



Universität Hamburg

Die Bedeutung der Lokalisierung der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM
und L1 in verschiedenen Membran-Mikrodomänen für Signaltransduktion und
Neuritenwachstum in *Mus musculus* (Linnaeus, 1758)

Dissertation

von

Babett Baraniec

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften Dr.rer.nat.
am Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Hamburg, September 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. H.-P. MÜHLBACH
Tag der Disputation: 24. Oktober 2008

Hamburg, den 10. Oktober 2008



J. Ganzhorn

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Diese Arbeit wurde im Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg angefertigt.

Gutachter: Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach
Prof. Dr. Melitta Schachner

Betreuer: Dr. Vladimir Sytnyk
Dr. Iryna Leshchyn'ska

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Zusammenfassung	5
2 Einleitung	7
2.1 Biologische Membranen	7
2.2 <i>Lipid rafts</i>	7
2.3 <i>Lipid raft</i> -assoziierte Proteine	9
2.3.1 GPI-verankerte Proteine	9
2.3.2 Proteintyrosinkinasen	11
2.3.2.1 Src-Kinasen	12
2.3.2.2 p60 ^{src} und p59 ^{fyn}	13
2.4 Zelladhäsionsmoleküle	15
2.4.1 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)	16
2.4.1.1 NCAM	17
2.4.1.2 L1	19
2.4.2 Signaltransduktion und Neuritenwachstum durch NCAM und L1	22
3 Aufgabenstellung	27
4 Material	28
4.1 Chemikalien	28
4.2 Detergenzien	30
4.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer	30
4.4 Antikörper	32
4.4.1 Primärantikörper	32
4.4.2 Sekundärantikörper	33
4.5 Plasmide	33
4.6 Expressionskonstrukte	34
4.7 Enzyme	34

4.8	Inhibitoren und Toxine	35
4.9	Molekulargewicht-Standards	35
4.10	Oligonukleotide (Primer)	36
4.11	Zelllinien	36
4.12	Mauslinien	37
4.13	Zentrifugen und Rotoren	38
5	Methoden	39
5.1	Zellkultur	39
5.1.1	Allgemeine Bedingungen	39
5.1.2	Passagieren der Zellen	40
5.1.3	Langzeitlagerung	40
5.1.4	Stabile Transfektion von CHO-Zellen	40
5.1.5	Lyse von CHO-Zellen	42
5.1.6	Kulturen von hippocampalen Neuronen (Primärzellkultur)	42
5.1.7	Clustern von L1 an der Zelloberfläche von Neuronen	42
5.1.8	Neuritenwachstum	43
5.1.9	Immunfluoreszenz	43
5.2	Molekularbiologische Methoden	44
5.2.1	Genotypisierung von Mäusen	44
5.2.1.1	Verdau der Schwanzbiopsien	44
5.2.1.2	PCR zur Genotypisierung	45
5.2.2	DNA Gelelektrophorese	47
5.3	Proteinbiochemische Methoden	48
5.3.1	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA-Test)	48
5.3.2	Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	49
5.3.3	Immunoblot-Analyse	50
5.3.3.1	Western Blot	50
5.3.3.2	Dot Blot	51
5.3.3.3	Immunreaktion	51
5.3.3.4	ECL-Reaktion	51
5.3.3.5	Densiometrische Bestimmung der Bandenintensität	52

5.3.3.6	Strippen der Nitrozellulosemembran	52
5.3.4	Zellfraktionierung	52
5.3.4.1	Herstellung eines Gehirnhomogenates aus Gesamthirn	52
5.3.4.2	Herstellung einer groben Membranfraktion	53
5.3.4.3	Isolierung von Fraktionen angereichert mit <i>Lipid rafts</i>	53
	Lipid raft-Isolierung aus Membranfraktionen von Mäusegehirnen	53
	Lipid raft-Isolierung aus CHO-Zellen	54
5.3.5	Proteinbindungs-Assays	54
5.3.5.1	Immunisolierung verschiedener Subtypen von Lipid rafts	54
5.3.5.2	Immunpräzipitation	55
5.3.6	Verpaarungs-Experimente mit NCAM- und L1-defizienten Mäusen	55
5.3.6.1	Haltungsbedingungen	55
5.3.6.2	Zucht von Doppel-defizienten Mäusen	56
6	Ergebnisse	57
6.1	Die Abwesenheit von L1 resultiert in einer Reduktion der aktivierten Src-Kinase p60 ^{src}	57
6.2	L1 assoziiert mit p60 ^{src} via RPTP α	59
6.2.1	L1 assoziiert mit p60 ^{src}	59
6.2.2	L1 assoziiert mit RPTP α	62
6.2.3	RPTP α ist ein Linkerprotein zwischen L1 und p60 ^{src}	63
6.3	NCAM und L1 bevorzugen unterschiedliche Membran-Mikrodomänen (<i>Lipid rafts</i>)	65
6.3.1	L1 kann in <i>Lipid rafts</i> detektiert werden	65
6.3.2	Isolierung von L1- und NCAM-positiven <i>Lipid rafts</i>	67
6.3.3	Die GPI-verankerten Proteine F3 und PrP rekrutieren entweder L1 oder NCAM in p60 ^{src} - oder p59 ^{fyn} -angereicherte <i>Lipid rafts</i>	71
6.4	Vernetzung der L1- und NCAM-vermittelten Signalwege	74
6.4.1	Durch L1 und NCAM wird Neuritenwachstum synergistisch gesteigert	74
6.4.2	L1 und NCAM können einander kompensieren	76
6.4.3	L1- und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum in F3 ^{-/-} , PrP ^{-/-} und TAG-1 ^{-/-} Neuronen ist verändert	80
6.4.4	L1 und NCAM doppelt defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig	81

7	Diskussion	83
7.1	L1 und NCAM führen Signaltransduktion in unterschiedlichen Subtypen von <i>Lipid rafts</i> durch	83
7.2	RPTP α fungiert als Linkermolekül zwischen L1 und p60 ^{src}	85
7.3	Isolierung und Zusammensetzung von <i>Lipid rafts</i> mit nicht-ionischen Detergenzien	86
7.4	L1-positive <i>Lipid rafts</i> und NCAM-positive <i>Lipid rafts</i> unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung	87
7.5	GM1 und GPI-verankerte Moleküle bevorzugen unterschiedliche <i>Lipid rafts</i>	90
7.6	Artverwandte Proteine kompensieren füreinander	91
8	Abkürzungsverzeichnis	93
9	Referenzen	96
	Danksagung	114

