und einem gegen die intrazelluläre NCAM-Domäne gerichteten Antikörper (grün) angefärbt und die Kernregion mit DRAQ5 (blau) markiert. Die Co-Lokalisation von FAK, NCAM im Kern resultiert in der Überlagerung aller 3 Farben in Weiß, was durch die Markierungspfeile angezeigt wird



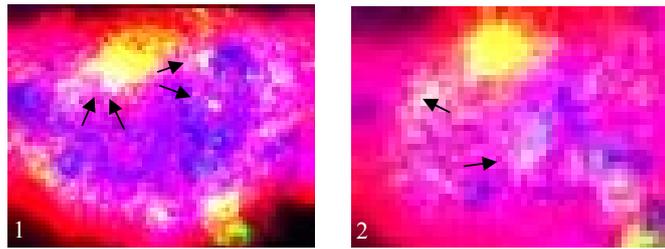


Abb. 4.42: Immunzytochemischer Nachweis der Co-Lokalisation von FAK und NCAM im Kern von Cerebellum-Neuronen. Auf mit PLL beschichteten Coverslips kultivierte Cerebellum-Neurone aus Wildtyp-NCAM-Mäusen wurden 24 h nach Präparation mit NCAM-Antikörper stimuliert und anschließend fixiert. Nach Permeabilisierung mit 1 % Triton X-100 wurden die Zellen mit FAK- (A17) und NCAM-Antikörpern (P61) inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit DRAQ5 behandelt und mit Fluoromount G eingedeckelt. NCAM wurde mit Cy2- (grün) und FAK mit Cy3- (rot) gekoppeltem Sekundäntikörper sichtbar gemacht. Der DNA-interkalierende Kernmarker DRAQ5 ist in blau dargestellt. Die Bilder 1 und 2 stellen Vergrößerungen der Bilder I und L dar. Co-Lokalisation ergibt aus der Überlagerung von den Farben Grün, Rot und Blau und Weiß. Die Co-Lokalisation ist in den Vergrößerungen 1 und 2 mit schwarzen Pfeilen markiert.

Anhand der Abb. 4.42 kann man in den vergrößerten Bildbereichen der Bilder P und L eine Co-Lokalisation von N-terminalem FAK und NCAM im Zellkern von Cerebellum-Neuronen erkennen. Die schwarzen Pfeile in den Bildern 1 und 2 markieren weiße Bereiche, die aus der Überlagerung der Farben grün (NCAM), rot (FAK) und blau (Kern) resultieren und somit eine kernmarkierte Co-Lokalisation von NCAM und FAK darstellen.

5. Diskussion

5.1 Die direkte Interaktion von NCAM140 und NCAM180 mit Calmodulin

In dieser Arbeit wurde ausgehend von früheren Ergebnissen die Interaktion zwischen dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM und dem Kalziumsensor Calmodulin untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die intrazellulären Domänen der NCAM-Isoformen NCAM140 und NCAM180 direkt an Calmodulin binden und durch Mutation des Bindemotivs diese Interaktion inhibiert wird [s. Pkt. 4.3].

Frühere Biacore-Experimente (Oberflächen-Plasmonresonanz-Analyse) konnten bereits eine Interaktion der intrazellulären Domänen von NCAM mit Calmodulin zeigen, wobei die Bindung kalziumabhängig und spezifisch ist. Die intrazellulären Domänen der Zelladhäsionsmoleküle L1 und CHL1 zeigten dabei keine Bindung (Bormann, 2001). Daran knüpfend konnte in ELISA-Studien gezeigt werden, dass die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 an Calmodulin in einer sättigbaren, kalziumabhängigen Interaktion binden (Kalus, Dissertation 2005).

Das hochkonservierte und der EF-Hand-Familie zugehörige Protein Calmodulin zählt neben seiner im Skelettmuskel vorkommenden Isoform Troponin C zu den Kalziumsensoren der eukaryontischen Zelle. Die Bindung von Kalziumionen hat eine Konformationsänderung zur Folge, die eine Interaktion mit Zielproteinen ermöglicht. Calmodulin ist so in der Lage, mit positiv geladenen, amphipatischen α -Helices, die in der Aminosäuresequenz seiner Zielproteine lokalisiert sind, zu interagieren. Mehr als hundert Enzyme können von Calmodulin reguliert werden, wobei die Vielfältigkeit des Calmodulins in seiner Wirkungsweise von verschiedenen Gruppen nachgewiesen werden konnte. Dabei ist es z.B. an der Regulation des *ectodomain shedding* der Transmembranproteine APP (*amyloid precursor protein*) (Diaz-Rodriguez et al., 2000), Tyrosin-Rezeptor-Kinase A (TrkA) (Diaz-Rodriguez et al., 2000; Llovera et al., 2004), L-Selektin (Kahn et al., 1998; Diaz-Rodriguez et al., 2000) oder L1 (Kalus et al., 2003) beteiligt. Die Applikation von Calmodulinantagonisten stimuliert die Freisetzung der extrazellulären Domäne all dieser Moleküle (Diaz-Rodriguez et al., 2000; Kalus et al., 2003). Calmodulin aktiviert z.B. die Calmodulin-abhängigen Protein-Kinasen (CaMK I und II), die in der Lage sind, andere Zielproteine zu phosphorylieren und dadurch zu aktivieren (Stryer, 1995). Calmodulin interagiert kalziumabhängig über zwei verschiedene Aminosäuremotive mit seinen potentiellen Bindungspartnern, wobei der Typ A

als „1-5-8-14“-Motiv bekannt ist. Hervorheben sollte man, dass Calmodulin in der Lage ist, Sequenzmotive in der Orientierung von Amino-nach Carboxyterminus und auch in reverser Orientierung zu binden (Rhoads und Friedberg, 1997). Die Entdeckung eines möglichen reversen Calmodulinbindungsmotivs „14-8-5-1“ in der intrazellulären Domäne der NCAM-Isoformen NCAM140 und NCAM180 nährte die Vermutung, dass Calmodulin und NCAM in einer direkten Interaktion binden. Dies zu untersuchen, resultierte in der Mutation der Calmodulinbindestelle in NCAM140 und NCAM180. Durch „*site directed mutagenesis*“ wurden in dieses Motiv vier Punktmutationen eingefügt [s. Pkt. 4.1.2]. Hierbei handelte es sich um einen sogenannten "konservativen“ Aminosäure-Austausch da vier hydrophobe Aminosäuren durch vier andere ebenfalls hydrophobe Aminosäuren ersetzt wurden, die unter anderem nicht im Calmodulinbindungsmotiv vorkommen (Tyrosin, Methionin) [s. Abb. 4.1 und 4.2].

Die Untersuchung der Bindung zwischen Calmodulin und den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 im ELISA [s. Pkt. 4.3] zeigt eindeutig, dass die Mutation zu einer Inhibierung der Kalzium-abhängigen Bindung zwischen NCAM und Calmodulin führt. Die zytoplasmatischen Domänen von Wildtyp NCAM140 und NCAM180 zeigen eine Kalzium- und NCAM-konzentrationsabhängige Bindung an das Protein Calmodulin. Frühere Beobachtungen einer stärkeren Affinität von NCAM180 zu Calmodulin wurden in Zusammenhang mit der, ausschließlich in der ICD von NCAM180 vorkommenden, von der Exon18-codierten Aminosäuresequenz gebracht. Diese soll möglicherweise in die Vermittlung der Bindung an Calmodulin involviert sein. Basierend auf den ELISA-Ergebnissen [s. Pkt. 4.3] zeigt sich jedoch, dass die direkte Bindung ausschließlich über das „14-8-5-1“-Motiv vermittelt wird, da die Mutation sowohl bei NCAM140 als auch bei NCAM180 die Interaktion unterbindet. Wie spezifisch die Interaktion zwischen der zytoplasmatischen Domäne von NCAM140 und Calmodulin ist und wie sensibel die Aktivität von Calmodulin auf die Kalziumkonzentration reagiert, zeigt sich in Abb. 4.7. An einer biologischen Membran hängen Ionenkonzentrationen vom jeweiligen Zustand der Zelle ab. Ein Reiz kann beispielsweise zur Erhöhung von Kalzium innerhalb der Zelle führen, was durch Öffnung spezifischer Kalziumkanäle gewährleistet wird und zur Aktivierung von z. B. Enzymen führt. Die Aktivierung von Calmodulin erfolgt bei einer zytosolischen Kalziumkonzentration von ~500 nM, wobei dann jede der vier möglichen Kalziumionen-Bindestellen des Moleküls besetzt sein kann. Die ELISA-Daten in Pkt. 4.4 zeigen, dass eine Interaktion zwischen Calmodulin und der intrazellulären Domäne von NCAM140 bereits bei einer Kalziumkonzentration von 100 nM nachgewiesen werden konnte. Es ist durchaus

denkbar, dass bei solch geringen Kalziumkonzentrationen, wie sie z. B. im Ruhezustand der Zelle vorherrschen, Calmodulin nicht alle Bindestellen mit Kalzium besetzt hat und die Aktivität des Moleküls damit stufenweise erfolgt. Eine niedrige Kalziumkonzentration könnte bereits zu einer Assoziation mit dem Zielprotein führen, aber die vollständige Konformationsänderung und damit Aktivierung von Calmodulin erfolgt erst nach Erhöhung des Kalziumspiegels.

5.2 Der Einfluss des Calmodulins auf die regulierte Prozessierung der membranständigen Isoform NCAM140

Die Entdeckung der direkten Interaktion der beiden Proteine führt zu einem besseren Verständnis der Modulation der regulierten Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM durch den Kalziumsensor Calmodulin, wie es bereits für das in die Leukodiapedese involvierte Protein L-Selektin geschehen ist. In dem Fall von L-Selektin interagiert das Protein Calmodulin konstitutiv mit der intrazellulären Domäne des L-Selektins in „ruhenden“ Leukozyten (Matala et al., 2001). Die Spaltung der extrazellulären Domäne von L-Selektin wird durch verschiedenste Einflüsse wie Entzündungsvorgänge (Kishimoto et al., 1989), osmotischen Stress (Rizoli et al., 1999) und bakterielle Superantigene oder Toxine (Miethke et al., 1993; Walev et al., 2000) stimuliert. An der Freisetzung der extrazellulären Domäne des Moleküls L-Selektin ist auch die in der Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen involvierte Metalloprotease ADAM17/TACE beteiligt (Peschon et al., 1998, Kalus et al., 2006). Es wird vermutet, dass eine Aktivierung der Leukozyten zu einer Aufhebung der Interaktion zwischen Calmodulin und L-Selektin führt, die eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne einhergehend mit einer Präsentation der Spaltstelle zur Folge hat (Kahn et al., 1998; Fors et al., 2001). Die Interaktion von Calmodulin mit seinen Zielproteinen kann nicht nur durch variierende Konzentrationen von Kalziumionen und damit einhergehende Konformationsänderungen des Calmodulins reguliert werden. Man könnte daher die Idee ableiten, dass ähnlich wie in dem Fall des L-Selektins NCAM konstitutiv mit dem Protein Calmodulin interagiert, was dazu führt, dass die ADAM-Schnittstelle in der extrazellulären Domäne des Moleküls für die Protease nicht zugänglich ist. Die Aktivierung einer Zelle führt zu einer Ablösung des Calmodulins von seinem Interaktionspartner NCAM,

was in einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des Membranproteins resultiert, die eine Freilegung der Schnittstelle zur Folge hat. Dass die proteolytische Prozessierung der membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180 durch Calmodulin beeinflusst zu sein scheint, zeigten bereits Experimente mit dem Calmodulin-Inhibitor CGS 9343 B. Dieser stimulierte die Freisetzung des löslichen NCAM110 Fragments nach Transfektion von CHO-Zellen mit NCAM140 (Kalus et al., 2006). Die Mutation der Calmodulinbindestelle innerhalb der intrazellulären Domäne von NCAM140 führt zu einer um den Faktor 1,3 erhöhten Freisetzung des löslichen NCAM Fragments im Zellkulturüberstand von mit mutiertem NCAM140 Δ CaM transfizierten CHO-Zellen gegenüber CHO-Zellen, die mit Wildtyp NCAM140 transfiziert wurden [s. Pkt. 4.5]. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass Calmodulin einen Einfluss auf die Prozessierung von NCAM hat und dass die Mutation der Calmodulinbindestelle einen unmittelbaren Einfluss auf die extrazellulären Ereignisse am NCAM hat. Weiterhin wird deutlich, dass die Interaktion über eine direkte Bindung von Calmodulin an die intrazelluläre NCAM-Domäne erfolgt. Die Entstehung löslicher Fragmente der GPI-verankerten Isoform NCAM120 muss auf andere Mechanismen zurückzuführen sein. Frühere Ergebnisse zeigten nämlich, dass die Freisetzung des löslichen NCAM-Fragmentes in den Zellkulturüberständen von transient mit NCAM120 transfizierten Zellen keinen Effekt auf den Calmodulin-Inhibitor ausübten (Kalus, Dissertation 2005).

5.3 Der Einfluss von Calmodulin auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum

Es ist auffällig, dass gerade der Prozess des Neuritenwachstums während der Entwicklung und der Regeneration des zentralen Nervensystems durch die Modulationen des Zytoskeletts reguliert wird, was unter anderem auch von dem Zelladhäsionsmolekül NCAM beeinflusst wird. Der Vorgang des Neuritenwachstums setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen: zunächst bildet eine Zelle Filopodien aus, deren Entstehung ausschließlich auf einem durch das Aktinzytoskelett-vermittelten Mechanismus basiert. Dieser Vorgang resultiert in einer gerichteten Vorwärtsbewegung des Wachstumskegels, der die Spitze eines auswachsenden Neuriten bildet. Im Folgenden kommt der zweite Prozess zum tragen, der zu einer Verlängerung des Neuriten führt, die durch Mikrotubuli und nicht durch das Aktinzytoskelett vermittelt wird. Für das Protein NCAM konnte eine Beteiligung

an dem durch das Aktinzytoskelett vermittelten und gerichteten Auswachsen des Wachstumskegels nachgewiesen werden (Takei et al., 1999). NCAM ist in der Lage sowohl in seiner Funktion als membrangebundener Rezeptor als auch als immobilisiertes Substrat der extrazellulären Matrix (EZM) NCAM-abhängiges Neuritenwachstum zu stimulieren (Ronn et al., 2002). Möglicherweise werden Interaktionen im Bereich des Wachstumskegels, die durch das Molekül NCAM vermittelt werden, von dem durch das Aktinzytoskelett regulierten Prozess des *ectodomain shedding* beeinflusst. Carenini et al. konnten zeigen, dass die Auflösung des Aktinzytoskeletts durch Cytochalasin D zu einer massiven Reduktion von NCAM-vermittelten Zell-Zell-Kontakten führt (Carenini et al., 1998). Es liegt die Vermutung nah, dass der Abbau des Aktinzytoskeletts eine verstärkte Prozessierung des Moleküls NCAM zur Folge hat, die in einer Aufhebung von Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen resultiert. Genau dies konnte später von Kalus et al. bestätigt werden: Die Aktin-destabilisierenden Substanzen Cytochalasin D und Latrunculin B stimulierten die Proteolyse von NCAM. Es kam zu einer Zunahme des löslichen Fragmentes NCAM110 in den Zellkulturüberständen der behandelten N2a-Zellen um etwa 100 % im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Aus den Ergebnissen folgte, dass das Aktinzytoskelett, nicht aber Mikrotubuli, an der Regulation der Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls NCAM beteiligt sind (Kalus et al., 2006).

Dies ermöglicht einem wachsenden Neuriten in Abhängigkeit von attraktiven oder repulsiven Stimuli neue Wege einzuschlagen, mit anderen Nervenbahnen und Axontrakten zu assoziieren und somit die Entwicklung des Nervensystems in einem besonderen Maße zu beeinflussen.

So blieb die Frage zu klären, welchen Einfluss der mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 interagierende und die regulierte Proteolyse von NCAM negativ beeinflussende Kalziumsensor Calmodulin auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum ausübt. In der Arbeit von Kalus (Dissertation, 2005) durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass nicht nur die regulierte Proteolyse von NCAM, sondern darüber hinaus auch das Molekül Calmodulin eine bedeutende Rolle für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum spielt. Der Einsatz des Calmodulin-Inhibitors CGS 9343 B führte zu einer massiven Reduktion des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums, wohingegen PLL-, Laminin- oder L1-abhängiges Neuritenwachstum vom Inhibitor nicht beeinflusst wurde. Damals wurde die Vermutung aufgestellt, dass möglicherweise die direkte Interaktion der Proteine NCAM und Calmodulin eine besondere Rolle für den Prozess des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums spielt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 direkt an Calmodulin binden [s. Pkt. 4.3]. Durch den Einsatz der

Calmodulinbindemutante in Neuritenwachstumsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die inhibierte Bindung zwischen Calmodulin und NCAM140 zu einer signifikanten, drastischen Reduktion des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums führt. Die Inhibition der Bindung in hippocampalen Neuronen führt zu einer Verkürzung der Neuriten auf unterhalb der im Kontrollansatz gemessenen Neuritenlängen. Die mit Wildtyp NCAM140 transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zum Kontrollansatz eine Stimulation des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums [s. Pkt. 4.7].

Insofern lassen sich folgende Überlegungen anschließen: die Stimulation von NCAM-vermitteltem Neuritenwachstum führt über verschiedene Signaltransduktionswege zu einer Mobilisierung von Kalziumionen sowohl aus der Umgebung der Zelle als auch aus intrazellulären Kalziumspeichern. Erhöhte Kalziummengen im Inneren einer Zelle haben daraufhin unmittelbaren Einfluss auf den Kalziumsensor Calmodulin. Neben der Regulation der Aktivität von zahlreichen Enzymen, moduliert Calmodulin über eine Interaktion mit Proteinen wie Spektrin (Stromqvist et al., 1988; Steiner et al., 1989), β -Adducin (Scaramuzzino und Morrow, 1993) oder Caldesmon (Ikebe et al., 1990; Marston et al., 1994) zahlreiche vom Zytoskelett vermittelte Vorgänge. Spektrin, β -Adducin und Caldesmon übernehmen die Rolle von „Linker“-Proteinen, die eine Brücke zwischen Zelladhäsionsmolekülen und dem Zytoskelett bilden und so über eine Bindung von Komponenten der EZM eine Verankerung der Zelle in ihrer Umgebung ermöglichen. Über Spektrin ist bekannt, dass es zu den Interaktionspartnern von NCAM zählt. Genauer genommen gilt Spektrin als das erste Molekül, bei dem eine intrazelluläre Bindung zum Transmembranprotein NCAM nachgewiesen werden konnte (Pollerberg et al., 1987). Nachdem lange Zeit ausschließlich die Isoform NCAM180 als Bindungspartner für Spektrin galt, zeigten Studien mehr als 10 Jahre später auch eine Interaktion zwischen NCAM140 und Spektrin (Leshchyn'ska et al., 2003; Büttner, 2004).

So ist denkbar, dass Calmodulin durch eine direkte Bindung an das Molekül NCAM die durch das Protein Spektrin vermittelte Interaktion mit dem Aktinzytoskelett aufhebt. In ähnlicher Weise wirkt Calmodulin als eine Art Antagonist auf die Interaktion des NMDA-Rezeptors mit dem Zytoskelett-assoziierten Protein α -Aktinin (Wyszynski et al., 1997). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Calmodulin indirekt, vermittelt durch eine Spaltung des Linkerproteins Spektrin unter Beteiligung von Calpain-Proteasen, die Fähigkeit des Spektrins, an das Aktinzytoskelett zu binden, verhindert (Harris und Morrow, 1988; Harris und Morrow, 1990). Eine Aufhebung der Interaktion von NCAM mit dem Aktinzytoskelett würde die Stabilität von Zellkontakten, aber auch Zell-Matrixinteraktionen und die damit verknüpfte Verankerung

einer Zelle in ihrer Umgebung massiv beeinflussen. Die darüber hinaus durch das Aktinzytoskelett und das Protein Calmodulin beeinflusste regulierte Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls ermöglicht in ihrer Eigenschaft eines kurzfristig einsetzbaren Mechanismus die Aufhebung der Verankerung des richtungsweisenden Wachstumskegels eines auswachsenden Neuriten. Eine Zelle ist so in der Lage, ausgelöst durch Signaltransduktionsprozesse, sehr schnell auf richtungsweisende Stimuli in ihrer Umgebung zu reagieren. Welchen Effekt könnte eine inhibierte Calmodulinbindung von NCAM neben dem signifikant reduzierten NCAM-abhängigen Neuritenwachstum also noch zeigen?

5.4 Kann ein Kalziumsensor Einfluss auf die Morphologie einer Nervenzelle haben?

Das eine Beeinträchtigung der Interaktion von Calmodulin mit dem Zelladhäsionsmolekül NCAM zu morphologischen Veränderungen in hippocampalen Zellen führen kann, mag einen weiteren Hinweis auf die Verbindung zu Spektrin liefern. Führt man das oben eingeleitete Gedankenmodell weiter aus, so könnte eine Aufhebung der Calmodulin-abhängigen Interaktion zwischen Spektrin und NCAM zu einer stärkeren Assoziation mit dem Aktinzytoskelett führen. Die Abb. 4.15 zeigt, dass eine reduzierte Assoziation zwischen NCAM140 und Calmodulin in hippocampalen NCAM-defizienten Neuronen zu einem deutlich gestörten Zellbild führt. Die Zellen neigen zur Ausbildung vieler dornartiger Verlängerungen und Auswüchse, die teils unmittelbar vom Zellkörper selbst ausgehen und nur wenige μM lang sind. Ungewöhnliche Verzweigungen sind bei den meisten Zellen zu beobachten. Auf Grund des nicht gebundenen Calmodulins kann es möglicherweise zu einer verstärkten Assoziation von Spektrin/NCAM mit dem Aktinzytoskelett kommen. Durch von außen applizierte Stimuli (z. B. NCAM-Fc) wird in den Zellen eine Signaltransduktion eingeleitet, die zu verstärktem Neuritenwachstum führen soll und die Zelle kann über ihre Ausläufer mit Richtungswechseln reagieren, wofür die Aufhebung der Assoziation von Spektrin mit NCAM und dem Aktinzytoskelett eine Voraussetzung ist. Ist dieser Informationsfluss durch die gestörte Interaktion von Calmodulin und NCAM unterbunden, kann in den Zellen kein gerichtetes Neuritenwachstum mehr gewährleistet werden. Das Zytoskelett stellt auf Grund des anhaltenden Reizes aber den Ausbau nicht ein und es entstehen Zellausläufer, die nicht zielgerichtet sind.

5.5 Calmodulin beeinflusst nicht die NCAM-Zelloberflächenlokalisation

Eine grundlegende Eigenschaft des Transmembranproteins NCAM ist seine Lokalisation an der Oberfläche neuronaler Zellen. Die extrazelluläre Domäne von NCAM ist an kalzium-unabhängigen Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen beteiligt, die bei der Proliferation, der Zellmigration, dem Neuritenwachstum, der Axonbündelung und bei der Ausbildung von synaptischen Kontakten eine Rolle spielen (Cremer et al., 1997a; Doherty et al., 1990; Doherty and Walsh, 1992; Fields and Itoh, 1996; Jorgensen, 1995; Schachner, 1991; Sporns et al., 1995). NCAM kann sowohl homophile als auch heterophile Wechselwirkungen eingehen. Es gibt verschiedene Modelle der homophilen Bindung, die entweder von einer reinen *trans*-Interaktion ausgehen oder das zusätzliche Auftreten von homophilen *cis*-Interaktionen postulieren (Ranheim et al., 1996; Rao et al., 1994). NCAM ist in zahlreiche heterophile intra- und extrazelluläre Proteininteraktionen involviert. Die extrazelluläre Interaktionsfähigkeit von NCAM vermittelt z. B. eine Kommunikation mit Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wie dem FGF und dem FGF-R (Kiselyov et al., 2003) oder dem GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) und seinem Co-Rezeptor (GFR α 1, *GDNF family receptor α*) (Paratcha et al., 2003; Sjostrand et al., 2007).

Die extrazelluläre Domäne von NCAM setzt sich aus etwa 700 Aminosäuren zusammen, die aufgeteilt auf fünf N-terminale Ig-ähnliche Module (Ig 1-5) und zwei membrannahe Fibronectin-Typ III ähnliche Domänen (FnIII 1-2) sind (Cunningham et al., 1987). Die generelle Zusammensetzung der extrazellulären Region wird durch alternatives Spleißen sechs kleiner Exonregionen innerhalb des NCAM-Transkripts moduliert (Small et al., 1988).

Extrazelluläre NCAM-Interaktionen werden durch die Glykosylierung des Proteins vermittelt. NCAM weist sechs Konsensussequenzen für eine N- Glykosylierung auf (N-1 bis N-6). Diese Sequenzen sind über alle Spezies hochkonserviert und können alle glykosyliert werden (Albach et al., 2004). Innerhalb einer sogenannten MSD1-Region (*muscle specific domain 1*) (Dickson et al., 1987; Thompson et al., 1989), welche sich zwischen den FnIII Domänen 1 und 2 befindet, ist eine O-Glykosylierungsstelle lokalisiert (Walsh et al., 1989). Damit sind die Ig1, Ig2, FnIII1 und FnIII2 Domänen im extrazellulären NCAM-Teil unglykosyliert.

Eine Besonderheit von NCAM konnte an den N-5 und N-6 Positionen der Ig5 Domäne nachgewiesen werden, da hier ein für Zelladhäsionsmoleküle unüblicher Zucker binden kann, das bereits angesprochene PSA (Liedtke et al., 2003; Von der Ohe et al., 2002; Wuhler et al., 2003). Aufgrund der PSA-Glykosylierung können Ketten von bis zu 30 negativ geladenen Sialinsäureresten (Sialinsäure = Oberbegriff für die N- und O-Derivate der Neuraminsäure) an

die extrazelluläre NCAM-Domäne geknüpft sein (Von der Ohe et al., 2002), welche einen großen Einfluss auf extrazelluläre heterophile und homophile NCAM-Interaktionen haben können. Demzufolge kann PSA als Modulator von NCAM-vermittelter Zelladhäsion dienen und Prozesse der Zellmigration, des Neuritenwachstums und der synaptischen Plastizität beeinflussen (Bonfanti, 2006; Gascon et al., 2007; Rutishauser, 2008).

In dieser Arbeit wurde bislang auf Grund der Mutation der intrazellulären Calmodulinbindestelle in den Isoformen NCAM140 und NCAM180 ein deutlich reduziertes NCAM-abhängiges Neuritenwachstum gezeigt [s. Pkt. 4.7] und die Entstehung der löslichen NCAM 110kDa-Form im Überstand transient mit NCAM140 Δ CaM transfizierter CHO Zellen nahm zu [s. Pkt. 4.5]. Im Hinblick auf die wichtige Eigenschaft von NCAM als Zelladhäsionsmolekül, nämlich an die Oberfläche neuraler Zellen transportiert zu werden, wurde in Oberflächenbiotinylierungsexperimenten gezeigt, dass Calmodulin diesen Vorgang nicht beeinflusst und hierin gar nicht oder nicht signifikant involviert ist. In Zellen, welche mit mutiertem NCAM (NCAM140 Δ CaM und NCAM180 Δ CaM) transfiziert wurden, konnte NCAM an der Zelloberfläche detektiert werden. Ebenso konnte in hippocampalen NCAM-defizienten Mausneuronen, welche mit NCAM140 Δ CaM transfiziert wurden, durch eine Lebendzellfärbung die Lokalisation von NCAM an der Zelloberfläche nachgewiesen werden [s. Pkt. 4.8]. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Bindung von Calmodulin keinen direkten Einfluss auf die extrazelluläre Domäne von NCAM hat. Bindet Calmodulin nicht an NCAM, stört dies nicht den Transport von NCAM an die Zelloberfläche. Daher richtet sich der Blick bei der Suche nach den Gründen für das reduzierte, NCAM-abhängige Neuritenwachstum *downstream* (=stromabwärts) in der Signaltransduktionskette. Ist Calmodulin etwa an der Lokalisation von NCAM innerhalb der *lipid rafts* beteiligt?

5.6 Die *lipid raft*-Lokalisation und die Palmitoylierung von NCAM sind essentiell für NCAM-abhängiges Neuritenwachstum

Die Frage nach der Lokalisation von NCAM in *lipid rafts* ist im Zusammenhang mit dem mutierten Calmodulinbindungsmotiv äußerst interessant. Da die Punktmutationen, die eine Interaktion mit dem Protein Calmodulin inhibieren, mit den Palmitoylierungsstellen (vier Cysteine) überlappen, scheint sich zwangsläufig ein sterisches Problem aufzudrängen.

Die Verknüpfung eines Palmitinsäurerestes mit der Aminosäure Cystein führt zu einer Insertion des NCAM140 in *lipid rafts*, die in einer Aktivierung des für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum essentiellen Nicht-Rezeptortyrosin-Signaltransduktionsweges resultiert (Niethammer et al., 2002). Möglicherweise beeinflusst die Modifikation der intrazellulären Domäne der Isoformen NCAM140 und NCAM180 durch Mutation des Calmodulinbindemotivs die Insertion von NCAM in *lipid rafts*. Denkbar aber auch, dass die Modifikation durch Palmitoylierung der intrazellulären Domäne der Isoformen NCAM140 und NCAM180, ähnlich wie die Phosphorylierung der Proteine MARCKS, *neurogranin* oder *neuromoduli* (Alexander et al., 1987; Hartwig et al., 1992; Huang et al., 1993), die Interaktion mit dem Molekül Calmodulin beeinflusst oder gar unterdrückt. Daraus resultiert folgende Hypothese: Ähnlich wie in dem Fall des L-Selektins interagiert NCAM konstitutiv mit dem Protein Calmodulin und verhindert so durch eine Maskierung der Cysteine eine Palmitoylierung der intrazellulären Domäne. Die Aktivierung einer Zelle führt zu einer Ablösung des Calmodulins von seinem Interaktionspartner NCAM, was zu einer Palmitoylierung und einer damit einhergehenden Insertion in *lipid rafts* führt. Wenn durch Mutation also die Bindung zwischen Calmodulin und NCAM inhibiert ist, könnte dies möglicherweise in einer dauerhaften Palmitoylierung und somit *lipid raft*-Lokalisation von NCAM resultieren? Wäre NCAM hierdurch noch stimulierbar, wenn durch die Calmodulin-vermittelte Demaskierung bestimmte Interaktionspartner außerhalb der Zelle nicht binden können? Denkbar wäre, dass die Mutation des Calmodulinbindungsmotivs zu einer erhöhten Insertion von NCAM in *lipid rafts* führt oder die posttranslationale Modifikation an NCAM dermaßen stört, dass die Palmitoylierung inhibiert wird. Wie bereits erwähnt, stellt die Insertion des NCAM140 in Membranmikrodomänen eine Voraussetzung für den Prozess des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums dar, der unter anderem durch eine ständige Modulation von Zell-Zell- und Zellmatrixinteraktionen und massive Umstrukturierungen des Zytoskeletts charakterisiert wird (Niethammer et al., 2002).

Überraschenderweise zeigten sich bei den Untersuchungen zur *lipid raft*-Lokalisation von NCAM140 und NCAM140 Δ CaM keine signifikanten Unterschiede [s. Pkt. 4.10]. Weder akkumulierte das mutierte NCAM stärker in den Membranmikrodomänen noch inhibierte die Mutation des Calmodulinbindemotivs die *lipid raft*-Insertion von NCAM140. Fluorographische Messungen sollten Aufschluss darüber geben, ob die Mutation die Palmitoylierung beeinflusst [s. Pkt. 4.11]. Aber auch hier zeigten sich nur geringfügige Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp, die auf ungleiche Expressionspegel zurückzuführen sind.

Dies führt zunächst zu der Erkenntnis, dass das reduzierte NCAM-abhängige Neuritenwachstum, hervorgerufen durch Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären NCAM-Domäne, sich nicht durch eine veränderte Anwesenheit von NCAM in *lipid rafts* erklären lässt.

5.7 Das Calmodulinbindungsmotiv als *hot spot* der intrazellulären NCAM Domäne

Nachdem die Mutation auch auf Palmitoylierung und damit *lipid raft*-Insertion von NCAM keinen Einfluss zeigt, lohnt ein weiterer Blick auf das Calmodulinbindungsmotiv, denn es könnte weiteren Aufschluss über die Bedeutung der Interaktion zwischen Calmodulin und NCAM für das Neuritenwachstum liefern. Die Interaktion von Calmodulin mit seinen Zielproteinen kann nicht nur durch variierende Konzentrationen von Kalziumionen und damit einhergehende Konformationsänderungen des Calmodulins reguliert werden. Die Zelle bedient sich unter anderem des Mechanismus der Phosphorylierung von Aminosäureresten, die in dem Calmodulinbindungsmotiv der intrazellulären Domäne der Zielproteine lokalisiert sind. In der zytoplasmatischen Domäne der Proteine MARCKS, *neurogranin* und *neuromodulin* befinden sich Serinreste, die nach ihrer Verknüpfung mit einem Phosphatrest die Interaktion mit Calmodulin verhindern (Alexander et al., 1987; Hartwig et al., 1992; Huang et al., 1993). NCAM kann an einem seiner bis zu 49 Serin- oder Threoninreste phosphoryliert werden (Sorkin et al., 1984), was ein wichtiges Ereignis während der gesamten Entwicklung des Nervensystems darstellt (Linnemann et al., 1984). In dem Bereich des in Membrannähe lokalisierten Calmodulinbindungsmotivs in den intrazellulären Domänen der Isoformen NCAM140 und NCAM180 wurden solche Phosphorylierungsstellen nicht gefunden. Diestel et al. konnten jedoch am Tyrosinrest 734 eine weitere Phosphorylierungsstelle ausmachen, welche wichtig für das FGF-R-abhängige Neuritenwachstum ist (Diestel et al., 2004). Bei Untersuchungen der Interaktion von NCAM mit der Rezeptor-Tyrosin-Kinase TrkB fand man heraus, dass dieses Tyrosin essentiell für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum ist. Weiterhin stellte sich heraus, dass die TrkB-abhängige NCAM-Phosphorylierung erhöht bzw. abhängig von der Stimulation durch BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) ist (Cassens, 2008). Bemerkenswerterweise liegt diese Tyrosin-Phosphorylierungsstelle innerhalb des hier untersuchten Calmodulinbindungsmotivs. Durch die Mutation wurde zudem ein weiteres Tyrosin in die direkt benachbarte Position

eingefügt [s. Abb. 4.19]. Jedoch zeigte sich bei den Untersuchungen, dass die Tyrosin-Phosphorylierung durch die Mutation nicht beeinflusst wird. Es konnte weder eine Inhibition noch eine mögliche Verstärkung der NCAM-Phosphorylierung festgestellt werden, wie in Pkt. 4.12 zu sehen ist. Letzteres wäre durch das Einfügen eines zusätzlichen Tyrosins durchaus denkbar gewesen. Dies hätte aber möglicherweise in verstärktem Neuritenwachstum resultieren können. Hier allerdings führt die Mutation der Calmodulinbindestelle zu reduziertem NCAM-abhängigem Neuritenwachstum, was weder durch eine Behinderung in der NCAM-Palmitoylierung noch der -Phosphorylierung erklärt werden kann. Dieses „14-8-5-1“ Motiv innerhalb der intrazellulären NCAM-Domäne stellt immer mehr eine Art „*hot spot*“ der Interaktionen mit und Modifikationen von NCAM dar. Dennoch konnte bislang die Ursache der durch die inhibierte Calmodulinbindung resultierenden Effekte nicht lokalisiert werden. Aus diesem Grund soll ein weiterer Schritt abwärts der Signaltransduktionskaskade näher untersucht werden, nämlich die Interaktion von NCAM mit der Nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn, welche eine wichtige Rolle in NCAM-induziertem Neuritenwachstum spielt.