1 Zusammenfassung

Zelladhäsionsmoleküle sind Proteine, die in der Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle spielen. Sie vermitteln Zell-Zell-Kontakte und interagieren mit der extrazellulären Matrix, um Signale weiterzuleiten, die unter anderem Neuritenwachstum anregen. Zwei wichtige Vertreter der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle sind L1 und NCAM. Beide Proteine haben die Möglichkeit, Signalkaskaden durch die Stimulation von Src-Kinasen zu aktivieren. Frühere Arbeiten zeigten, dass NCAM die Src-Kinase p59^{fyn} aktivieren kann, indem es RPTP α in *Lipid rafts* rekrutiert und dort an PrP bindet, um den Proteinkomplex zu stabilisieren. Der dadurch induzierte MAPK-Signalweg resultiert in einer Verstärkung des Neuritenwachstums.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für L1-vermitteltes Neuritenwachstum ähnliche Mechanismen in der Signalweiterleitung greifen. Durch Immunpräzipitationen wurde nachgewiesen, dass RPTP α mit L1 und der Src-Kinase p60^{src} interagiert und für die Bildung des L1/p60^{src}-Proteinkomplexes von großer Bedeutung ist.

Durch die Isolierung von *Lipid rafts* aus Mäusegehirnen und anschließende Western Blot-Analysen konnte eine geringe Menge von L1 in *Lipid raft*-Fraktionen identifiziert werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass L1 für die Aktivierung von p60^{src} durch RPTP α temporär in *Lipid rafts* lokalisiert sein kann.

Um die von NCAM und L1 bevorzugten *Lipid rafts* zu analysieren, wurden mittels Immunisolierungen L1- und NCAM-positive Membran-Mikrodomänen separiert und analysiert. Die Ergebnisse zeigten eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung beider *Lipid raft*-Subtypen. Während L1 *Lipid rafts* bevorzugt, die mit dem GPI-verankerten Protein F3 und der Src-Kinase p60^{src} angereichert sind, ist NCAM in *Lipid rafts* lokalisiert, die PrP und p59^{fyn} enthalten. Western Blot-Analysen mit *Lipid rafts*, die aus L1- und F3-kotransfizierten CHO-Zellen isoliert wurden, bestätigten, dass F3 für die Lokalisierung von L1 in *Lipid rafts* von Bedeutung ist.

Anschließende Neuritenwachstumsexperimente und Western Blot-Analysen zeigten, dass L1 und NCAM einander kompensieren können, wenn eines der beiden Proteine fehlt. So war der Aktivierungsgrad von p60^{src} in NCAM-defizienten Mäusen stark erhöht. Die Kinase p59^{fyn} zeigte dagegen eine gesteigerte Aktivität in L1-defizienten Mäusen. Das Neuritenwachstum nach NCAM-Stimulation war im Vergleich zum Wildtyp in L1-defizienten Mäusen deutlich höher, während L1-vermitteltes Neuritenwachstum in NCAM-defizienten Mäusen stärker

ausgeprägt war. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Expression von L1 und NCAM verstärkt wird, wenn das jeweilige andere Zelladhäsionsmolekül abwesend ist.

Zusammenfassend zeigt die Arbeit, wie die artverwandten Moleküle L1 und NCAM ähnliche Signalwege anschalten können und dadurch die Möglichkeit haben, bei Abwesenheit eines der beiden Proteine kompensatorische Funktionen auszuüben. Dabei kommt den *Lipid rafts* eine entscheidende Rolle in der Aktivierung der L1- und NCAM-vermittelten Signalwege zu.

2 Einleitung

2.1 Biologische Membranen

Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus Proteinen und Lipiden (Phospholipide, Glykolipide und Sterole). Sie trennen das Innere einer lebenden Zelle von der Zellumgebung und dienen als Abgrenzung verschiedener funktioneller Bereiche innerhalb der Zelle. Dabei stellen Membranen keine starre Einheit dar, sondern sind aktiv an biologischen Prozessen, wie dem Transport von Molekülen oder der Signalweiterleitung beteiligt.

Die ersten strukturellen Untersuchungen zur Zusammensetzung von Zellmembranen fanden durch Gorter und Grendel statt. Sie extrahierten die Lipide von roten Blutzellen mit Aceton und anderen Lösungsmitteln und machten die Entdeckung, dass die extrahierte Einzelschicht der Lipide eine fast doppelt so große Oberfläche als die Blutzellen selbst hatten (Gorter and Grendel, 1925). Ihre Untersuchungen brachten den ersten Hinweis darauf, dass Lipidmoleküle Doppelschichten bilden können und ließen vermuteten, dass Zellen von einer Lipid-Doppelschicht umgeben sein könnten. Es dauerte jedoch noch fast 50 Jahre, bis Singer und Nicholson das auch heute noch größtenteils aktuelle "Flüssig-Mosaik-Modell" vorstellten. Nach ihren Erkenntnissen besteht eine Membran aus einer dynamischen Doppellipidschicht, in welcher sich die Proteinmoleküle frei bewegen können (Singer and Nicolson, 1972). In den letzten Jahren jedoch zeigte sich, dass diese freie Bewegung der Proteine und auch der Lipide teilweise durch spezielle Membranstrukturen eingeschränkt ist (Lisanti and Rodriguez-Boulan, 1990; van Meer and Simons, 1982). Einige Lipide und Proteine können Mikrodomänen in der Membran bilden und dadurch für eine Kompartimentierung der Membran sorgen, die die Verteilung von Proteinen und Lipiden mitbestimmt. Diese Membran-Mikrodomänen werden als *Lipid rafts* bezeichnet (Simons and Ikonen, 1997).