5.8 Fyn, ein weiterer Schritt abwärts des Signalwegs

Wie bereits erwähnt, ist die zytoplasmatische Domäne des als Rezeptor fungierenden NCAMs für die Stimulation des Neuritenwachstums wichtig. Für die *cis*-Aktivierung des FGF-Rezeptors dagegen scheint sie unbedeutend zu sein. Die Nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn (=p59fyn) konnte als eine wichtige Komponente des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums identifiziert werden. Primäre Neurone von Fyn-defizienten Mäusen zeigen eine vollständige Inhibition des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums (Beggs et al., 1994). In Neuronen von Src-defizienten Mäusen dagegen wird das L1- aber nicht das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum inhibiert. In Immunpräzipitations-Versuchen konnte 1997 erstmals eine Assoziation der Fyn-Kinase mit der zytoplasmatischen Domäne von NCAM140, aber nicht mit der von NCAM180 nachgewiesen werden (Beggs et al., 1997). Ein Teil der von der Zelle exprimierten NCAM140-Moleküle (3 %) scheint konstitutiv mit der Fyn-Kinase innerhalb der *lipid rafts* assoziiert zu sein. Die Interaktion von NCAM und Fyn wird über RPTP α vermittelt (Bodrikov et al., 2005). Obwohl eine direkte Bindung von Fyn und NCAM damit sehr unwahrscheinlich ist, wäre es dennoch interessant, ob die Mutation des Calmodulinbindungsmotivs die Assoziation zwischen NCAM140 und Fyn beeinflusst. Das

clustering von NCAM führt zu einer Umverteilung von NCAM hin zu *lipid raft*-Domänen, wobei dies ein palmitoylierungsabhängiger Vorgang ist (Niethammer et al., 2002) und nicht durch Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären NCAM-Domäne beeinflusst wird. Fyn hingegen ist hauptsächlich in *lipid rafts* vorhanden (van't Hof und Resh, 1997; Niethammer et al., 2002; Filipp et al., 2003). Eine Störung der NCAM-Fyn Interaktion könnte das reduzierte Neuritenwachstum erklären. Aber auch diese Vermutung stellte sich als falsch heraus. Wie im Pkt. 4.13 zu sehen ist, beeinflusst die Mutation die Fyn-Phosphorylierung und somit -Aktivierung nicht.

Homophile NCAM-Bindung oder durch NCAM-Antikörper ausgelöstes Verbinden von NCAM-Molekülen induziert die Assoziation einer weiteren Tyrosinkinase, der fokalen Adhäsionskinase (FAK) mit dem NCAM140-Fyn-Komplex und die Phosphorylierung beider Kinasen (Beggs et al., 1997). Wirkt sich die veränderte Calmodulinbindung von NCAM eventuell auf die Bindung zur fokalen Adhäsionskinase aus?

5.9 Die fokale Adhäsionskinase stellt einen interessanten Interaktionspartner dar

Homophile NCAM-Bindung oder durch NCAM-Antikörper ausgelöstes Verbinden von NCAM-Molekülen induziert die Assoziation einer weiteren Tyrosinkinase, der fokalen Adhäsionskinase (FAK) mit dem NCAM140-Fyn-Komplex und die Phosphorylierung beider Kinasen (Beggs et al., 1997). Die FAK wird durch Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste Tyr397 und Tyr925 aktiviert, wodurch eine Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2 (*growth-factor-receptor-bound protein 2*) entsteht (Schlaepfer et al., 1994). Grb2 bindet im Komplex mit SOS (*Son-of-Sevenless*), einem Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor, an das phosphorylierte Tyr925, woraufhin SOS die Aktivierung von Ras durch Austausch von GDP gegen GTP induziert. Es ist bekannt, dass die FAK in fokalen Komplexen mit Integrinen lokalisiert ist und Integrin-vermittelte Signale mit dem Ras-MAPK (*mitogen-activated-protein-kinase*)-Signalweg verbindet (Schlaepfer et al., 1994; Chen et al., 1998). Es wird postuliert, dass NCAM den Ras-MAPK-Signalweg mittels FAK aktiviert und dass dieser Signalweg für die maximal mögliche Stimulation des Neuritenwachstums durch NCAM notwendig ist.

Nachdem bekannt war, dass Fyn und FAK im NCAM-vermittelten Signalweg involviert sind (Beggs et al., 1997) und durch Einsatz von dominant negativen Konstrukten beider Kinasen

entdeckt wurde, dass Sie innerhalb des NCAM-vermitteltem Neuritenwachstums eine wichtige Rolle einnehmen (Kolkova et al., 2000), untersuchten Niethammer et al. den Zusammenhang der *lipid raft*-Assoziation von NCAM140 und der FAK-Aktivierung. Es zeigte sich dabei, dass die Mutation der NCAM140-Palmitoylierung oder auch die Zerstörung von *lipid rafts* durch MCD (Methyl- β -Cyclodextrin)-Zugabe in reduzierter FAK-Phosphorylierung resultierte. Stimulation von NCAM140 mittels NCAM-Antikörpern führte zu einer deutlichen FAK-Aktivierung. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die NCAM140-vermittelte Signalweiterleitung via FAK abhängig von der NCAM140 Insertion in *lipid rafts* ist (Niethammer et al., 2002). Die Zerstörung der *lipid rafts* Anordnung oder aber das Fehlen von NCAM140 innerhalb dieser Mikrolipiddomänen unterbindet die Aktivierung der FAK-Kinase durch NCAM140 (Niethammer et al., 2002).

Die Gruppe um Shinohara et al. konnte zeigen, dass die sogenannten Gruppe 1 metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 die Phospholipase C (PLC) stimulieren, was zur Mobilisierung intrazellulären Kalziums und der Aktivierung der Protein Kinase C führt. Die Stimulation von mGluR1 und mGluR5 durch Glutamat bewirkt eine Erhöhung der Tyrosin-Phosphorylierung von FAK. In mGluR1 exprimierenden Zellen wird die Glutamat-stimulierte FAK-Phosphorylierung durch den Einsatz von PLC-Inhibitoren ebenso blockiert, wie durch die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher (Shinohara et al., 2001).

In dieser Arbeit wird im Pkt. 4.15 gezeigt, dass die FAK-Phosphorylierung abhängig von der NCAM-Antikörper-Stimulation ist [s. Abb. 4.23]. Ein 125kDa-FAK-Fragment, welches Tyrosin-phosphoryliert ist, erscheint in mit NCAM140 transfizierten und mit NCAM-Antikörpern stimulierten CHO-Zellen, wohingegen bei den unstimulierten Zellen nur eine sehr schwache 125kDa-FAK-Bande zu sehen ist. Die FAK-Phosphorylierung wird zudem durch die Mutation der Calmodulinbindestelle stark beeinträchtigt und ohne NCAM-Stimulation gänzlich inhibiert. Dies zeigt, dass die Tyrosin-Phosphorylierung der fokalen Adhäsionkinase NCAM-stimulationsabhängig ist und lässt vermuten, dass die Bindung von Calmodulin an die intrazelluläre Domäne von NCAM140 diesen Vorgang unterstützt.

Dazu weiterhin interessant bei Shinohara et al.: in mGluR1 exprimierenden Zellen wird die Glutamat-stimulierte FAK-Phosphorylierung signifikant unterbunden, wenn Calmodulin-spezifische Inhibitoren eingesetzt werden. Interessanterweise inhibieren weder ein PKC- noch ein CaMKII-spezifischer Inhibitor die Glutamat-stimulierte FAK-Phosphorylierung (Shinohara et al., 2001). Ein weiteres Indiz für den Einfluss von Calmodulin auf die FAK-Phosphorylierung ist im Pkt. 4.16 beschrieben, wo unter Einsatz eines Calmodulin-spezifischen Inhibitors eine um 50 % reduzierte Tyrosin-Phosphorylierung von FAK gezeigt werden kann [s. Abb. 4.24].

5.10 Die Kernlokalisierung der N-terminalen Domäne von FAK ist NCAM-abhängig

Die Untersuchungen von Lobo und Zachary an HUVEC-Zellen (*human umbilical vein endothelial cells*) aus dem Jahre 2000 brachten interessante Ergebnisse zur subzellulären Verteilung von FAK-Fragmenten. Sie zeigen ein 50kDa-großes N-terminales und ein 120kDa großes FAK-Fragment, welche konstitutiv und spezifisch kernlokalisiert sind (Lobo und Zach, 2000). Bis zu diesem Zeitpunkt ging man davon aus, dass FAK ausschließlich an fokalen Adhäsionsstellen vorkommt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die C- und N-terminalen Abschnitte von FAK in unterschiedlichen Kompartimenten unterschiedliche Verteilungen aufweisen, da ein N-terminales FAK-Fragment von 50kDa ausschließlich im Zellkern detektiert werden konnte (Lobo und Zach, 2000). Dabei ist weiterhin interessant, dass ein 120kDa großes, N-terminales Fragment ebenfalls vornehmlich kernlokalisiert war. Die Autoren nehmen hier an, dass es sich bei dem großen Fragment um eine endogene Form von FAK handelt, welche im Kern vorliegt und am C-Terminus prozessiert ist. Es wurde gezeigt, dass bei Fehlen der C-terminalen FAT-Region FAK mit fokalen Adhäsionen assoziiert ist.

Der Verlust der Autophosphorylierungsstelle am Tyrosin 397 (Tyr379) hat bemerkenswerterweise keinen Einfluss auf die N-terminale Kernlokalisierung von FAK. Die Kinase- wie auch die FAT-Domäne zeigten sich nicht essentiell für die Akkumulation von N-terminalem FAK (Stewart et al., 2002). Durch die Phosphorylierung am Tyr397 wird eine hohe Bindungsaffinität für die Proteine Src und Fyn geschaffen (Schaller et al., 1994). Die Lokalisation von FAK an fokalen Adhäsionsstellen wird hauptsächlich von der C-terminalen FAT Domäne vermittelt (Hildebrand et al., 1993).

Der nicht-katalytische N-terminale Teil von FAK weist Homologien zur sogenannten FERM-Domäne auf, welche zuerst in einer Proteinfamilie beschrieben wurde, die die Proteine *erythrocyte band 4.1 protein*, *ezrin*, *moesin* und *radixin* umfasst (Chishti et al., 1998, Girault et al., 1999) (FERM= *FAK N-terminal band 4.1*, *ezrin*, *radixin*, *moesin homology*). Trotz aller Untersuchungen zur nukleären Lokalisation von FAK waren die Mechanismen, welche zu dieser Lokalisation führen oder eine FAK-Akkumulation im Zellkern fördern oder regulieren, lange Zeit unklar und zudem die biologische Rolle von nukleärem FAK wenig bis gar nicht beschrieben. In der kürzlich erschienenen Arbeit von Lim et al. konnte gezeigt werden, dass nukleäres FAK die Zellproliferation und das Zellüberleben über FERM-vermittelte p53-Degradation beeinflusst (Lim et al., 2008).

Das Tumorsuppressorprotein p53 wurde 1979 unabhängig voneinander von David Lane und Arnold Levine entdeckt (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Der humane Tumorsuppressor p53 reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (=des programmierten Zelltods) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 in der Literatur als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Die besondere medizinische Bedeutung erklärt sich aus dem Befund, dass p53 in nahezu 50 % aller menschlichen Tumoren mutiert ist. Der Verlust der p53-Funktion spielt daher eine kritische Rolle bei der Entstehung von Krebs, ist jedoch nicht der ursächliche Auslöser für das unkontrollierte Wachstum von Zellen. Die Akkumulation von p53 hat viele Folgen. So werden einerseits DNA-Reparatur-Mechanismen in Gang gesetzt, andererseits wird der Zellzyklus gestoppt. Letzteres geschieht dadurch, dass p53 als Transkriptionsfaktor die Produktion des Enzyms p21 induziert. p21 wiederum hemmt sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex. Diese werden eigentlich benötigt, um einen vom Protein pRB gebundenen weiteren Transkriptionsfaktor (E2F) freizusetzen, der den Zellzyklus vorantreiben würde. Die Zelle bekommt also durch p53 Zeit, sich selbst zu reparieren, bevor sie sich teilt. Ist die DNA wieder in Ordnung, so sinkt der p53-Spiegel wieder, p21 wird nicht mehr transkribiert und nach einer Weile geht der Zellzyklus weiter.

Lim et al. beschreiben, dass während der Ontogenese einer Maus die Inaktivierung von FAK das mesodermale Wachstum beeinträchtigt, was p53- und p21-abhängig ist. FAK fördert dabei in einer Kinase-abhängigen Art und Weise über eine erhöhte Mdm2- (*murine double minute 2*) abhängige p53-Ubiquitierung den p53-Umsatz. Mdm2 ist eine Ubiquitin-E3-Ligase und reguliert den p53-Level in Zellen (Iwakuma und Lozano, 2003). Die für die Bindung von p53 essentielle FERM-Domäne von FAK wird als eine aus 3 Lappen (F1, F2 und F3) bestehende Protein-Interaktionsdomäne beschrieben (Pearson et al., 2000, Lietha et al., 2007), welche in einer Vielzahl von Zytoskelettproteinen gefunden wurde (Chishti et al., 1998). In FAK bindet und inhibiert die N-terminale FERM-Domäne den Kinase-Teil von FAK (Cooper et al., 2003) und vermittelt die Interaktionsmöglichkeit von FAK mit den zytoplasmatischen Domänen aktivierender Rezeptoren wie den β -Integrinen (Guan und Shalloway et al., 1992; Schaller et al., 1992), dem PDGF-R (*platelet-derived growth factor receptor*) (Sieg et al., 2000), dem EGF-R (*epidermal-growth-factor-receptor*) (Sieg et al., 2000), EphA2 (*ephrin-type A 2*) (Carter et al., 2002; Miao et al., 2000) und c-Met (*mesenchymal-epithelial transition factor*) (Chen und Chen, 2006). Die p53-Inaktivierung wiederum erfordert gleich eine Kombination verschiedener Prozesse: zum einen die Bindung des FERM F1 Lappens an p53, die über F2-vermittelte Kernlokalisation, die über den F3 Lappen-vermittelte Bindung an das

Mdm2 und zudem noch proteasomale Degradation (Lim et al., 2008). Die Autoren gehen davon aus, dass FAK ein Gerüst um einen Multiproteinkomplex aus FAK, p53 und Mdm2 im Zellkern formiert. Die Anwesenheit von FAK im Kern soll die p53-Mdm2 Interaktion stabilisieren, was zu einer p53-Polyubiquitierung und daraus folgend -Degradation durch nukleäre oder zytoplasmatische Proteasomen führt (Lim et al., 2008).

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von mit NCAM140 transfizierten CHO-Zellen und von Wildtyp-Cerebellum-Neuronen durch NCAM-Antikörper zu einer Kernlokalisierung von N-terminalem FAK führt [s. Pkte 4.17, 4.18, 4.26]. Dabei ist die Entstehung eines ca. 55kDa-großen, N-terminalen FAK-Fragments sowohl in der zytosolischen Proteinfraction als auch in der Kernfraction löslicher Proteine signifikant von der NCAM-Stimulation abhängig [s. Abb. 4.25 und 4.26]. Interessanterweise unterbindet die Mutation der Calmodulinbindestelle in der intrazellulären NCAM-Domäne die Entstehung eines solchen FAK-Fragments und somit auch die Kernlokalisierung der N-terminalen FAK-Domäne. Über die Funktion eines NCAM-vermittelten, nukleären FAK-Transports ist bislang nichts bekannt.

5.11 Die Kernlokalisierung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM

Nachdem gezeigt werden konnte, dass NCAM-Antikörper-Stimulation die Translokation der fokalen Adhäsionskinase in Richtung Zellkern beeinflusst, stellte sich die Frage, ob vielleicht auch NCAM im Zellkern detektiert werden kann? Bislang konnte noch kein NCAM-Fragment dem Zellkern eindeutig zugewiesen werden.