2.2 *Lipid rafts*

Die ersten Hinweise darauf, dass Proteine und Lipide nicht zufällig in der Membran verteilt sind, wurden durch Untersuchungen an Epithel- und Endothelzellen erhalten (Simons and van Meer, 1988; van Meer and Simons, 1982). Bei diesen Zellen ist die Plasmamembran funktionell und morphologisch polar. Die apikale und die basolaterale Membran unterscheiden sich dabei sowohl in der Protein- als auch in der Lipidzusammensetzung. Die apikale Membran ist mit Sphingolipiden angereichert und somit ein erster Hinweis auf die

Existenz von Strukturen in der Plasmamembran, welche die Verteilung von Proteinen und Lipiden beeinflussen und als *Lipid rafts* bezeichnet werden. (Simons and Ikonen, 1997). *Lipid rafts* zeichnen sich durch eine spezielle Lipidzusammensetzung aus, die ihre Membraneigenschaften wie die Fluidität wesentlich beeinflusst. Sie haben einen deutlich höheren Sphingolipid- und Sterolgehalt als die umgebende Membran. Dadurch bilden sie floßartige Ansammlungen, die sich frei in der Membran bewegen können [Abb. 1; (Dietrich et al., 2001; Pralle et al., 2000)].

Die Fettsäuren der Phospholipide in den *Lipid rafts* unterscheiden sich durch einen höheren Sättigungsgrad von der umgebenden Membran. Membranbereiche mit gesättigten Fettsäuren sind dichter gepackt und bilden eine geordnetere Flüssigkeitsdomäne (*liquid ordered*, l_o -Phase) mit einer höheren Schmelztemperatur als die Umgebung, welche sich in der ungeordneteren Phase (*liquid-disordered*, l_d -Phase) befindet. Diese Eigenschaft ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass *Lipid rafts* aufgrund ihrer Unlöslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien wie Triton X-100 isoliert werden können (Brown and London, 1998; Brown and Rose, 1992).

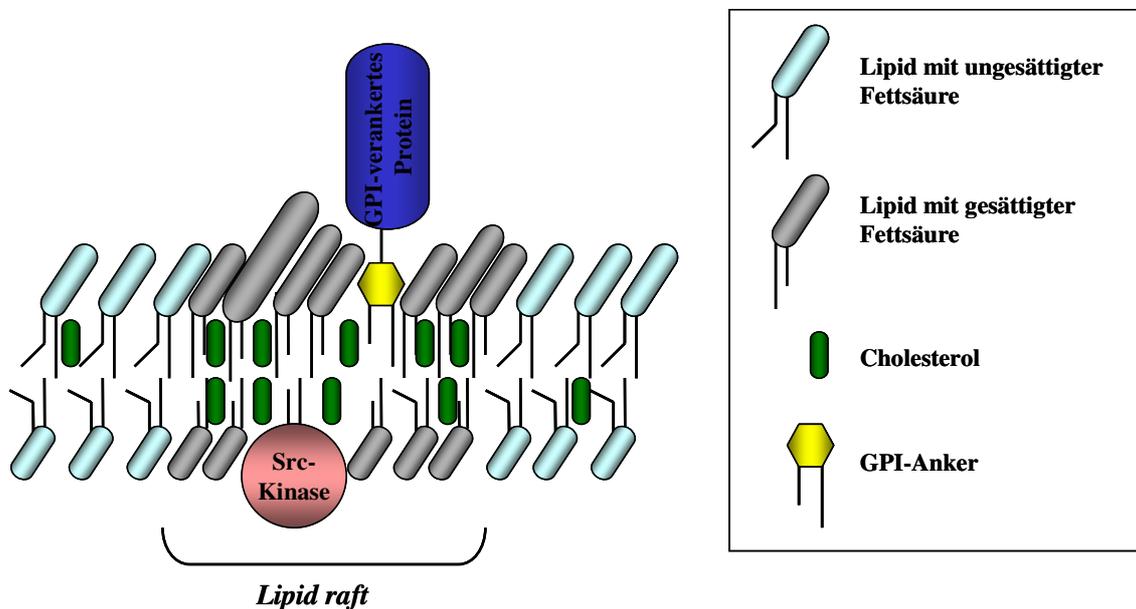


Abb. 1: Modell eines *Lipid rafts* in tierischen Zellen. *Lipid rafts* sind angereichert mit Cholesterin und Membranlipiden, welche gesättigte Fettsäurereste enthalten. Außerdem sind Signaltransduktions-Moleküle, wie Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine und Src-Kinasen in *Lipid rafts* angereichert.

Seit den 50er Jahren sind Caveolae, eine spezielle Form der *Lipid rafts* bekannt (Palade, 1953; Yamada, 1955). Diese Strukturen sind kleine flaschenartige Einstülpungen in der Plasmamembran und aufgrund ihrer Form die bisher einzigen morphologisch identifizierten *Lipid rafts*. Für die flaschenartige Form ist das Protein Caveolin verantwortlich, welches als Dimer Haarnadelstrukturen bildet und das charakteristische Protein der Caveolae darstellt. Caveolae haben etwa einen Durchmesser von 50-200 nm (Pike, 2003) und beinhalten bis zu 10.000 Sphingolipidmoleküle, jedoch nur zwischen 10-100 Proteine (Simons and Toomre, 2000).

Lipid rafts werden als Plattformen angesehen, welche die Effizienz der Interaktion zwischen Rezeptoren und deren Signaltransduktionspartnern verstärken (Gomez-Mouton et al., 2004). Es findet eine selektive Rekrutierung von Proteinen in die *Lipid rafts* statt. Dadurch wird eine kontrollierte Proteinverteilung in der Membran gewährleistet. Dabei gibt es Proteine, die durch ihre Molekülstruktur eine größere Affinität zur *Lipid raft* Lokalisierung haben als andere Proteine. Zu diesen Proteinen zählen wichtige Signalmoleküle wie Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine in der äußeren Membranschicht und die zu den Proteintyrosinkinasen (PTK) gehörenden Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (NRTK) an der Innenseite der Membran.

2.3 *Lipid raft*-assoziierte Proteine

2.3.1 GPI-verankerte Proteine

GPI-verankerte Proteine sind Moleküle, die mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker in die äußere Membran eingebunden sind. GPI-verankerte Proteine konnten bisher in Eukaryoten und einigen Archaeobakterien, nicht jedoch in Eubakterien nachgewiesen werden (Nosjean et al., 1997), was auf ihren Ursprung in den Archaeobakterien hindeutet. Es sind mehr als 150 verschiedene GPI-verankerte Proteine bekannt. In Säugetieren umfaßt diese Proteinfamilie unter anderem hydrolytische Proteine, Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle (Cross, 1990; Ferguson and Williams, 1988; Low, 1987, 1989).

Die Kernstruktur des GPI-Ankers ist hoch konserviert. Sie besteht aus einem in der Membran verankerten Phosphatidylinositol mit gesättigten Fettsäuren, gebunden an ein Glykan, an welches sich Phosphoethanolamin und das Protein anschließen [Abb. 2; (McConville and Ferguson, 1993)].

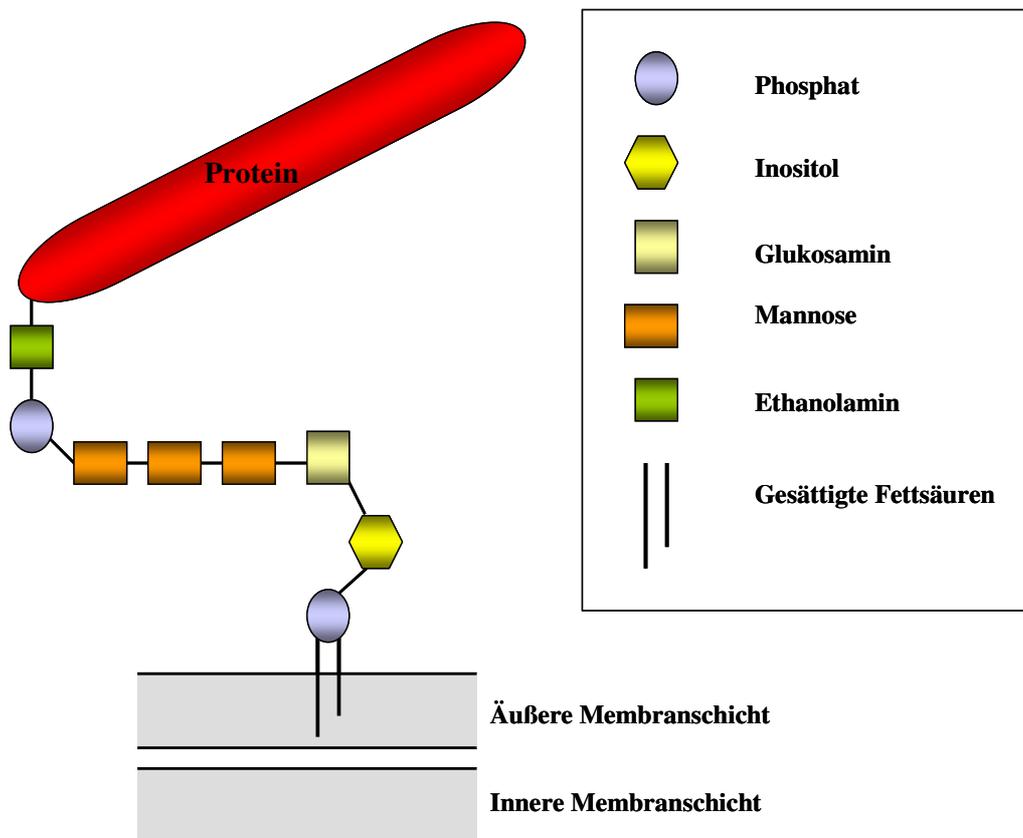


Abb. 2: Struktur eines GPI-verankerten Proteins. Der GPI-Anker besitzt eine hoch konservierte Struktur. Ein Phosphatidylinositol mit zwei gesättigten Fettsäuren, die in der äußeren Membranschicht verankert sind, ist an ein Glykan, bestehend aus Glukosamin und drei Mannoseresten gebunden. Das Glykan ist an Phosphoethanolamin gekoppelt, an welchem das Protein kovalent gebunden ist.

Die Grundstruktur des GPI-Ankers kann posttranslational modifiziert werden und somit zu einem gewissen Grad auch variieren. So können zum Beispiel weitere Phosphoethanolamine, Zucker oder eine zusätzliche Fettsäure angehängt werden (Brewis et al., 1995; Ferguson, 1992; McConville and Ferguson, 1993; McConville and Menon, 2000).

Die Funktionen von GPI-verankerten Proteinen sind äußerst vielfältig, da sie aus verschiedenen Proteinklassen stammen und das einzige allen gemeinsame Merkmal der GPI-Anker ist. Dieser Anker dient dazu, das Protein in der äußeren Membran zu stabilisieren (Bhatnagar and Gordon, 1997; Low, 1989; Low and Saltiel, 1988; McLaughlin and Aderem, 1995). Außerdem spielt er eine Rolle im gerichteten Proteintransport innerhalb der Membran (Brown et al., 1989; Craig and Banker, 1994; Lisanti et al., 1989) oder zu Membranen benachbarter Zellen (Kooyman et al., 1995).

GPI-verankerte Proteine sind in *Lipid rafts* lokalisiert und dadurch unlöslich in nicht ionischen Detergenzien wie Triton X-100 (Hooper and Turner, 1988). Sie besitzen gesättigte Fettsäuren, welche hydrophob mit den umgebenden Lipiden in *Lipid rafts* interagieren (Harder and Simons, 1997). Außerdem sorgen Bindungen zwischen der Glykan-Einheit des GPI-Ankers und Glykosphingolipiden für einer Stabilisierung des Proteins in *Lipid rafts* (Benting et al., 1999). Untersuchungen konnten zeigen, dass Proteine ihre Fähigkeit, mit *Lipid rafts* zu assoziieren, größtenteils verlieren, wenn der GPI-Anker experimentell durch eine Transmembranregion ausgetauscht wird (Brown and Rose, 1992). Das Protein kann relativ einfach vom GPI-Anker abgespalten und somit solubilisiert werden. Das verbleibende GPI dient unter anderem als *second messenger* (McConville and Ferguson, 1993; McConville and Menon, 2000).