Einige Transmembranrezeptoren wie z. B. Notch, welche an wichtigen Schritten in Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind, werden über proteolytische Prozesse reguliert. Die resultierenden intrazellulären Domänen dieser Rezeptoren liegen in prozessierter und löslicher Form vor und können im Zellkern in Transkriptionsvorgänge involviert werden (Hoppe et al., 2001; Kanning et al., 2003; Brown et al., 2003; Selkoe und Kopan, 2003; Zampieri et al., 2005). Im Gegensatz zu der lange Zeit geltenden Hypothese, dass die Übertragung von Einflüssen und Stimuli aus dem Umfeld einer Zelle über Rezeptoren in der Plasmamembran und die Weitergabe an das Innere einer Zelle mittels *second messenger*-Systemen erfolgt, werden die von aktivierten Membranrezeptoren aufgenommenen Signale durch die regulierte Proteolyse des Rezeptormoleküls in der Transmembrandomäne

weitergeleitet. Der auch als *regulated intramembrane proteolysis*, kurz RIP, bezeichnete Vorgang führt zu der Entstehung intrazellulärer, von der Membran gelöster bioaktiver Fragmente (Brown et al., 2000) und stellt eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion dar. Der nach der Abspaltung des zytosolischen, des luminalen oder extrazellulären - Proteinanteils eines Transmembranproteins entstandene Membranstumpf dient als Substrat für *intramembrane-cleaving proteases* (iCLiPs). Als an der regulierten Spaltung von Proteinen in der Transmembrandomäne beteiligte Proteasen konnten sowohl Aspartyl-, Metallo- und Serinproteasen identifiziert werden (Kopan und Ilagan, 2004). Für die Spaltung von Membranproteinen des Typs 1 wie z. B. Notch (Annaert und De Strooper, 1999; Chan und Jan, 1999) und APP (Ho und Sudhof, 2004; Cao und Sudhof, 2001) ist die sogenannte, den Aspartylproteasen zugehörige, γ -Sekretase verantwortlich. ErbB-4 (Lee et al., 2002), Syndecan 3 (Schulz et al., 2003), E-cadherin (Marambaud et al., 2002), CD 44 (Murakami et al., 2003), *p75 neurotrophin receptor* (Jung et al., 2003) und Nektin 1a (Kim et al., 2002) können als weitere Substrate der γ -Sekretase angeführt werden.

Die Untersuchungen am Zelladhäsionsmolekül L1, welches zu den Typ 1 Membranproteinen gehört zeigten, dass L1 ebenso einer regulierten Prozessierung der intrazellulären Domäne unterliegt und ein intrazelluläres L1 Fragment in den Kern translokalisiert wird (Kalus, 2006). Für NCAM180 gab es bislang nur ein vorläufiges Ergebnis: Immunpräzipitationsexperimente aus den Zellfraktionen von NCAM-Wildtyp-Mausgehirnen führten zur Detektion eines intrazellulären NCAM180-Fragments im Zellkern, welches ca. 80kDa groß ist (Friedrich, Dissertation 2006).

In der vorliegenden Arbeit wird eine NCAM-stimulationsabhängige Zellkernlokalisation von NCAM140 gezeigt, welche möglicherweise eine neue Sichtweise über NCAM-vermittelte Signaltransduktionskaskaden liefert. Die in den Pkt. 4.20 und 4.21 gezeigte Detektion eines ca. 55kDa großen NCAM-Fragments in den Zellkernfraktionen stimulierter und transfizierter CHO-Zellen führte zunächst zu der Frage, wie ein intrazelluläres NCAM-Fragment mit einem solchen Molekulargewicht entstehen kann? Die errechnete Größe der intrazellulären Domäne von NCAM140 beträgt ca. 14kDa. Da die intrazellulären Domänen zur Dimerisierung neigen, würde sich ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 28kDa ergeben. Zunächst wurde angenommen, dass hier möglicherweise eine Modifikation in Form von Ubiquitierung oder Sumoylierung der NCAM-Fragmente detektiert wurde. Diestel et al. konnten in Primärzellkultur und an N2a-Zellen zeigen, dass NCAM140 und NCAM180 im Zuge der Endozytose mono-ubiquitiert werden (Diestel et al., 2007).

Die Untersuchung zur Kernlokalisation von NCAM180 brachte ebenfalls überraschendes: NCAM180 scheint über einen NCAM-stimulationsunabhängigen Mechanismus in den Kern

transportiert zu werden. In Pkt. 4.22 ist zu sehen, dass ein ca. 100kDa-großes Fragment mit NCAM180 spezifischem Antikörper in Kernfraktionen nachgewiesen werden kann, welches unabhängig von der Antikörperstimulation entsteht [s. Abb. 4.31]. Die mutierte Calmodulinbindestelle scheint einen leicht inhibitorischen Effekt auf die Bildung dieses Fragments zu haben, unterbindet es aber nicht vollständig. Allerdings stellten die detektierten Banden weiterhin ein Rätsel dar, denn die Größe der Fragmente übertrifft zum Teil (NCAM180) deutlich das errechnete Molekulargewicht der intrazellulären Domänen von NCAM.

Ein absolut unerwartetes Ergebnis zeigte schließlich, dass sich die Zellkernfragmente neben der intrazellulären Domäne auch aus einem Teil der extrazellulären Domäne und somit ebenso der Transmembrandomäne zusammensetzen müssen, da die Detektion des 55kDa Fragments von NCAM140 und NCAM180 mit einem gegen das extrazelluläre NCAM-Epitop gerichteten Antikörper in Kernfraktionen aus stimulierten Cerebellum-Neuronen (und transient transfizierten CHO-Zellen, [s. Abb. 4.32] erfolgte [s. Abb. 4.30]. Die Mutation der Calmodulinbindestelle scheint hier die Lokalisation des NCAM-Fragments zu beeinflussen, da es in der unlöslichen Kernproteinfraktion nicht nachgewiesen werden konnte [s. Abb. 4.28 C und D]. Die Entstehung der Kernfragmente ist aber in allen Experimenten eindeutig NCAM-stimulationsabhängig. Für die NCAM-Isoform NCAM180 liegen damit offensichtlich zwei Kern-Translokationswege vor: ein 100kDa-Fragment entsteht unabhängig von NCAM-Stimulation, wohingegen ein 55kDa-Fragment nur nach Stimulation entsteht und ausschließlich mit einem gegen die extrazelluläre NCAM-Domäne gerichteten Antikörper detektiert werden kann.

In diesem Zusammenhang ist weiterhin hervorzuheben, dass die Detektion mit dem die intrazelluläre Domäne erkennenden NCAM-Antikörper 5B8 zunächst kein nukleäres NCAM-Fragment zeigte. Erst durch den Einsatz des gegen die intrazelluläre NCAM-Domäne gerichteten P61 Antikörpers wurden die Fragmente nachweisbar. Der 5B8-Antikörper detektiert am äußersten C-Terminus von NCAM und die Mutation der letzten vier Aminosäuren der intrazellulären Domäne (E, S, K und A) führt bereits dazu, dass NCAM nicht von 5B8 detektiert werden konnte (persönliche Beobachtung von Daniel Novak). Da die intrazelluläre Region des nukleären Kernfragments ausschließlich mit dem NCAM-Antikörper P61 detektiert wurde, welcher an der transmembrannahen NCAM-Sequenz bindet, ist davon auszugehen, dass NCAM weiteren Prozessierungsschritten entweder auf dem Weg zum Kern oder auch innerhalb des Zellkerns unterliegt.

Die Detektion von NCAM im Zellkern stimulierter Zellen wird durch die immunzytochemischen Untersuchungen an Cerebellum-Neuronen bestätigt [s. Punkt 4.26].

5.12 Welche Proteasen könnten an der Entstehung der unterschiedlichen kernlokalisierten NCAM-Fragmente beteiligt sein?

In dieser Arbeit konnte bisher gezeigt werden, dass NCAM sowohl stimulationsabhängig (NCAM140 und NCAM180) als auch -unabhängig (NCAM180) in den Kern translokalisiert wird und die detektierten Fragmente in ihrer Größe und Antikörperspezifität nicht nur die intrazelluläre Domäne darstellen können. Daraus ergibt sich allerdings auch zwangsläufig die Frage nach dem Vorgang, der für die Entstehung der kernlokalisierten NCAM-Fragmente der beobachteten Größen verantwortlich ist.

Im Jahre 2006 konnten Kalus et al. zeigen, dass die proteolytische Prozessierung von NCAM durch ADAM17/TACE vermittelt wird und dass dieser Prozess beim Neuritenwachstum eine Rolle spielt (Kalus et al., 2006). Zahlreiche membrangebundene Proteine existieren nicht nur als Transmembranproteine, sondern können auch in löslicher Form nachgewiesen werden. Lösliche Formen von membranständigen Proteinen werden durch die regulierte Spaltung des Moleküls in der Nähe des Membranankers in die Umgebung einer Zelle freigesetzt, ein Vorgang der von Proteasen katalysiert wird, die zu der Gruppe der *secretases* oder *sheddas* zusammengefasst werden (Hooper et al., 1997). In *in vitro* und *in vivo* Proteolysestudien konnte gezeigt werden, dass auch lösliche NCAM-Formen durch die regulierte Prozessierung der membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180 unter Beteiligung der Metalloprotease ADAM17/TACE entstehen (Kalus et al., 2006). Lösliche NCAM-Fragmente zeichnen sich durch eine extreme Vielfalt ihrer Molekulargewichte - von 110kDa bis zu 190kDa - aus. Das Molekulargewicht der extrazellulären Domäne von NCAM, die durch regulierte Prozessierung von der Zelloberfläche gespalten wird, kann durch eine Verknüpfung mit Sialinsäureketten, die aus mehr als hundert Zuckermonomeren bestehen können, dramatisch verändert werden (Kiss und Rougon, 1997). Es wurde gezeigt, dass lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM mit einem Molekulargewicht von größer als 110kDa durch die Spaltung membranständiger, glykosylierter, speziell PSA-tragender Isoformen entstehen. Die unterschiedlichen Molekulargewichte löslicher NCAM-Fragmente sind daher durch Modifikationen des Glykosylierungsmusters des Zelladhäsionsmoleküls zu erklären (Kalus et al., 2006).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob TACE auch an der Entstehung der kernlokalisierten NCAM-Fragmente beteiligt ist. In Inhibitorexperimenten konnte gezeigt werden, dass TACE an der Entstehung des ca. 100kDa-großen NCAM180-Kernfragments beteiligt ist [s. Abb. 4.33], welches nur mit dem spezifischen NCAM180-Antikörper D3 nachgewiesen werden konnte. Die Entstehung dieses Fragments scheint nicht stimulationsabhängig zu sein, wie man

anhand der Abb. 4.33 sehen kann. Die Inhibition der γ -Sekretase verhindert die Entstehung eines 100kDa-Fragments wohl nicht, allerdings scheint der Kerntransport anschließend gestört zu sein. Möglicherweise spielen hier noch unbekanntere Ereignisse in der weiteren Translokation eine Rolle. TACE scheint auch bei der Entstehung eines kernlokalisierten NCAM140-Fragments beteiligt zu sein. Wie man in der Abb. 4.28 sehen kann, entsteht nach Antikörperstimulation Calmodulin-unabhängig ein 30kDa-Fragment, was dem rechnerischen Rest des NCAM140 Moleküls nach TACE Spaltung entspricht. Die Entstehung des 100kDa-NCAM180-Kernfragments nach TACE-vermittelter Prozessierung scheint nur leicht durch die Mutation der Calmodulinbindestelle beeinflusst zu sein. Das geringfügig schwächere Bandenmuster kann auch auf einen niedrigeren Expressionspegel der Zellen zurückzuführen sein [s. Abb. 4.31]. Calmodulin ist involviert in die TACE-abhängige NCAM-Prozessierung, was einen Einfluss auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum zu haben scheint (Kalus et al., 2006). Hier scheint Calmodulin einen ähnlichen Einfluss zu haben. Beim Neuritenwachstum spielt das Calmodulinbindungsmotiv in NCAM eine entscheidende Rolle, die für die TACE-abhängige Prozessierung allerdings nicht essentiell ist. Die Entstehung der kleineren 55kDa-großen NCAM-Fragmente, welche im Zellkern nachgewiesen wurden, konnte durch den Einsatz von TACE-Inhibitoren nicht gestört werden. Auf der Suche nach den an diesen Prozessen beteiligten Proteasen wurden weitere Inhibitorexperimente durchgeführt, wobei unter anderem mit Aprotinin ein gegen Serinproteasen gerichteter Inhibitor eingesetzt wurde. Auch Serinproteasen sind an Prozessen des zentralen Nervensystems beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität, die mit aktivitätsabhängigen strukturellen Veränderungen von Synapsen gekoppelt ist. Im zentralen Nervensystem gehört der Hippocampus zu den Orten synaptischer Veränderungen. Proteine des synaptischen Spaltes wie Cadherine, Laminin, Integrin und Proteine der EZM sind in den durch synaptische Plastizität charakterisierten Prozess der Langzeitpotenzierung (LTP) involviert. Proteolytische Modifikationen dieser Makromoleküle sind ein Bestandteil des Regulationssystems der synaptischen Plastizität. Neben Calpainen und Neuropsin konnte dem „Plasmin-Plasminogen“-System und Thrombin eine Beteiligung an der Regulation der synaptischen Plastizität nachgewiesen werden (Yoshida und Shiosaka, 1999; Tomimatsu et al., 2002). Unter physiologischen Bedingungen werden Proteasen streng reguliert. Ist das Gleichgewicht zwischen Inhibitoren und Proteasen gestört, kommt es zu der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose und malignen Gliomen (Yong et al., 2001). Unter pathologischen Bedingungen kehren sich positive Eigenschaften der Proteasen in negative Effekte um. Dysregulierte Proteasen stellen somit eine große Gefahr für das Nervensystem dar.

Es zeigte sich, dass die stimulationsabhängige Entstehung von NCAM140-Kernfragmenten durch Aprotinin inhibiert wird [s. Abb. 4.35]. Die löslichen NCAM-Fragmente im Kern lassen sich zwar noch schwach nachweisen; unlösliche Fragmente können hingegen nicht detektiert werden. Unter den Serinproteasen findet sich mit Plasmin ein interessantes Molekül, was für die Generierung der Kernfragmente in Frage kommen kann. Plasmin ist eine Serinproteinase, die aus Plasminogen gebildet wird und früher auch Fibrinolytin genannt wurde.

Für das Verständnis der Entstehung der 55kDa-Kernfragmente wurden Sequenzanalysen der extrazellulären Bereiche von NCAM durchgeführt. Hierin unterscheiden sich die beiden untersuchten Isoformen bekanntermaßen nicht. Dabei konnte in der vierten Ig-Domäne von NCAM eine konservierte Sequenz von vier Aminosäuren ausgemacht werden: **R V S S**. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wird demonstriert, dass Plasmin die proteolytische Prozessierung von pro-BDNF über die Konsensussequenz **R V R R** vermittelt (Gray und Ellis, 2008). Schon länger bekannt ist, dass NCAM ein Substrat für Plasmin sein kann (Endo et al., 1998, 1999). Nimmt man dazu die Ergebnisse dieser Arbeit, so folgt die Annahme, dass nach NCAM-Stimulation sowohl NCAM140 als auch NCAM180 extrazellulär von Plasmin prozessiert werden. Die so entstandenen, membranständigen „Protein-Stümpfe“ werden über einen unbekannt Prozess aus der Membran ins Zellinnere transportiert. Eine weitere Prozessierung von NCAM muss innerhalb der intrazellulären Domäne erfolgen, jedoch nach der Calmodulinbindestelle und dem P61 Epitop, aber noch vor dem Exon18 im Falle des NCAM180. Auch hierfür gibt es bislang keine Hinweise, welche Moleküle involviert sein könnten. Zudem kann dieser „innere“ Schnitt sowohl zeitgleich mit der extrazellulären, Plasmin-vermittelten Prozessierung erfolgen oder in einem zeitlichen Abstand vorher oder nachher passieren. Aus den bislang gesammelten Daten lässt sich für die Prozessierung und Kernlokalisierung von NCAM ein Modell erstellen, welches in Abb. 5.1 zu sehen ist.

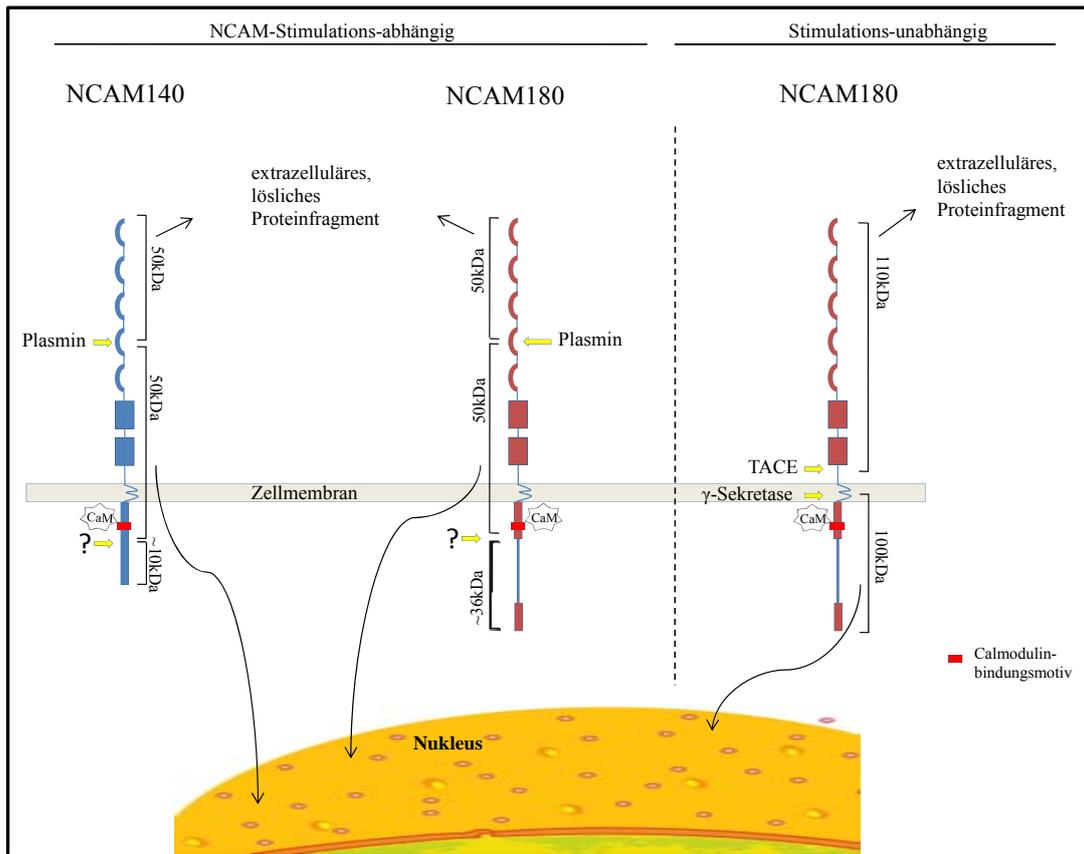


Abb. 5.1: Entstehungsmodell der prozessierten und kernlokalisierten NCAM-Fragmente. NCAM140 und NCAM180 werden stimulationsabhängig prozessiert und Fragmente werden zum einen als lösliche Proteine freigesetzt und zum anderen in den Kern transportiert. Für NCAM180 wird ein stimulationsunabhängiger, TACE- und γ -Sekretase-vermittelter Kerntransport postuliert.

5.13 NCAM und FAK: Alte Bindungspartner, neue Funktion in neuer Umgebung?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass FAK-Phosphorylierung und somit -Aktivierung von der Stimulation durch NCAM-Antikörper (über NCAM140) abhängig ist. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen der FAK-Phosphorylierung und der kalziumabhängigen Bindung von Calmodulin an NCAM gezeigt werden, wobei die Mutation der Calmodulinbindestelle die FAK-Phosphorylierung stark beeinträchtigt. Im Weiteren wurde gezeigt, dass die Stimulation durch NCAM zu einer FAK-Translokation in den Zellkern transfizierter CHO-Zellen und wildtypischer Cerebellum-Neuronen führt. Es konnten zudem unterschiedliche NCAM-Fragmente im Kern nachgewiesen werden, welche zum Teil stimulationsabhängig entstanden. Erste Hinweise auf eine Interaktion von FAK und NCAM

im Zellkern liefern die immunzytochemischen Experimente an stimulierten Cerebellum-Neuronen, an denen eine Co-Lokalisation von beiden Proteinen ausgemacht werden konnte (s. Pkt. 4.27). Gezeigt wurde bereits eine Interaktion von FAK und NCAM140 in Immunpräzipitationsexperimenten, welche eine wichtige Rolle im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum über den Nicht-Rezeptortyrosin-vermittelten Signaltransduktionsweg einnimmt (Beggs et al., 1997). Dies und die hier präsentierten Ergebnisse führen zu gleich mehreren Fragen: Was bewirkt die NCAM-induzierte FAK-Zellkernlokalisation? Interagieren FAK und NCAM im Zellkern? Was für eine Funktion könnte NCAM im Zellkern übernehmen? Welche biologische Funktion könnte daraus resultieren?

Die Ergebnisse von Lim et al. liefern einen Einblick in die Mechanismen und die Funktion von einer zuvor postulierten kernlokalisierten Interaktion von FAK mit dem Tumorsuppressorprotein p53 (Golubovskaya et al., 2005; Golubovskaya und Cance, 2007; Lim et al., 2008). Sie konnten zeigen, dass das N-terminale FAK-Fragment FERM in den Kern eindringt, wo es p53 bindet und dessen Degradation bewirkt (Lim et al., 2008). Die Bindung von FAK und Mdm2, welches p53 ubiquitiert und so zu seinem Abbau führt, stellt einen wichtigen Punkt dieser Studie dar. Weiterhin ist äußerst interessant, dass p53 nicht nur die N-terminale FAK-Domäne bindet, sondern auch die Transkription des für die fokale Adhäsionskinase codierenden Gens *FAK* inhibiert, indem es an den *FAK*-Promotor bindet (Golubovskaya et al., 2008; Golubovskaya und Cance, 2007; Golubovskaya et al., 2004). Lim et al. nehmen an, dass eine Amplifikations-Schleife von FAK das Überleben einer Zelle gewährleisten kann (Lim et al., 2008). Unterstützend ist die Tatsache, dass in malignen Zellen die FAK-Menge zunimmt, resultierend in einer höheren p53-Bindungs- und Degradationsfähigkeit von FAK. Die Repression des *FAK*-Gens wird dadurch aufgehoben und mehr FAK wird in der Zelle verfügbar sein. Dieser Vorgang soll durch einen sogenannten positiven „*feedback-loop*“ reguliert werden. Nimmt man nun den hier zum ersten Mal gezeigten Zusammenhang zwischen NCAM-Stimulation und der Kerntranslokation von FAK und bezieht es auf die von Lim et al. und von Cance und Golubovskaya erstellten Modelle zur Interaktion von FAK und p53 (Lim et al., 2008; Cance und Golubovskaya, 2008), so kann man folgendes Gedankenmodell formulieren: Die Stimulation bzw. Manipulation von Zelladhäsion *in vitro* mittels Applikation von NCAM-Antikörpern führt zu NCAM-abhängigem Neuritenwachstum via Fyn/FAK-Aktivierung und des Nicht-Rezeptortyrosin-Signaltransduktionswegs. Diese Stimulation führt zu verstärkter FAK-Phosphorylierung und vor allem zum nukleären FAK-Transport. Die Akkumulation der N-terminalen FAK-Domäne FERM im Zellkern kann stimulationsbedingt Vorgänge im Kern beeinflussen. Denkbar wäre, dass FERM als Gerüstprotein analog zum FERM-Mdm2-p53-Modell auf

Promotorsuppressorproteine, welche die Gene für FAK oder NCAM kontrollieren, wirkt und diese durch die Vermittlung von Mdm2 und anschließender Ubiquitierung zur Degradation durch Proteasomen bringt. Eine Arbeit aus dem Jahre 1998 zeigte einen Zusammenhang zwischen Mdm2, NCAM und p53 an untersuchten menschlichen Hautkrebszellen. Hierbei konnte eine Überexpression des Mdm2-Proteins im Zellkern von Fibroblasten und eine Expressionszunahme von NCAM im Zytoplasma unterschiedlicher Hautzelltypen gemessen werden (Zhao et al., 1998). Dem vorgeschlagenen Modell folgend würden diese Beobachtungen passen, da die Stimulation durch NCAM zu vermehrter NCAM-Prozessierung und FAK im Zellkern zu erhöhtem Mdm2-Level führt. Dies müsste entsprechend Lim et al. in reduziertem p53 resultieren (Lim et al., 2008). Überraschend war allerdings, dass Zhao et al. eine leichte Erhöhung von nukleärem p53 gemessen haben (Zhao et al., 1998). Es könnte allerdings auch bedeuten, dass p53 im Kern zunächst ubiquitiert wird und nicht unmittelbar durch Proteasomen abgebaut oder aus dem Zellkern transportiert wird. Möglich ist, dass die Zelle einen gewissen zeitlich abgestimmten Ablauf der Degradationsvorgänge befolgt. Diese Vorgänge müssen aber in der Zukunft noch weiter untersucht werden. Denn es bleibt noch zu klären, was für eine Funktion das nukleäre NCAM einnimmt. Da es bislang noch nicht möglich war, NCAM im Zellkern nachzuweisen, gibt es auch zu diesem Thema nur Hypothesen. Die Co-Lokalisation von FAK und NCAM im Zellkern von Cerebellum-Neuronen deutet auf eine Interaktion der Kernfragmente beider Proteine hin. Eventuell wird so die Regulation des NCAM-Gens durch einen Komplex aus NCAM/FAK-FERM zuzüglich weiteren, bislang noch unbekanntem Molekülen gewährleistet. Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von NCAM im Kern geben die bislang noch unveröffentlichten Daten von G. Wolters (persönliche Beobachtung von Gerrit Wolters): die an eine Matrix gekoppelte intrazelluläre Domäne von NCAM140 wurde für die Suche nach möglichen Bindungspartnern eingesetzt. Dabei wurden per Affinitätschromatografie lösliche Kernproteinfraktionen aus Wildtyp-Mausgehirnen analysiert und in anschließenden massenspektrometrischen Messungen die Gruppe der Histone H1 als mögliche Bindungspartner entdeckt. Histone sind Proteine, die im Zellkern von Eukaryonten vorkommen. Sie sind als Bestandteil des Chromatins für die Verpackung der DNA (es sind Spulen, um welche sich die DNA windet), aber auch für die Regulation der Expression mancher auf ihr codierter Gene von essentieller Bedeutung. Bei Eukaryonten geschieht dies in Chromosomen, deren kleinste Verpackungseinheit ein Nukleosom ist. Ein Nukleosom besteht aus acht Histonen aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Die nicht assoziierte DNA, die benachbarte Nukleosomen verbindet, wird "Linker-DNA" genannt. Es gibt mindestens sechs verschiedene Varianten von H1, die mit H1.1 bis H1.5 und H1⁰ bezeichnet werden. Das Histon H1 bindet

DNA direkt neben Nukleosomen und ermöglicht so die nächsthöhere Verpackungseinheit der DNA. Histon H1 spielt neben seiner Funktion als Gerüst für den DNA-Doppelstrang eine Rolle bei der Transkription. Ob, wie und vor allem welches der hier gezeigten, im Kern lokalisierten NCAM-Fragmente mit H1 oder anderen Bindungspartnern interagiert und welche Funktionen sie genau beeinflussen und steuern, werden zukünftige Experimente zeigen.

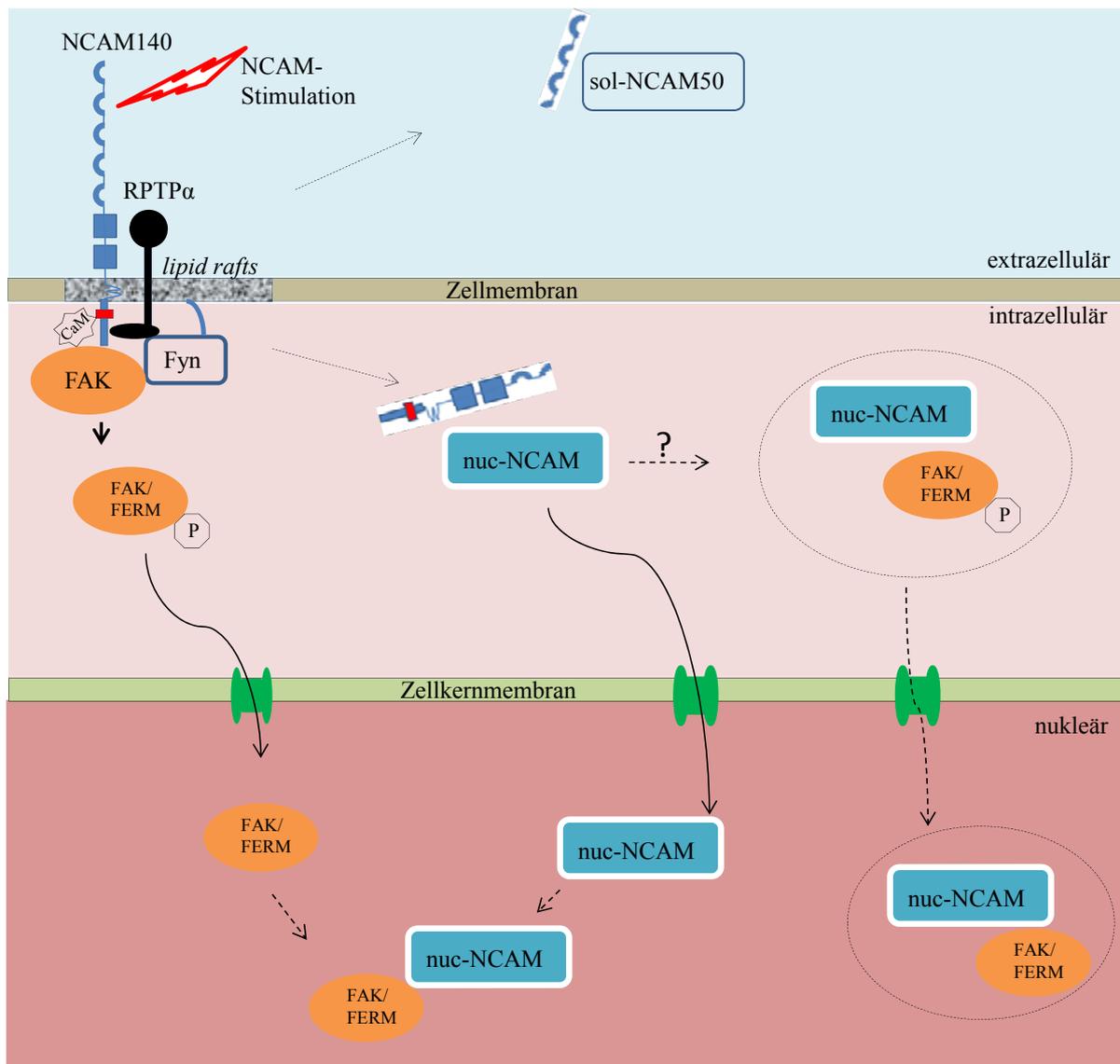


Abb. 5.2: Modell zum NCAM-abhängigen Kerntransport von FAK/FERM und NCAM. Die Stimulation von NCAM führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von zytosolischem FAK. Nach Aktivierung von FAK geht ein N-terminales FAK Fragment als FERM-Domäne in den Zellkern. NCAM wird nach Stimulation über unbekannte Wege in den Kern transportiert. Neben dem 50kDa-Fragment (nuc-NCAM), das sowohl extra- als auch intrazelluläre Teile von NCAM aufweist, können weitere unterschiedliche NCAM-Fragmente im Zellkern nachgewiesen werden. FAK und NCAM, die im Zytosol interagieren, könnten auch als Komplex zusammen in den Kern translokalisiert werden. Co-Lokalisation in Cerebellum-Neuronen weist auf eine Interaktion im Zellkern hin.

6. Zusammenfassung

In früheren Arbeiten wurde der Kalziumsensor Calmodulin als möglicher Bindungspartner für das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM entdeckt. Es konnte eine putative Calmodulinbindestelle innerhalb der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 identifiziert werden, welche die direkte Interaktion vermitteln soll.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass das inverse „14-8-5-1“ Motiv in der intrazellulären NCAM-Domäne die direkte Interaktion mit Calmodulin vermittelt. Die in dieses Motiv eingebrachten Punktmutationen inhibierten die Interaktion vollständig. Es konnte gezeigt werden, dass die Mutation der Calmodulinbindestelle das NCAM-abhängige Neuritenwachstum reduziert und sich ebenfalls auf die proteolytische Prozessierung von NCAM auswirkt. Experimente an Neuronen aus Primärkulturzellen des Hippocampus von NCAM-defizienten Mäusen weisen eine gestörte Morphologie auf, welche auf die mutierte Calmodulinbindestelle von NCAM140 zurückzuführen ist. Die Mutation hat dabei keinen Einfluss auf den Transport der NCAM-Isoformen 140 (Hippocampus-Neurone) und 140 und 180 (CHO-Zellen) an die Zelloberfläche und der Verteilung von NCAM entlang von Zellausläufern/Neuriten.

Die eingefügten Punktmutationen innerhalb des Calmodulinbindungsmotivs überlappen mit den Palmitoylierungsstellen und der Tyrosin-Phosphorylierungsstelle des NCAMs. Die Lokalisation von NCAM140 in *lipid rafts*, die essentiell für NCAM-abhängiges Neuritenwachstum ist, wird durch die Mutation der Calmodulinbindestelle nicht beeinflusst. Die für die *lipid rafts*-Lokalisation entscheidenden Palmitoylierungsstellen werden durch die Punktmutationen nicht beeinträchtigt. Die Untersuchung der Palmitoylierung mittels Fluorographie und radioaktiv markierte Palmitinsäure unterstreicht dieses Ergebnis. Weiterhin ist die Tyrosin-Phosphorylierung von NCAM, welche durch BDNF angeregt wird, nicht inhibiert.

Ein bekannter NCAM-Signaltransduktionsweg wird über die Nicht-Rezeptortyrosinkinasen Fyn und FAK vermittelt. Die Fyn-Phosphorylierung und somit Aktivierung des Fyn-abhängigen Signalwegs zeigt keine Effekte auf die Mutation der Bindestelle des Calmodulins. Die fokale Adhäsionskinase FAK hingegen, die Fyn in der Signalkette nachgeschaltet ist und ebenso mit NCAM interagiert, weist nach Stimulation durch NCAM-Antikörper die Entstehung eines zytosolischen, 55kDa-großen Fragments auf. Dieses Fragment ist nicht

nachzuweisen, wenn die Calmodulinbindestelle mutiert ist. Die FAK-Phosphorylierung und damit -Aktivierung ist NCAM-stimulations- und Calmodulin-abhängig. Die Mutation der Calmodulinbindestelle reduziert die Phosphorylierung von FAK. Weiterführende Experimente konnten einen Zusammenhang zwischen der NCAM-Stimulation und der Entstehung und Lokalisation eines N-terminalen, 55kDa großen FAK-Fragments im Zellkern von CHO- und Cerebellum-Zellen zeigen.