Die Biosynthese der GPI-Anker und das Verknüpfen mit der Protein-Einheit findet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt (Udenfriend and Kodukula, 1995). Dabei werden zuerst auf der zytoplasmatischen Seite des ER die verschiedenen Zucker und Phosphoethanolamin nacheinander an das Phosphatidylinositol addiert (Nakamura et al., 1997; Vidugiriene and Menon, 1993; Watanabe et al., 1996), bevor das Protein im Lumen des ER durch eine Transamidase-Reaktion mit dem GPI verknüpft wird (Englund, 1993; Takeda and Kinoshita, 1995). Dabei wird der GPI-Anker an eine C-terminale GPI-Anker-Erkennungssequenz des Proteins gebunden (Mayor et al., 1991; Udenfriend and Kodukula, 1995; Vidugiriene and Menon, 1993). Weitere Zucker können später während des Transports durch das ER und den Golgi-Apparat addiert werden.

2.3.2 Proteintyrosinkinasen

Proteintyrosinkinasen (PTK) gehören zur Enzymklasse der Proteinkinasen. Sie sind wichtige Komponenten von zellulären Signalwegen und werden in zwei Klassen unterteilt, den Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und den Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen (NRTKs).

RTKs sind transmembrane Glykoproteine, die durch die Bindung eines Liganden aktiviert werden und dadurch ein extrazelluläres Signal in das Zytoplasma weiterleiten. Dies erfolgt durch Phosphorylierung von eigenen Tyrosinresten (Autophosphorylierung) der PTKs und durch Aktivierung nachgeschalteter Signalproteine. RTKs können verschiedene Signalwege aktivieren, welche dann Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Migration oder Metabolismusänderungen auslösen (Schlessinger and Ullrich, 1992). Vertreter der RTK Familie sind unter anderem Rezeptoren für Insulin und viele Wachstumsfaktoren.

Neben den RTKs existiert eine große Familie von NRTKs. Zu dieser Familie zählen unter anderem die Janus Kinasen (Jak), Abelson Tyrosinkinase (Abl), und Src-Kinasen. NRTKs sind integrale Komponenten von Signalkaskaden, welche durch RTKs oder andere Zelloberflächen-Rezeptoren ausgelöst werden. Sie besitzen keine Rezeptoreigenschaften wie eine extrazelluläre Bindedomäne für Liganden oder einen die Membran durchspannenden Bereich.

NRTKs sind hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Neet and Hunter, 1996) und können durch aminoterminaler Modifikation wie Myristoylierung und Palmitoylierung in der Membran verankert sein. Zusätzlich zu ihrer Tyrosinkinase-Domäne besitzen sie Domänen, die Protein-Protein-, Protein-Lipid- und Protein-DNA-Bindungen unterstützen. Die bekanntesten Protein-Protein-Bindedomänen in NRTKs sind die SH2 (SH = Src homology)- und die SH3-Domänen (Kuriyan and Cowburn, 1997). Die SH2-Domäne umfaßt einen Bereich von zirka 100 Aminosäureresten, und dient als Erkennungssequenz für Phosphotyrosine (Pawson, 1995). Die kleinere SH3-Domäne ist ungefähr 60 Aminosäurereste groß und fungiert als Erkennungsregion für prolinreiche Aminosäuresequenzen (P-X-X-P). Sie spielt eine wesentliche Rolle in der negativen Regulation der enzymatischen Aktivität von Kinasen (Bar-Sagi et al., 1993). Nicht alle NRTKs besitzen eine SH2- oder SH3-Domäne, können jedoch andere spezifische Domänen für Protein-Protein-Interaktionen nutzen.

2.3.2.1 Src-Kinasen

Die Familie der Src-Kinasen gehört zu den am häufigsten untersuchten Kinasen und bildet die größte Untergruppe der NRTKs. Sie umfaßt neun Mitglieder, von denen zum Teil durch alternatives Splicing verschiedene Isoformen exprimiert werden (Brown and Cooper, 1996). Die Namensgebung für diese Familie geht auf die Entdeckung des Onkogens v-src zurück, welches Tyrosinkinase-Aktivität besitzt und das transformierende Onkogen des Rous-Sarkom-Virus ist (Jove and Hanafusa, 1987). Src-Kinasen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit, über die SH2- und SH3-Domänen in Interaktion mit anderen Proteinen zu treten, eine zentrale Rolle in der Regulierung vieler Signaltransduktionswege.

Insgesamt besitzen die Src-Kinasen sechs funktionelle Abschnitte (Abb. 3). Die N-terminale Myristoylierungsstelle ist für die Verankerung in der Zellmembran verantwortlich (Resh, 1993). Die Fettsäure Myristat wird über eine Amidbindung mit einem konservierten Glycin verknüpft (David-Pfeuty et al., 1993; Resh, 1996). An die Myristoylierungsstelle schließt sich eine *unique*-Region an, die innerhalb der Familie der Src-Kinasen eine sehr unterschiedliche

Aminosäuresequenz aufweist. Diese Domäne scheint einen Einfluß auf die Spezifität der Kinasen zu haben. Darauf folgen die oben beschriebenen SH3- und SH2-Domänen. An die SH2-Domäne schließt sich die Kinasedomäne mit der höchsten Sequenzhomologie innerhalb der Familie der Src-Kinasen an. Sie besteht aus zwei Subdomänen, der N-Schleife und der C-Schleife, zwischen denen das katalytische Zentrum liegt. Das Protein wird durch eine C-terminale Region abgeschlossen, die wichtig für die Regulation der Kinase-Aktivität ist. An diesem C-terminalen Ende befindet sich ein Tyrosinrest, dessen Phosphorylierungszustand die Aktivität des Proteins bestimmt (Cartwright et al., 1987; Cooper and King, 1986). Die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes reduziert die Kinaseaktivität (Brown and Cooper, 1996; Lowell and Soriano, 1996; Nada et al., 1991), während die Dephosphorylierung zu einem Anstieg der Aktivität der Src-Kinase führt (Hunter, 1997). Durch die Dephosphorylierung wird eine Autophosphorylierungsstelle innerhalb der Kinase-Domäne frei, die aufgrund der Proteinfaltung in der inaktiven Kinase unzugänglich ist (LaFevre-Bernt et al., 1998; Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997). Eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes innerhalb der Kinase-Domäne bewirkt eine maximale Stimulation der Kinase-Aktivität.

Die meisten Src-Kinasen werden einer posttranslationalen Modifikation in Form einer Palmitoylierung an einem oder zwei Cysteinresten in Position 3, 5 oder 6 unterzogen. Diese Modifikation findet in der Nähe des myristoylierten N-Terminus statt. Die Myristoylierung ist dabei Voraussetzung für eine anschließende Palmitoylierung (Koegl et al., 1994). Die Kinasen p60^{src}, p55^{blk} und die p61^{hck} sind nur myristoyliert (Koegl et al., 1994; Paige et al., 1993; Robbins et al., 1995; Shenoy-Scaria et al., 1994; Yurchak and Sefton, 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass Src-Kinasen in *Lipid rafts* lokalisiert sein können. Dadurch sind sie in verschiedene Signaltransduktionsprozesse involviert und können Signale von Transmembran- oder GPI-verankerten Proteinen in das Zellinnere weiterleiten (Cantley et al., 1991; Rudd et al., 1993).

2.3.2.2 p60^{src} und p59^{fyn}

Die Tyrosinkinase p60^{src} und p59^{fyn} sind zwei gut untersuchte Vertreter der Src-Kinasen, die in Neuronen wichtige Signalwege regulieren. Anhand ihrer Modifikationen lassen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern der Src-Familie besonders deutlich herausstellen. Beide oben genannten Src-Kinasen werden in allen Geweben exprimiert und weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf (Abb. 3).

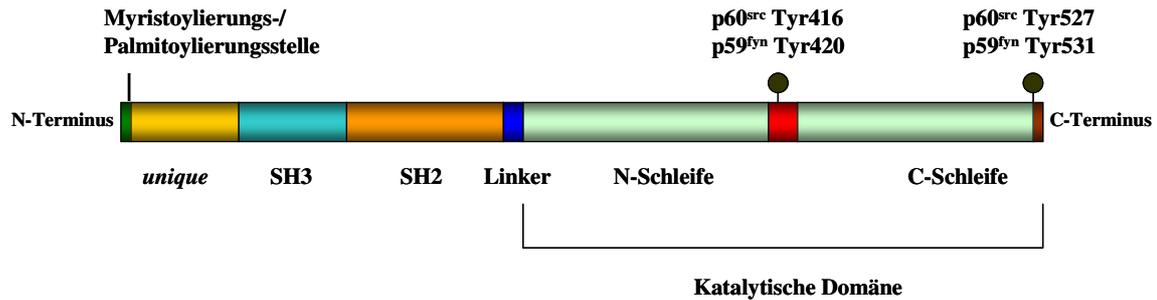


Abb. 3: Struktur der Src-Kinasen p60^{src} und p59^{fyn}. An die N-terminale Sequenz, die sowohl die Myristoylierungsstelle (p60^{src} und p59^{fyn}) als auch die Palmitoylierungsstelle (p59^{fyn}) enthält, schließen sich nachfolgend die *unique*-Region, die SH3- und die SH2-Domänen an, welche für die Bindungseigenschaften der Kinasen verantwortlich sind. Nach dem Linker folgt die für die Enzymaktivität verantwortliche katalytische Domäne mit den zwei regulatorischen Tyrosinresten.

Wegen der ähnlichen Struktur und der gleichmäßigen Verteilung, besitzen beide Kinasen überlappende Funktionen und können teilweise füreinander kompensierend wirken (Roche et al., 1995; Thomas et al., 1995). Die Phänotypen der knockout-Mäuse sind jedoch sehr unterschiedlich, was zeigt, dass beide Proteine auch Funktionen unabhängig voneinander besitzen (Soriano et al., 1991; Stein et al., 1994). So ist zum Beispiel bei p59^{fyn}-knockout Mäusen die Signaltransduktion in Thymozyten beeinträchtigt (Gauen et al., 1994), während p60^{src}-knockout-Mäuse aufgrund von gestörter Osteoplastenfunktion Osteopetrose entwickeln (Soriano et al., 1991). Die molekularen Mechanismen für die Differenzen in den Funktionen von p59^{fyn} und p60^{src} sind noch weitgehend unklar. Unterschiede zwischen den einzelnen NRTKs können durch Abweichungen in der Aktivierung und der Lokalisation in der Membran herrühren.

Im Gegensatz zu p60^{src} enthält p59^{fyn} Cysteinreste in unmittelbarer Nähe zu den myristoylierten Glycinresten, welche palmytoyliert werden können (Resh, 1994). Somit sind beide Proteine zwar myristoyliert, aber während p59^{fyn} palmitoyliert ist, besitzt p60^{src} diese zusätzliche Lipid-Modifikation nicht. Es konnte gezeigt werden, dass p59^{fyn} aufgrund der zusätzlichen Modifikation hauptsächlich in *Lipid rafts* lokalisiert ist (Shenoy-Scaria et al., 1994). Im Gegensatz dazu kann p60^{src} in verschiedenen Membrankompartimenten lokalisiert sein, neben *Lipid rafts* hauptsächlich in fokalen Adhäsionen und Endosomen (Courtneidge et al., 1980; Garber et al., 1983; Kaplan et al., 1992). Auch p59^{fyn} kann in Endosomen detektiert

werden. Im Gegensatz zu p60^{src} jedoch, welches in RhoB-positiven Endosomen lokalisiert ist, findet man p59^{fyn} in RhoD-positiven Endosomen. Sandilands *et al.* (2007) konnten durch Modifikationen der Src-Kinasen zeigen, dass p60^{src}, welches experimentell palmitoyliert wurde, ähnlich wie p59^{fyn} überwiegend in RhoD-positiven Endosomen lokalisiert ist. Eine Modifikation von p59^{fyn}, die bewirkt, dass p59^{fyn} nicht mehr palmitoyliert ist, führt zu einer Kolokalisation mit p60^{src} in RhoB-positiven Endosomen. Somit ist die Palmitoylierung zumindest ein Kriterium für die unterschiedliche Lokalisierung beider Src-Kinasen innerhalb der Membran. Es scheint, dass die Lokalisierung der Src-Kinasen in den korrekten Membrandomänen Voraussetzung für eine Aktivierung und korrekte Signaltransduktion ist.