An mit NCAM-Antikörper stimulierten CHO-Zellen und Cerebellum-Neuronen konnte die Kernlokalisierung von NCAM nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass NCAM140 eine Calmodulin- und NCAM-stimulationsabhängige Kernlokalisierung aufweist, was durch Detektion eines 50kDa-Fragments bewiesen wurde. Die Entstehung dieses Fragments ist offenbar plasminabhängig, da der Plasmininhibitor Aprotinin einen negativen Einfluss auf diese Kernfragmente von NCAM hatte. Bei NCAM180 lassen sich zwei unabhängig voneinander entstehende Kernfragmente nachweisen. Ein ca. 100kDa-Fragment ist nur mit dem gegen die intrazelluläre NCAM-Domäne gerichteten Antikörper, welcher das NCAM180-spezifische Exon18 detektiert, zu lokalisieren. Die Entstehung dieses Fragments zeigte sich weder Calmodulin- noch NCAM-stimulationsabhängig. Allerdings führt ein TACE-spezifischer Inhibitor zur verminderten Bildung dieses Fragments. Interessanterweise entsteht ein weiteres NCAM180-Fragment, welches 50kDa-groß ist und ausschließlich nach NCAM-Stimulation im Zellkern nachweisbar ist.

Die Detektion von löslichen NCAM-Fragmenten nach Stimulation zeigte sowohl für NCAM140 als auch für NCAM180 die Entstehung eines 50kDa-Fragments im Zellkulturüberstand von CHO-Zellen.

Um die biochemischen Ergebnisse zu untermauern, konnte in immunzytochemischen Experimenten an Cerebellum-Neuronen gezeigt werden, dass nach NCAM-Stimulation sowohl NCAM als auch FAK im Zellkern vorzufinden sind. Dabei scheinen NCAM und FAK kernspezifisch zu co-lokalisieren, wie sich anhand der immunzytochemischen Ergebnisse zeigt. Die Funktion von NCAM im Kern sowie eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Transkription von Genen, dies eventuell im Komplex mit FAK, ist noch unklar.

7. Literaturverzeichnis

Abedi, H. und Zachary, I. (1995). Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res*, 30, 4, 544-556

Albach, C., Damoc, E., Denzinger, T., Schachner, M., Przybylski, M., Schmitz, B.T. (2004). Identification of N-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule NCAM by MALDI-TOF and MALDI-FTICR mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 378: 1129-1135

Albelda, S. M., Smith, C. W. und Ward, P. A. (1994). Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J*, 8: 504-12

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. (1997). *Molekularbiologie der Zelle*. VHC Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

Alcaraz, G., Goridis, C. (1991). Biosynthesis and processing of polysialylated NCAM by AtT-20 cells. *Eur J Cell Biol* 55: 165–173

Alexander, K. A., Cimler, B. M., Meier, K. E., Storm, D. R. (1987). Regulation of calmodulin binding to P-57. A neurospecific calmodulin binding protein. *J. Biol. Chem.* 262: 6108-6113

Amoureux, M. C., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., Crossin, K. L. (2000). N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci* 20: 3631–3640

Anderson, A. A., Kendal, C. E., Garcia-Maya, M., Kenny, A. V., Morris-Triggs, S. A., Wu, T., Reynolds, R., Hohenester, E., Saffell, J. L. (2005). A peptide from the first fibronectin domain of NCAM acts as an inverse agonist and stimulates FGF receptor activation, neurite outgrowth and survival. *J Neurochem.* 95(2): 570-83

Angata, K., Chan, D., Thibault, J., Fukuda, M. (2004). Molecular dissection of the ST8Sia IV polysialyltransferase. Distinct domains are required for neural cell adhesion molecule recognition and polysialylation. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24): 25883-90

Annaert, W. und De Strooper, B. (1999). Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci.* 22: 439-443

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

-
- Avraham, S., London, R., Fu, Y., Ota, S.; Hiregowdara, D., Li, J., Jiang, S.; Pasztor, L. M., White, R. A., Groopmann, J. E., Avraham, H. (1995). Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem*, 270, 46, 27742-27751
- Ausubel, L. J., Kwan, C. K., Sette, A., Kuchroo, V., Hafler, D. A. (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
- Baldwin, T. J., Fazeli, M. S., Doherty, P. und Walsh, F. S. (1996). Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules. *J Cell Biochem*, 61: 502-13.
- Barbas, J. A., Chaix, J. C., Steinmetz, M., Goridis, C.(1988). Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse. *EMBO J* 7: 625-632
- Beggs, H.E., Baragona, S.C., Hemperly, J.J., Maness, P.F. (1997). NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J Biol Chem*. 1997 Mar 28;272(13): 8310-9
- Beggs, H. E., Soriano, P., Maness, P.F. (1994). NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol*. 1994 Nov;127(3): 825-33
- Bennett, M. K., Erondy, N. E., Kennedy, M. B. (1983). Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *J Biol Chem* 258: 2735—12744
- Bhat, S. und Silberberg, D. H. (1988). NCAM-180, the largest component of the neural cell adhesion molecule, is reduced in dysmyelinating quaking mutant mouse brain. *Brain Res*. 452: 373-377
- Biochemistry (2002) Berg, Jeremy M.; Tymoczko, John L.; and Stryer, Lubert. New York: W. H. Freeman and Co.
- Blobel, C. P. 2000. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol*. 12: 606-612
- Bock, E., Braestrup, C. (1978). Regional distribution of the synaptic membrane proteins: synaptin, D1, D2 and D3. *J Neurochem* 30: 1603-1607

Bodrikov, V., Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., Overvoorde, J., den Hertog, J, Schachner, M. (2005) RPTPalpha is essential for NCAM-mediated p59fyn activation and neurite elongation. *J Cell Biol* 168: 127-139

Bonfanti, L. (2006). PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* 80: 129-164

Bormann, U. (2001). Yeast two-hybrid Systeme zur Identifikation zytoplasmatischer Interaktionspartner der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle MAG, P0 und NCAM. Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg

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

Bredt, D. S., Ferris, C. D., Snyder S.H. (1992). Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem* 267: 10976–10981

Brown, S. A., Richards, C. M., Hanscom, H. N., Feng, S. L., Winkles, J. A. (2003). The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *Biochem J.* 371(Pt 2): 395-403

Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., and Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100: 391-398

Brown, M. T. und Cooper, J. A. (1996). Regulation, substrates and functions ofsrc. *Biochem Biophys Acta.* 1287: 121-149.

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

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

Büttner, B. (2004). FU Berlin. PhD-thesis: The role of the cytoplasmic domains of the neural cell adhesion molecule in neurite outgrowth and identification of novel intracellular binding partners. <http://www.diss.fu-berlin.de/2004/92/>

Calalb, M. B., Polte, T. R., Hanks, S. K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol*, 15, 2, 954-963

Cao, X., Sudhof, T. C. (2001). A transcriptionally (correction of transcriptively) active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115-120

Cance, W. G., Golubovskaya, V. M. (2008). Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? *Sci Signal*. 1(20):pe22

Cance, W. G., Harris, J. E.,Iacocca, M. V. Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S., Xu, L. (2000): Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*, 6, 6, 2417-2423

Carafoli, E. (2002) Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3): 1115-22

Carenini, S., Schachner, M. und Martini, R. (1998). Cytochalasin D disrupts the restricted localization of N-CAM, but not of L1, at sites of Schwann cell-neurite and Schwann cell-Schwann cell contact in culture. *J. Neurocytol.* 27: 453-458

Carter, N., Nakamoto, T., Hirai, H., Hunter, T. (2002). EphrinA1-induced cytoskeletal reorganization requires FAK and p130(cas). *Nat Cell Biol.* Aug; 4(8): 565-73

Cary, L. A., Chang, J.F., Guan, J. L. (1996). Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn. *J Cell Sci*, 109, Pt 7, 1787-1794

Cassens, C. (2008). Functional consequences of interactions between the neural cell adhesion molecule NCAM, the receptor protein tyrosine kinase TrkB and the inwardly rectifying K⁺ channel Kir3.3 in *Mus musculus*. Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg

Chan, Y. M. und Jan, Y. N. (1999). Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and notch signaling. *Neuron* 23: 201-204

Chen, S. Y., Chen, H. C. (2006). Direct interaction of focal adhesion kinase (FAK) with Met is required for FAK to promote hepatocyte growth factor-induced cell invasion. *Mol Cell Biol.* 26(13): 5155-67

Chishti, A.H., Kim, A.C., Marfatia, S.M., Lutchman, M., Hanspal, M., Jindal, H., Liu, S.C., Low, S., Rouleau, G.A., Mohandas, N., J. A. Chasis, J. G. Conboy, P. Gascard, Y. Takakuwa, S.-C. Huang, E. J. Benz Jr, A. Bretscher, R. G. Fehon, J. Gusella, V. Ramesh, F. Solomon, V. T. Marchesi, S. Tsukita, S. Tsukita, M. Arpin, D. Louvard, N. K. Tonks, J. Anderson, A. Fanning, P. J. Bryant, D. F. Woods, K. B. Hoover (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci.* 1998 Aug;23(8): 281-2

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

Chou, K. H., Ilyas, A. A., Evans, J. E., Quarles, R. H., Jungalwala, F. B. (1985). Structure of a glycolipid reacting with monoclonal IgM in neuropathy and with HNK-1. *Biochem Biophys Res Commun* 128: 383-388

Cobb, B. S., Schaller, M. D., Leu, T. H., Parsons, J. T. (1994). Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol*, 14, 1, 147-155

Cooper, L. A., Shen, T. L., Guan, J. L. (2003) Regulation of focal adhesion kinase by its amino-terminal domain through an autoinhibitory interaction. *Mol Cell Biol.* (22) 8030-41

Cowin, P. und Burke, B. (1996). Cytoskeleton-membrane interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 8: 56-65

Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., Represa, A. (1987) NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci.* 8(5): 323-35

Crivici, A. und Ikura, M. (1995). Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995; 24:85-116

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

Cunningham, B. A., Hoffman, S., Rutishauser, U., Hemperly, J. J., Edelman, G. M. (1983). Molecular topography of the neural cell adhesion molecule N-CAM: surface orientation and location of sialic acid-rich and binding regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 3116-3120

Daniel H, Levenes C, Crepel, F. (1998). Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends Neurosci* 21: 401-407

Davy, A., Feuerstein, C., Robbins, S.M. (2000). Signaling within a caveolae-like membrane microdomain in human neuroblastoma cells in response to fibroblast growth factor. *J Neurochem* 74: 676-683

Delling, M. (2001). Regulation of G protein-activated inwardly rectifying potassium channels by the neural cell adhesion molecule NCAM. Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg

Derkinderen, P., Toutant, M., Burgaya, F., Le Bert, M., Siciliano, J. C., de Franciscis, V., Gelman, M., Girault, J. A. (1996) Regulation of a neuronal form of focal adhesion kinase by anandamide. *Science*. 273(5282): 1719-22

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

Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A., Montero J. C., L.Yuste, und Pandiella, A. (2000). Stimulation of cleavage of membrane proteins by calmodulin inhibitors. *Biochem. J.* 346 Pt 2: 359-367

Dickson, G., Gower, H. J., Barton, C. H., Prentice, H. M., Elsom, V. L., Moore, S. E., Roger, D. C., Quinn, C., Putt, W. und Walsh, F. S. (1987). Human muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): identification of a muscle-specific sequence in the extracellular domain. *Cell* 50: 1119-1130

Diestel, S., Laurini, C., Traub, O., Schmitz, B. (2004). Tyrosine 734 of NCAM180 interferes with FGF receptor-dependent signaling implicated in neurite growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 186-196

Diestel, S., Schaefer, D., Cremer, H., Schmitz, B. (2007). NCAM is ubiquitylated, endocytosed and recycled in neurons. *J Cell Sci.* 120(Pt 22): 4035-49

Ditlevsen, D. K., Berezin, V., Bock, E. (2007). Signalling pathways underlying neural cell adhesion molecule-mediated survival of dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 25: 1678-1684

Ditlevsen, D. K., Kohler, L. B., Berezin, V., Bock, E. (2007). Cyclic guanosine monophosphate signalling pathway plays a role in neural cell adhesion molecule-mediated neurite outgrowth and survival. *J Neurosci Res* 85:703–711. DOI 10.1007/s11064-008-9768-8

Ditlevsen, D. K. und Kolkova, K. (2008). Signaling Pathways Involved in NCAM-Induced Neurite Outgrowth. *Neurochem Res.* [Epub ahead of print]

Ditlevsen, D. K., Owczarek, S., Berezin, V., Bock, E. (2008, in press). Relative role of upstream regulators of Akt, ERK and CREB in C3d-mediated NCAM signaling. *Neurochem Int.*

Doherty, P., Ashton, S. V., Moore, S. E., Walsh, F. S. (1991). Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell* 67: 21-33

Doherty, P., Fruns, M., Seaton, P., Dickson, G., Barton, C. H., Sears, T. A., and Walsh, F. S. (1990). A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 343, 464-466

Doherty, P., Walsh, F. S. (1992). Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol.* 2(5): 595-601

Doyle, E., Nolan, P. M., Bell, R., und Regan, C. M. (1992). Hippocampal NCAM180 transiently increases sialylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in the adult rat. *J.Neurosci.Res.* 31, 513-523

Durbec, P. und Cremer, H. (2001). Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Mol.Neurobiol.* 24: 53-64

Endo, A., Nagai, N., Urano, T., Ihara, H., Takada, Y., Hashimoto, K., Takada, A. (1998). Proteolysis of highly polysialylated NCAM by the tissue plasminogen activator-plasmin system in rats. *Neurosci Lett.* 246(1):37-40

Endo A, Nagai N, Urano T, Takada Y, Hashimoto K, Takada A. (1999) Proteolysis of neuronal cell adhesion molecule by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus. *Neurosci Res.* 33(1):1-8

Erbe, D. V., Watson, S. R., Presta, L. G., Wolitzky, B. A., Foxall, C., Brandley, B. K. und Lasky, L. A. (1993). P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol,* 120: 1227-35

Fields, R. D. und Itoh. K. (1996). Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19 :473-480

Filipp, D., Zhang, J., Leung, B. L., Shaw, A., Levin, S. D., Veillette, A., Julius, M. (2003). Regulation of Fyn through translocation of activated Lck into lipid rafts. *J Exp Med.* 197(9): 1221-7

Fiscus, R. R. (2002). Involvement of cyclic GMP and protein kinase G in the regulation of apoptosis and survival in neural cells *Neurosignals* 11: 175-190

Fors, B. P., Goodarzi, K. und von Andrian, U. H. (2001). L-selectin shedding is independent of its subsurface structures and topographic distribution. *J. Immunol.* 167: 3642-3651

Friedrich, C. (2005). The interaction between tyrosine protein kinase receptor B (TrkB) and neural cell adhesion molecule NCAM in *Mus musculus*. Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg

Frisch, S. M. (1996) Reversal of malignancy by the adenovirus E1a gene. *Mutat Res.* 19;350(1):261-6.

Foxall, C., Watson, S. R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L. A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D. und Brandley, B. K. (1992). The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J Cell Biol*, 117: 895-902

Gaardsvoll, H., Krog, L., Zhernosekov, D., Andersson, A. M., Edvardsen, K., Olsen, M., Bock, E., Linnemann, D.(1993). Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule NCAM) in heart: a comparative study of newborn, adult and aged rats. *Eur J Cell Biol* 61: 100-107

Gascon E, Vutskits L, Kiss J. Z. (2007) Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 56: 101-118

Gegelashvili, G., Andersson, A. M., Schousboe, A., Bock, E. (1993). Cyclic AMP regulates NCAM expression and phosphorylation in cultured mouse astrocytes. *Eur J Cell Biol* 62: 343-351

Girault, J. A., Labesse, G., Mornon, J. P., Callebaut, I. (1999). The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains. *Trends Biochem Sci*, 24, 2, 54-57

Golubovskaya, V. M., Cance, W. G. (2007). Focal adhesion kinase and p53 signaling in cancer cells. *Int Rev Cytol.* 263: 103-53

Golubovskaya, V. M., Finch, R., Zheng, M., Kurenova, E. V., Cance, W. G.. (2008) The 7-amino-acid site in the proline-rich region of the N-terminal domain of p53 is involved in the interaction with FAK and is critical for p53 functioning. *Biochem J.* 411(1): 151-60

Golubovskaya, V. M., Finch, R., Cance, W. G.(2005). Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53. *J Biol Chem.* 280(26):25008-21. Epub 2005 Apr 25

Gomez, T. M. und Spitzer, N. C. (2000). Regulation of growth cone behavior by calcium: new dynamics to earlier perspectives. *J Neurobiol* 44: 174-183.