2.4 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle sind membranständige Zelloberflächenglykoproteine. Sie dienen der Adhäsion von Zellen mit der umgebenden Extrazellulärmatrix. Außerdem spielen sie eine Rolle bei Zellinteraktionen, Zellmigration, Zellerkennung und Zelldifferenzierung. Zelladhäsionsmoleküle können außerdem als Signalvermittler fungieren, was bedeutet, dass sie Signale aus der näheren Umgebung aufnehmen und ins Zellinnere weiterleiten können. So kann die Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen intrazellulär zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und zu einer Initiation von Signaltransduktionsprozessen führen, was wiederum zu einer Änderung der Genexpression führen kann (Aplin *et al.*, 1998). Diese Funktionen können Zelladhäsionsmoleküle durch ihre Bindungen zu Proteinen des Zytoskeletts und anderen intrazellulären Signalmolekülen, wie zum Beispiel Proteinkinasen ausführen. Des Weiteren tragen Zelladhäsionsmoleküle zur dreidimensionalen Stabilität einer Zelle bei (Gumbiner, 1996).

Wie in anderen Geweben auch, spielen im Nervensystem Zell-Zell- und Zell-Extrazelluläre Matrix-Kontakte eine wesentliche Rolle, um Signale in die Zelle weiterzuleiten. In der Embryonalentwicklung wachsen Axone und Dendriten über verschiedene Substrate zu ihren Zielgebieten, um dort synaptische Verbindungen zu knüpfen. Auf der Oberfläche der Wachstumskegel herrscht eine hohe Dichte von Zelladhäsionsmolekülen und Signalrezeptoren, die mit dem Zytoskelett interagieren. Dadurch werden gerichtetes Wachstum, Zielfindung und spezifische Verschaltungen von Nervenzellen möglich. Zelladhäsionsmoleküle lassen sich aufgrund verschiedener Struktur- und Funktionsmerkmale in vier Proteinfamilien zusammenfassen (Aplin *et al.*, 1998): die Immunglobulin-Superfamilie

(Brummendorf and Rathjen, 1996), die Cadherine (Takeichi, 1990), die Integrine (Reichardt and Tomaselli, 1991) und die Selektine (Lasky, 1995).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1 näher beschrieben werden. Beide Proteine gehören zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle des Nervensystems, einer Unterfamilie der IgSF.

2.4.1 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)

Die Zelladhäsionsmoleküle der IgSF spielen sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Nervensystem eine zentrale Rolle. Sie haben Einfluss auf die Zellmigration, das Zellüberleben, axonale Wegfindung und Neuritenwachstum.

Die IgSFs wurde 1977 mit der Entdeckung des Neurales Zelladhäsionsmoleküls NCAM begründet (Brackenbury et al., 1977; Thiery et al., 1977). Die Vertreter dieser Protein-Familie zeichnen sich durch die Immunglobulin-Domänen (Ig-Domänen) im extrazellulären Bereich aus. Vaughn und Bjorkman (Vaughn and Bjorkman, 1996) konnten zeigen, dass diese Domänen Strukturähnlichkeiten mit den Immunglobulin-Domänen der Antikörper aufweisen und in der Regel aus 55-57 Aminosäuren bestehen, die durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die Anzahl der Ig-Domänen variiert innerhalb der Ig-Superfamilie stark. Weiterhin besitzen viele Vertreter der Familie Fibronectin Typ III-homologe Domänen (FN-Domänen), die den Strukturelementen des Fibronectins ähneln und zur Adhäsion beitragen (Kimizuka et al., 1991; Main et al., 1992). An die FN-Domänen schließen sich in der Regel eine transmembrane und eine zytoplasmatische Domäne an. Einige Mitglieder der IgSFs sind jedoch durch ein GPI in der Zellmembran verankert. Hierzu zählen zum Beispiel TAG-1, F3 und NCAM120. Die Ig-Domänen können glykosyliert sein. N- oder O-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate spielen bei der Zell-Zell-Interaktion eine wichtige Rolle (Kleene and Schachner, 2004; Schachner and Martini, 1995; Varki, 1993).

2.4.1.1 NCAM

NCAM hat drei Hauptisoformen, die durch alternatives Splicen einer prä-mRNA, die das Transkriptionsprodukt eines einzelnen Gens darstellt, entstehen (Owens et al., 1987). Diese Isoformen werden entsprechend ihres Molekulargewichtes als NCAM120, NCAM140 und NCAM180 bezeichnet (Cunningham et al., 1987; Goridis et al., 1983; Murray et al., 1986). Die drei Isoformen werden zelltypspezifisch und zeitlich verschieden voneinander exprimiert. In der Struktur ähneln sie sich jedoch stark. Die extrazelluläre Domäne aller drei Isoformen besteht aus fünf Ig-Domänen (Chothia and Jones, 1997) und zwei FN-Domänen (Jorgensen, 1995) (Abb. 4). Die extrazelluläre Domäne ist bei der Isoform NCAM120 durch GPI in der Membran verankert, während NCAM140 und NCAM180 einen transmembranen Bereich und eine darauffolgende zytoplasmatische Domäne besitzen, welche sich dadurch unterscheidet, dass NCAM180 ein zusätzliches Insert aus 261 Aminosäuren besitzt (Edelman, 1986; Maness and Schachner, 2007).