Grant, S. G., Karl, K. A., Kiebler, M. A., Kandel, E. R. (1995). Focal adhesion kinase in the brain: novel subcellular localization and specific regulation by Fyn tyrosine kinase in mutant mice. *Genes Dev.* 9(15): 1909-21

Gray, K. und Ellis, V. (2008). Activation of pro-BDNF by the pericellular serine protease plasmin. *FEBS Lett.* 582(6): 907-10

Hanks, S. K., Calalb, M. B., Harper, M. C., Patel, S. K. (1992). Focal adhesion protein tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 89; 8487-91

Hansen, R. K., Christensen, C., Korshunova, I., Kriebel, M., Burkarth, N., Kiselyov, V. V., Olsen, M., Østergaard, S., Holm, A., Volkmer, H., Walmod, P. S., Berezin, V., Bock, E. (2007) Identification of NCAM-binding peptides promoting neurite outgrowth via a heterotrimeric G-protein-coupled pathway. *J Neurochem* 103: 1396-1407

Hansen, O. C., Nybroe, O., Bock, E. (1985). Cell-free synthesis of the D2-cell adhesion molecule: evidence for three primary translation products. *J Neurochem* 44: 712-717

Harris, A. S. und J. S. Morrow. 1988. Proteolytic processing of human brain alpha spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J. Neurosci.* 8: 2640-2651

Harris, A. S. und J. S. Morrow. 1990. Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87: 3009-3013

Hartwig, J. H., M. Thelen, A. Rosen, P. A. Janmey, A. C. Nairn, A. Aderem. 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356:618-622

He, Q., Meiri, K. F. (2002). Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signaling from growth cones. *Mol Cell Neurosci* 19: 18-31

Hemperly, J. J., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. (1986). cDNA clones of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9822-9826

Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., Parsons, J. T. (1993). Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *J Cell Biol.* 993-1005

Hindley, S., Juurlink, B. H., Gysbers, J. W., Middlemiss, P. J., Herman, M. A., Rathbone, M. P. (1997). Nitric oxide donors enhance neurotrophin- induced neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 47:427-439

Ho, A. und Sudhof, T. C. (2004). Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 2548-2553

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

Hoffman, S., Sorkin, B. C., White, P. C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B. A. und Edelman, G. M. (1982). Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J. Biol. Chem.* 257:7720-7729

Holt, S. J., Alexander, P., Inman, C. B., Davies, D. E. (1995). Ligand-induced translocation of epidermal growth factor receptor to the nucleus of NR6/HER fibroblasts is serum dependent. *Exp Cell Res.* 217(2): 554-8

Hoppe, T., Rape, M., und Jentsch, S. (2001). Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 344-348

Huang, L., T. Berkelman, A. E. Franklin, and N. E. Hoffman. (1993). Characterization of a gene encoding a Ca²⁺-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90: 10066-10070

Hynes, R. O. und Lander, A. D. (1992). Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*, 68: 303-22

Ilić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., Yamamoto, T (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *12;377(6549):539-44*

Imamura, T., Oka, S., Tanahashi, T., Okita, Y. (1994). Cell cycle-dependent nuclear localization of exogenously added fibroblast growth factor-1 in BALB/c 3T3 and human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 215(2): 363-72

Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Kratzschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y.M., Baron, R., Blobel, C.P. (1998). Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J. Biol. Chem.* 273: 4180-4187

Iwakuma, T., Lozano, G. (2003). MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res.* 1(14): 993-1000

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

Johannessen, M., Delghandi, M. P., Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cell Signal* 16:1211–1227

Jones, R. J., Brunton, V. G., Frame, M. C. (2000). Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer*, 36, 13 Spec No, 1595-1606

Juliano, R. L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42: 283-323

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

Jung, K. M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K., Murray, S., Lewis, R., Kim, P. K., Kim, D. S., Ryu, S. H., Chao, M. V. und Kim T. W. (2003). Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J. Biol. Chem.* 278:42161-42169

Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G. I., Jutila, M. A. und Kishimoto, T. K. (1998). Calmodulin regulates 1-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 92, 809-818

Kalus, I. (2005). Untersuchungen zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM im Zentralen Nervensystem der Maus. Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg

Kalus, I., Bormann, U., Mzoughi, M., Schachner, M., Kleene, R (2006). Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J Neurochem* 98: 78-88

Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N. G., Kleene, R. und Schachner, M. (2003). The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 278, 10 381–10 388

Kanning, K. C., Hudson, M., Amieux, P. S., Wiley, J. C., Bothwell, M., und Schecterson, L. C. (2003). Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J. Neurosci.* 23(13): 5425- 436

Kim, D. Y., Ingano, L. A. und Kovacs, D. M. (2002). Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage. *J. Biol. Chem.* 277: 49976-49981

Kiryushko, D., Korshunova, I., Berezin, V., Bock, E. (2006). Neural cell adhesion molecule induces intracellular signaling via multiple mechanisms of Ca²⁺ homeostasis. *Mol Biol Cell* 17: 2278–2286

Kiselyov, V. V., Skladchikova, G., Hinsby, A. M., Jensen, P. H., Kulahin, N., Soroka, V., Pedersen, N., Tsetlin, V., Poulsen, F. M., Berezin, V., Bock, E. (2003) Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP. *Structure* 11: 691-701

Kishimoto, T. K., Kahn, J., Migaki, G., Mainolfi, E., Shirley, F., Ingraham, R. und Rothlein, R. (1995). Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis. *Agents Actions Suppl* 47: 121-134

Kiss, J. Z. und Rougon, G. (1997). Cell biology of polysialic acid. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 640-646

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

Klein, G., Langegger, M., Goridis, C., Ekblom, P.(1988). Neural cell adhesion molecules during embryonic induction and development of the kidney. *Development* 102: 749-761

Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R.M., Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5159–5162

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

Kolkova, K., Stensman, H., Berezin, V., Bock, E., Larsson, C. (2005). Distinct roles of PKC isoforms in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Neurochem* 92: 886-894

Kopan, R. und Ilagan, M. X. (2004). Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat. Rev. Mol.Cell Biol.* 5: 499-504

Kornberg, L., Earp, H. S., Parsons, J. T., Schaller, M., Juliano, R. L. (1992). Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 1992 Nov 25;267(33):23439-42

Kretsinger, R. H., Rudnick, S. E., Weissman, L. J. (1986) Crystal structure of calmodulin. *J Inorg Biochem.* Oct-Nov;28(2-3): 289-302

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

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358(6381):15-6

Lane, D. P., Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 278(5701):261-3

Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., Caroni, P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol.* 2000 Jun 26;149(7):1455-72

Leshchyn'ska, I., Sytnyk, V., Morrow, J. S., Schachner, M. (2003). Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC β 2 via β 1 spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 161:625-639

Lee, H. J., Jung, K., M., Huang, Y. Z., Bennett, L. B., Lee, J. S., Mei, L. und Kim, T. W. (2002). Presenilin-independent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J. Biol. Chem.* 277: 6318-6323

Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Mussachio, J. M., Plowman, G. D., Rudy, B., Schlessinger, J. (1995). Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*, 376, 6543, 737-745

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

Lietha, D., Cai, X., Ceccarelli, D. F., Li, Y., Schaller, M. D., Eck, M. J. (2007). Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell.* 129(6): 11 77-87

Lim, S. T., Chen, X. L., Lim, Y., Hanson, D. A., Vo, T. T., Howerton, K., Larocque, N., Fisher, S. J., Schlaepfer, D. D., Ilic, D. (2008) Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell.* 29(1): 9-22

Linnemann, D., Gaardsvoll, H., Olsen, M., Bock, E. (1993). Expression of NCAM mRNA and polypeptides in aging rat brain. *Int J Dev Neurosci* 11:71-81

Linnemann, D., Lyles, J. M., Bock, E. (1985). A developmental study of the biosynthesis of the neural cell adhesion molecule. *Dev Neurosci* 7:230-238

Linzer, D. I., Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17(1):43-52

Little, E. B., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. (1998). Palmitoylation of the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM serves as an anchor to cellular membranes. *Cell Adhes Commun* 6:415-430

Llovera, M., de Pablo, Y., Egea, J., Encinas, M., Peiro, S., Martin-Zanca, D., Rocamora, N. und Comella, J. X. (2004). Trk is a calmodulinbinding protein: implications for receptor processing. *J. Neurochem.* 88, 422-433

Lobo, M., Zachary, I. (2000). Nuclear localization and apoptotic regulation of an amino-terminal domain focal adhesion kinase fragment in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 276(3):10 68-74

Loers G, Chen S, Grumet M, Schachner M. (2005). Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis. (6):14 63-76

Lyles, J. M., Amin, W., Bock, E., Weill, C. L. (1993). Regulation of NCAM by growth factors in serum-free myotube cultures. *J Neurosci Res* 34: 273-286

Lyles, J. M., Linnemann, D., Bock, E. (1984). Biosynthesis of the D2-cell adhesion molecule: post-translational modifications, intracellular transport, and developmental changes. *J Cell Biol* 99: 2082-2091

Lyles, J. M., Norrild, B., Bock, E. (1984). Biosynthesis of the D2 cell adhesion molecule: pulse-chase studies in cultured fetal rat neuronal cells. *J Cell Biol* 98: 2077-2081

Main, A. L., Harvey, T. S., Baron, M., Boyd, J. und Campbell, I. D. (1992). The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell*, 71: 67 1-8

Maness, P. F., Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci.* 2007 Jan;10(1): 19-26

Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science.* 298: 1912-1934

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T. und Robakis, N. K. (2002). A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 21: 1948-1956

Markovic-Lipkovski, J., Muller, C. A., Klein, G., Flad, T., Klatt, T., Blaschke, S., Wessels, J. T., Müller, G. A. (2007). Neural cell adhesion molecule expression on renal interstitial cells. *Nephrol Dial Transplant* 22: 1558-1566

Martin, G. S. (2001). The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:467-775

Martin, K. H., Boerner, S. A., Parsons, J. T. (2002). Regulation of focal adhesion targeting and inhibitory functions of the FAK related protein FRNK using a novel estrogen receptor "switch". *Cell Motil Cytoskeleton*, 51, 2, 76-88

Matala, E., Alexander, S. R., Kishimoto, T. K. und Walcheck. B. (2001). The cytoplasmic domain of Lselectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis. *J. Immunol.* 167: 1617-1623

Meiri, K. F., Saffell, J. L., Walsh, F. S., Doherty, P. (1998). Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci* 18: 10429–10437

Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E., Wang, B.(2000). Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2(2):62-9

Miethke, T., Wahl, C., Holzmann, B., Heeg, K. und Wagner, H. (1993). Bacterial superantigens induce rapid and T cell receptor V beta-selective down-regulation of L-selectin (gp90Mel-14) in vivo. *J. Immunol.* 151: 6777-6782

Mitra, S. K., Hanson, D. A., Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 1, 56-68

Monfort, P., Munoz, M. D., Kosenko, E., Llansola, M., Sánchez-Pérez, A., Cauli, O., Felipo, V. (2004) Sequential activation of soluble guanylate cyclase, protein kinase G and cGMP-degrading phosphodiesterase is necessary for proper induction of long-term potentiation in CA1 of hippocampus. Alterations in hyperammonemia. *Neurochem Int* 45: 895-901

Murakami, D., Okamoto, I., Nagano, O., Kawano, Y., Tomita, T., Iwatsubo, T., De Strooper, B., Yumoto, E. und Saya, H. (2003). Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* 22: 1511-1516

Murray, B. A., Hemperly, J. J., Prediger, E. A., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. (1986). Alternatively spliced mRNAs code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J Cell Biol* 102: 189-193

Murray, B. A., Hoffman, S., Cunningham, B. A. (1987). Molecular features of cell-cell adhesion molecules. *Prog Brain Res* 71: 35-45

Neiiendam, J. L., K hler, L. B., Christensen, C., Li, S., Pedersen, M. V., Ditlevsen, D. K., Kornum, M. K., Kiselyov, V. V., Berezin, V., Bock, E. (2004). An NCAM-derived FGF-receptor agonist, the FGL-peptide, induces neurite outgrowth and neuronal survival in primary rat neurons. *J Neurochem.* 91(4): 920-35

Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.* 157, 521-532

Nguyen, C., Mattei, M. G., Mattei, J. F., Santoni, M. J., Goridis, C., Jordan, B. R. (1986). Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J Cell Biol* 102: 711–715

Nybroe, O., Albrechtsen, M., Dahlin, J., Linnemann, D., Lyles, J. M., Moller, C. J., Bock, E. (1985). Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: characterization of polypeptide C. *J Cell Biol* 101: 2310–2315

Orsulic, S. und Peifer, M. (1996). Cell-cell signalling: Wingless lands at last. *Curr Biol*, 6: 136 3-7

Owen, J. D., Ruest, P. J., Fry, D. W., Hanks, S. K. (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol*, 19, 7, 4806-4818

Paratcha, G., Ledda, F., Ibanez, C. F. (2003). The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113:867–879

Parsons, J. T. (2003) Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116(Pt 8): 1409-1416, Review

Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P., Pelicci, P. G. (2000) PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature*. Jul 13;406(6792):207-10

Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J. und Black. R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282: 1281-1284

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

Ranheim, T. S., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. (1996). Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 30;93(9): 4071-5

Rao Y, Zhao X, Siu CH. Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. Evidence for isologous interaction. *J Biol Chem*. 1994 Nov 4;269(44):27540-8

Reyes, A. A., Small, S. J., Akeson, R. (1991). At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. *Mol Cell Biol* 11: 1654-1661

Rhoads, A. R. und Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J*. 11: 331-340

Richardson, A., Parsons, T. (1996). A mechanism for regulation of the adhesion-associated proteintyrosine kinase pp125FAK. *Nature*. 380(6574): 538-40

Rizoli, S. B., Rotstein, O. D. und Kapus. A. (1999). Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils. A role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem*. 274: 22072-22080

Ronn, L. C., Dissing, S., Holm, A., Berezin, V. und Bock. E. (2002). Increased intracellular calcium is required for neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of NCAM. *FEBS Lett*. 518: 60-66

Roskoski, R. Jr. (2005). Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1-14

Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9: 26-35

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

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

Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Sanchez-Heras, E., Howell, F. V, Williams, G., Doherty, P. (2006). The fibroblast growth factor receptor acid box is essential for interactions with N-cadherin and all of the major isoforms of neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 281: 35208-35216

Sasaki, H., Nagura, K., Ishino, M., Tobioka, H., Kotani, K., Sasaki, T. (1995). Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem*, 270, 36, 21206-21219

Schachner, M. (1991). Cell surface recognition and neuron-glia interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633: 105-112

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

Schaller, M. D., Borgman, C. A., Cobb, B. S., Vines, R. R., Reynolds, A. B., Parsons, J. T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(11):519 2-6

Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Parsons, J. T. (1999). Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases. *Mol Biol Cell*, 10, 10, 3489-3505

Schaller, M. D., Otey, C. A., Hildebrand, J. D., Parsons, J. T. (1995). Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol*, 130, 5, 1181-1187

Schaller, M. D. und Parsons, J. T. (1994). Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 5, 705-710

Schlaepfer, D. D., Mitra, S.K., Ilic, D. (2004). Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Jul 5;1692(2-3): 77-102

Schlondorff, J. und Blobel, C. P. (1999). Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 21): 3603-3617

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

Schuch, U., Lohse, M. J., Schachner, M. (1989). Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3: 13-20

Schulz, J. G., Annaert, W., Vandekerckhove, J., Zimmermann, P., De Strooper, B. und David. G. (2003). Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/gamma-secretase-dependent and modulates cytosolic signaling. *J. Biol. Chem.* 278: 48651-48657

Seidah, N. G. und Chretien, M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 602-607

Seidenfaden, R., Krauter, A., Hildebrandt, H. (2006). The neural cell adhesion molecule NCAM regulates neuritogenesis by multiple mechanisms of interaction polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Neurochem Int* 49:1-11

Seidenfaden, R., Krauter, A., Schertzinger, F., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. (2003). Polysialic acid directs tumor cell growth by controlling heterophilic neural cell adhesion molecule interactions. *Mol Cell Biol* 23: 5908-5918

Selkoe, D., und Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 565-97

Shinohara, Y., Nakajima, Y., Nakanishi, S. (2001). Glutamate induces focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation and actin rearrangement in heterologous mGluR1-expressing CHO cells via calcium/calmodulin signaling. *J Neurochem.* 78(2): 365-73

Silberstein, G. B. und Daniel, C. W. (1982). Glycosaminoglycans in the basal lamina and extracellular matrix of the developing mouse mammary duct. *Dev Biol* 90: 215-222

Sieg, D. J., Hauck, C. R., Ilic, D., Klingbeil, C. K., Schaefer, E., Damsky, C. H., Schlaepfer, D. D. (2008) FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2(5):249-56

Simons, K. und Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39

Sjostrand, D., Carlsson, J., Paratcha, G., Persson, B., Ibanez, C.F. (2007). Disruption of the GDNF binding site in NCAM dissociates ligand binding and homophilic cell adhesion. *J Biol Chem* 282: 12734-12740

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

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

Soderling, T. R. (2000). CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 10(3):375-80

Sorkin, B. C., Hoffman, S., Edelman, G. M., Cunningham, B. A. (1984). Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM. *Science* 225:1476-1478

Sporns, O., Edelman, G. M., Crossin, K. L. (1995). The neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92: 542-546

Stewart, A., Ham, C., Zachary, I.(2002). The focal adhesion kinase amino-terminal domain localises to nuclei and intercellular junctions in HEK 293 and MDCK cells independently of tyrosine 397 and the carboxy-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 299(1): 62-73

Stryer, L. (1995) *Biochemistry*. Freeman & Company

Sun, C. X., Robb, V. A., Gutmann, D. H. (2002). Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci*, 115, Pt 21, 3991-4000.

Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., Delling, M., Dityateva, G., Dityatev, A., und Schachner, M. (2002). Neural cell adhesion molecule promotes accumulation of TGN organelles at sites of neuron-to-neuron contacts. *J. Cell Biol.* 159, 649-661

Takei, K., Chan, T. A., Wang, F. S., Deng, H., Rutishauser, U. und Jay, D. G. (1999). The neural cell adhesion molecules L1 and NCAM-180 act in different steps of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 19: 9469-9479

Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7: 6 19-27

Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A. und Engel, P. (1995): The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*, 9: 8 66-73

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

Tomimatsu, Y., Idemoto, S., Moriguchi, S., Watanabe, S. und Nakanishi, H. (2002). Proteases involved in long-term potentiation. *Life Sci.* 72: 355-361

Tomba, P., Friedrich, P. (1998). Synaptic metaplasticity and the local charge effect in postsynaptic densities. *Trends Neurosci.* (3):97-102

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon. J. (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

van't Hof, W., Resh, M. D. (1997). Rapid plasma membrane anchoring of newly synthesized p59^{fyn}: selective requirement for NH₂-terminal myristoylation and palmitoylation at cysteine-3. *J Cell Biol.* 136(5):1023-35

Vaughn, D. E. und Bjorkman, P. J. (1996). The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron*, 16: 261-73

Vestweber, D. und Blanks, J. E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*, 79: 181-213

Von der Ohe, M. , Wheeler, S. F., Wuhler, M., Harvey, D. J., Liedtke, S., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Dwek, R. A., Geyer, R., Wing, D. R. und Schachner, M. (2002). Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology* 12: 47-63

Vuori, K. (1998). Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J Membr Biol*, 165, 3, 191-199

Walev, I., Tappe, D., Gulbins, E. und Bhakdi, S. (2000). Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *J. Leukoc. Biol.* 68: 865-872

Walsh, F. S., Putt, W., Dickson, J. G., Quinn, C. A., Cox, R. D., Webb, M., Spurr, N., Goodfellow, P. N. (1986). Human N-CAM gene: mapping to chromosome 11 by analysis of somatic cell hybrids with mouse and human cDNA probes. *Brain Res* 387:197-200

Walsh, F. S., Parekh, R. B., Moore, S. E., Dickson, G., Barton, C. H., Gower, H. J., Dwek, R. A., Rademacher, T. W. (1989). Tissue specific O-linked glycosylation of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Development* 105: 803-811

Wang, H. B., Dembo, M., Hanks, S. K., Wang, Y. (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 20, 11295-11300

Weinhold, B., Seidenfaden, R., Röckle, I., Mühlenhoff, M., Schertzinger, F., Conzelmann, S., Marth, J. D., Gerardy-Schahn, R., Hildebrandt, H. (2005). Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*. 2005 Dec 30;280(52): 42971-7

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

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

Williams, E. J., Mittal, B., Walsh, F. S., and Doherty, P. (1995). FGF inhibits neurite outgrowth over monolayers of astrocytes and fibroblasts expressing transfected cell adhesion molecules. *J.Cell Sci*. 108 (Pt 11), 3523-3530

Williams, E. J., Mittal, B., Walsh, F. S., Doherty, P. A. (1995). Ca^{2+} /calmodulin kinase inhibitor, KN-62, inhibits neurite outgrowth stimulated by CAMs and FGF. *Mol Cell Neurosci* 6: 69-79

Williams, E. J., Walsh, F. S., und Doherty, P. (1994). The production of arachidonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by NCAM, N-cadherin, and L1. *J.Neurochem*. 62, 1231-1234

Willoughby, D. und Cooper, D. M. (2007). Organization and Ca^{2+} regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* 87: 965-1010

Wuhrer, M., Geyer, H., von Der Ohe, M., Gerardy-Schahn, R., Schachner, M., Geyer, R. (2003). Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM. *Biochimie* 85: 207-218

Wyszynski, M., Lin, J., Rao, A., Nigh, E., Beggs, A. H., Craig, A. M., Sheng, M. (1997). Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385: 439-442

Yamada, K. M. (1983). Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem* 52: 761-799

Yong, V. W., Power, C., Forsyth, P. und Edwards, D. R. (2001). Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 502-511

Yoshida, S. und Shiosaka, S. (1999). Plasticity-related serine proteases in the brain (review). *Int. J. Mol. Med.* 3: 405-409

Yu, H., Li, X., Marchetto, G. S., Dy, R., Hunter, D., Calvo, B., Dawson, T. L., Wilm, M., Andereg, R. J., Graves, L. M., Earp, H. S. (1996). Activation of a novel calciumdependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 271, 47, 29993-29998

Zampieri, N., Xu, C. F., Chao, M. V. (2005). Cleavage of p75 neurotrophin receptor by alpha-secretase and gamma-secretase requires specific receptor domains. *J. Biol. Chem.* 280(15): 14563-71

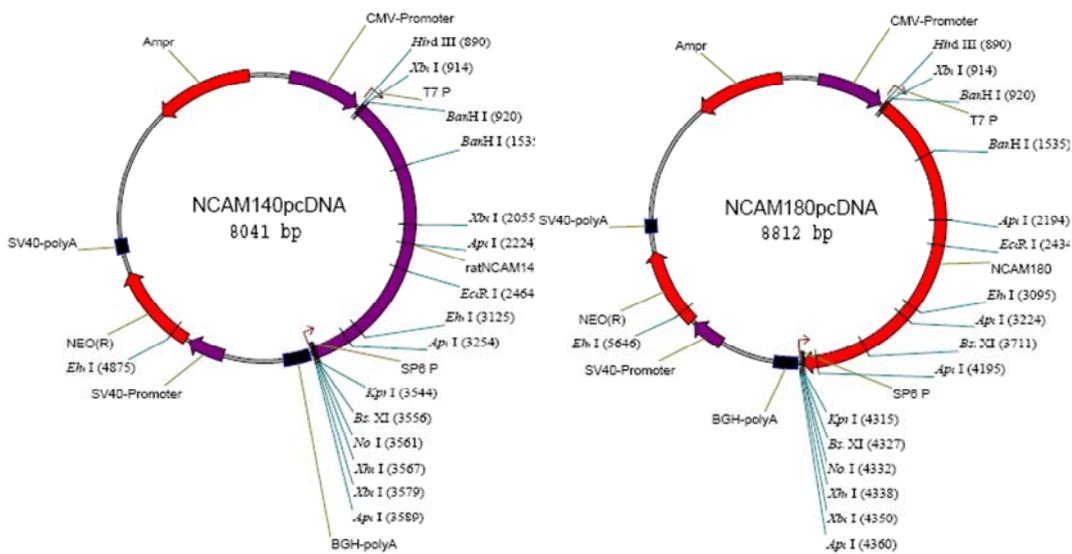
Zhao, P., Wang, D., Gao, Y., Yang, Z., Li, X. (1998). Overexpression of MDM2, p53, and NCAM proteins in human radiation-induced skin ulcers. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 17(2):12 5-7

Zheng, J. Q., Felder, M., Connor, J. A., Poo, M. M. (1994). Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368: 140-144

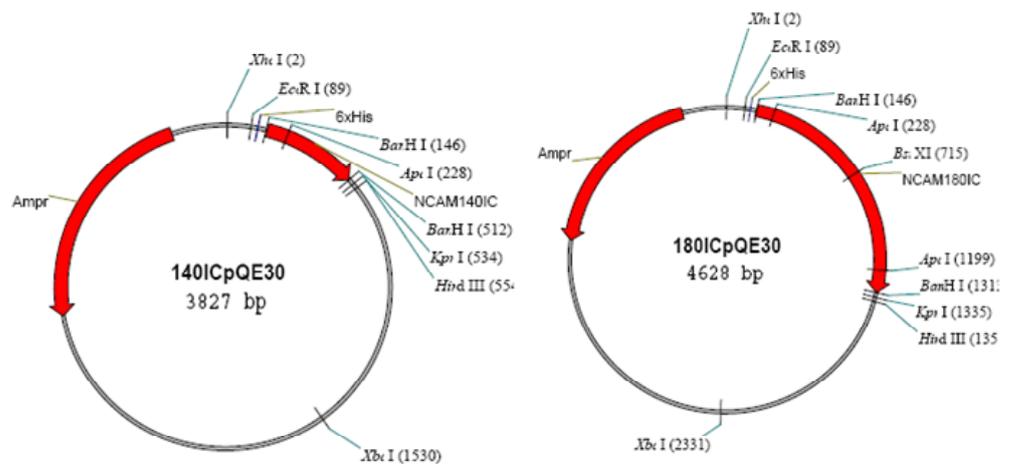
8. Anhang

8.1. Plasmide

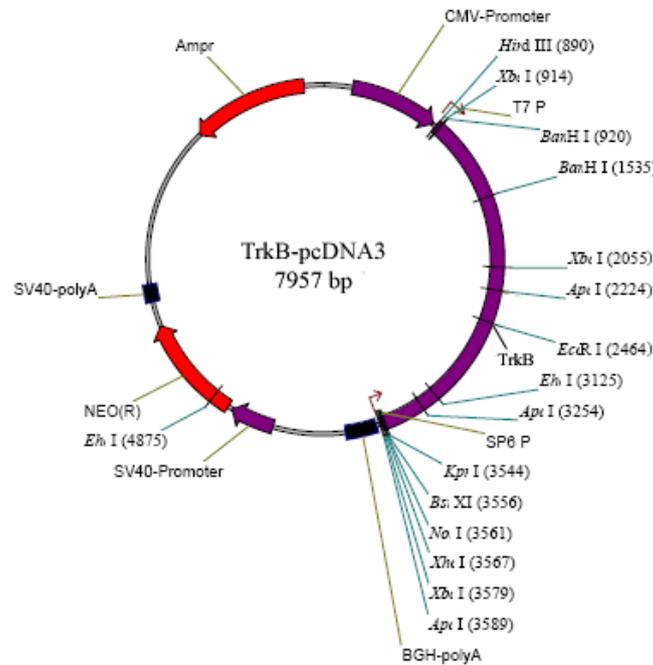
8.1.1 NCAM140 und NCAM180 [s. Tab. 2.5] im eukaryontischen Expressionvektor pcDNA3



8.1.2 NCAM140ICD und NCAM180ICD [s. Tab. 2.5] im prokaryontischen Expressionsvektor pQE30

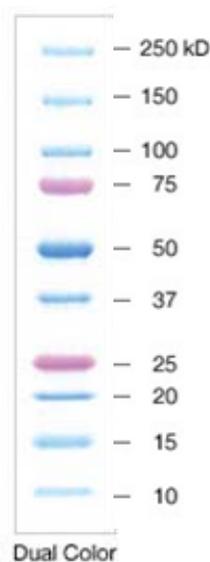


8.1.3 TrkB im eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3



8.2 Proteinmarker

Bei durchgeführten SDS-PAGE wurde der Proteinmarker *Precision Plus Protein Dual Color* der Fima Bio-Rad eingesetzt.



8.3 Abkürzungen und Einheiten

AA	arachidonic acid
Abb.	Abbildung
ADAM	a disintegrin and a metalloprotease
AK	Antikörper
ampr	Ampicillinresistenz
APP	amyloid precursor protein
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
CADTK	calcium dependent protein-tyrosine kinase
CAK β	cell adhesion kinase β
CaM	Calmodulin
CaMKII α	Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II α
cDNS	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CHL1	close homologue of L1
CHO	chinese hamster ovary
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CGN	cerebellar granule neurons,
c-Met	mesenchymal epithelial transition factor
CRD	carbohydrate recognition domain
CREB	cAMP response element-binding protein
Da	Dalton
DAG	diacylglycerol
dBcAMP	dibutyryl cyclic adenosine monophosphate
dH ² O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxiribonuclein acid
E. coli	Escherischia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EGF-R	epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EphA2	ephrin type A 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinasen
et al.	und weitere
EtBr	Ethidium Bromid
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix

FAK	fokale Adhäsionskinase
FAT	focal adhesion targeting
FERM/FAK	N-terminal band 4.1, ezrin, radixin, moesin homology
FGF	fibroblast growth factor
FGF-R	fibroblast growth factor receptor
Fn	Fibronektin
g	Gramm
GAP43	growth associated protein 43
GC	Guanylat-Zyklase
GFP	green fluorescent protein
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFR α 1	GDNF family receptor α
GMEM	Glasgow's Minimal Essential Medium
Golgi	Golgi-Apparat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
Grb2	growth-factor-receptor-bound protein 2
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunden
H $_2$ O $_2$	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HNK-1/L2	human natural killer-1
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
HRP	horseradish-peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
ICAM	intercellular adhesion molecule
ICAM1	intercellular adhesion molecule L1
ICD	intracellular domain
ICLiP	intramembrane-cleaving-protease
Ig	Immunglobulin
IgCAMs	Immunglobulin-artige-Zelladhäsionsmoleküle
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lac	Lactose
LB	Luria Bertani
LTP	Langzeitpotenzierung
M	molar, mol/l
mA	Milliampere
MAG	myelin associated glycoprotein
MAPK	mitogen activated protein kinase
MARCKS	myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
MDC	Metalloprotease-/Disintegrin-/Cystein-reiches Protein
Mdm2	murine double minute 2
MetOH	Methanol
mg	milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Multiple Sklerose
MSD1	muscle specific domain 1
NCAM	neural cell adhesion molecule
Neuro 2a	Neuroblastomazellline Neuro 2a
NgCAM	neuron glia cell adhesion molecule
NGF	nerve growth factor
NFκB	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>κ</u> B
nM	Nanomolar
NO	nitric oxide
NOS	NO-Synthase
NrCAM	neuron-glia cell adhesion molecule related cell adhesion molecule
ODx	Optische Dichte bei x nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC12-Zellen	Pheochromozytoma12-Zellen
PDGF-R	platelet derived growth factor receptor
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PKC	protein kinase C
Pkt.	Punkt
PLCg	Phospholipase g
PLL	poly-L-Lysin
PTK2	protein-tyrosine kinase 2
Pyk2	Proline-rich tyrosine kinase 2
PSA	polysialic acid, Polysialinsäure
RAFTK	<u>r</u> elated <u>a</u> dhesion <u>f</u> ocal <u>t</u> yrosine <u>k</u> inase
RIP	regulated intramembranous proteolysis
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPTPα	Rezeptorprotein-Tyrosin-Phosphatase α
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
SOS	Son-of-Sevenless
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	Sogenannt
Tab.	Tabelle
TACE	TNFα converting enzyme
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TBS	Tris balanced salt solution/Tris gepufferte Salzlösung

TEMED	Tetramethyldiamin
TGF	transforming growth factor
TNF α	tumour necrosis factor α
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
TrkA	tyrosine receptor kinase A
Tx-100	Triton-X 100
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Bei Frau Professor Dr. Melitta Schachner möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung eines spannenden und höchst interessanten Themas dieser Arbeit sowie für die nette und fachkundige Betreuung während der gesamten Zeit bedanken.

Herrn Professor Dr. Konrad Wiese möchte ich für die Möglichkeit zu dieser externen Promotion sowie für die problemlose Art dabei sehr danken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn PD Dr. Ralf Kleene, ohne den die Arbeit nie diesen Verlauf genommen und gegen Ende noch diesen „Drive“ bekommen hätte. Die unkomplizierten und stets konstruktiven Diskussionen ebenso wie die Entfaltungsmöglichkeiten prägten diese Arbeit sehr.

Ebenfalls sehr bedanken möchte ich mich bei Frau Galina Dityateva und Herrn Dr. Alexander Dityatev, die mir bei der Durchführung der Experimente an den Hippocampus-Neuronen eine große Hilfe waren.

Dr. Nuray Akyüz möchte ich sehr für ihre Hilfe und Unterstützung bei meinen Klonierungsarbeiten zu Beginn dieser Arbeit danken.

Frau Dr. Gaby Loers und Herrn Daniel Novak danke ich für die Präparationen der Cerebellum-Neurone.

Herrn Achim Dahmann danke ich für all die Antworten und Hilfestellungen rund ums Bestellsystem und den zahlreichen, immer wieder interessanten Gesprächen und Musikdiskussionen. Frau Peggy Putthoff danke ich für ihre stets hilfsbereite Art, die sehr zum angenehmen Arbeitsklima beitrug. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Thomas Tilling für die stete Diskussionsbereitschaft und guten Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich bei Babett Baraniec und Doreen Westphal für gefühlte Tonnen an aufgereinigtem Zweitantikörper, der Hilfestellung bei der stabilen Transfektion von CHO-Zellen und der immer wieder aufheiternden Gespräche und wertvollen Tipps.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Daniel „Dansen Dansdalf“ Novak, dafür dass er mir zu einem besten Freund geworden ist, ohne den die Zeit im und außerhalb des Labors nie so außergewöhnlich und unvergesslich geworden wäre.

Meiner Labornachbarin Sandra Nickel danke ich sehr für eine tolle, abwechslungsreiche Zeit in E30, für unzählige „Hats noch Kaffee?“ und witzige Unterhaltungen und ihre stets aufrechte Art.

Ingo „Inguman“ Meier, Janinne Schmid, Gerrit Wolters, Nina Stemmer, Iris Otzen, Carina Figge, Jens Block, Michael Knepper und Nicole Karl danke ich für die freundschaftliche und „lustige“ Zusammenarbeit im Labor bedanken, ohne die manches sicherlich wesentlich schwerer zu ertragen gewesen wäre. 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.

Ein ganz großer, besonderer Dank geht an meine Eltern und an meine Geschwister, die auf diesem harten und langen Weg immer für mich da waren und mich immer unterstützt und mir Mut gemacht haben.

Zu guter Letzt bedanke ich mich aus tiefstem Herzen für die große Stütze an meiner Seite, die mir einen wundervollen Engel geschenkt hat und mich bei allen Problemen in und außerhalb des Labors unterstützt und am Gelingen dieser Arbeit maßgeblichen Beitrag hatte: meiner Ehefrau Güli.