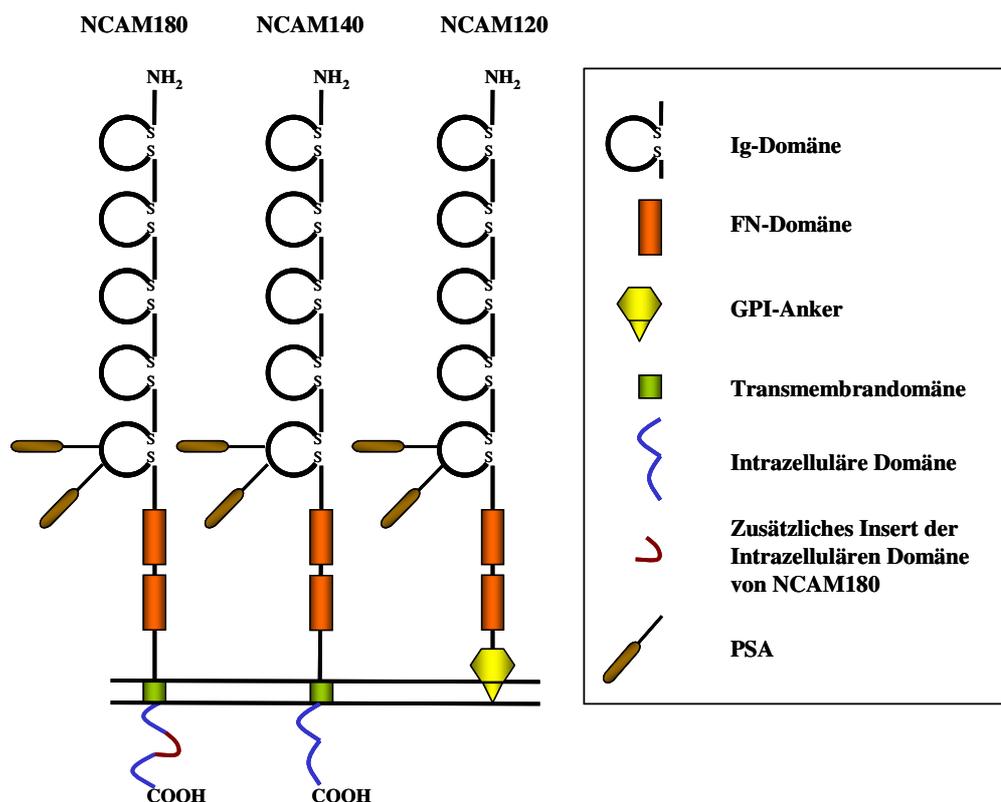


Abb. 4: Struktur des Neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM. NCAM besitzt drei Hauptisoformen, die nach ihren Molekulargewichten als NCAM180, NCAM140 und NCAM120 bezeichnet werden. Alle drei Isoformen besitzen fünf Ig-Domänen und zwei FN-Domänen. NCAM180 und NCAM140 besitzen außerdem nachfolgend an eine Transmembrandomäne einen zytoplasmatischen Bereich, der bei NCAM180 aufgrund einer zusätzlichen Aminosäuresequenz länger ist. NCAM120 ist in der Membran GPI-verankert.

Wie bei allen Mitgliedern der Ig-Superfamilie kann auch NCAM verschiedene posttranslationale Modifikationen durchlaufen. So können alle NCAM Isoformen glykosyliert sein. Eine Besonderheit unterscheidet NCAM von allen anderen Vertretern der Ig-Superfamilie. Es besitzt zwei Glykosylierungsstellen innerhalb der fünften Ig-Domäne, an welche durch N-Glykosylierung das lineare Homopolymer Polysialinsäure (PSA) geknüpft werden kann. PSA besteht aus α -2,8 verknüpften N-Acetyl-Neuraminsäureresten und kann Ketten mit Längen von mehr als 100 Monomeren aufweisen (Angata et al., 1997). Das PSA-Epitop hat entscheidenden Einfluss auf die Bindungseigenschaften von NCAM. Es kann durch seine räumliche Ausdehnung homophile und heterophile Bindungen in *cis* und *trans*, und somit Bindungen zwischen Zellmembranen zweier Zellen oder Bindungen einer Zelle an die extrazelluläre Matrix sterisch behindern (Bruses and Rutishauser, 2001; Rutishauser, 1996).

Wie bereits erwähnt, werden die Isoformen von NCAM sowohl zelltypspezifisch, als auch zeitlich getrennt voneinander exprimiert. NCAM140 spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des Nervensystems und wird daher in der frühen Neurogenese auf Gliazellen, Wachstumskegeln und Axonschäften auswachsender Neurone exprimiert. Es ist dort an Prozessen, wie der Zellmigration und Axonfaszikulation beteiligt. NCAM180 dagegen ist hauptsächlich auf postsynaptischen Arealen reifer Neurone zu finden, um dort an Regeneration und Plastizität des Nervensystems mitzuwirken. Seine Expression findet also in der späten Entwicklung des Nervensystems statt. Die Isoform NCAM120 findet man vorwiegend auf Gliazellen (Maness and Schachner, 2007; Persohn et al., 1989). Auch einige nicht-neuronale Zellen exprimieren NCAM. So läßt es sich unter anderem in Skelettmuskelzellen, natürlichen Killerzellen und einigen endokrinen Geweben nachweisen.

NCAM ist in der Entwicklung des Nervensystems und im adulten Organismus an vielen Prozessen beteiligt. So konnte ein Einfluss von NCAM auf die Migration von Neuroblasten, dem Neuritenwachstum und der Neurulation beobachtet werden. Es spielt eine Rolle bei der Synapsenbildung- und stabilisierung und die Expression des Proteins ist während des Lernens erhöht (Rose, 1996).

Obwohl NCAM viele Funktionen einnehmen kann, sind NCAM-knockout-Mäuse, auch wenn alle drei Hauptisoformen betroffen sind, lebens- und fortpflanzungsfähig (Cremer et al., 1994). Sie zeigen eine um 10% reduzierte Gehirnmasse und eine Verringerung des olfaktorischen Systems durch verminderte Migration von neuronalen Vorläuferzellen aus der Ventrikularzone (Cremer et al., 1994; Holst et al., 1998; Tomasiewicz et al., 1993). Außerdem zeigen NCAM-defiziente Mäuse Verhaltensauffälligkeiten wie zum Beispiel Antriebslosigkeit, eine deutlich verminderte Lernfähigkeit und aggressives Verhalten. Diese

Symptome scheinen aber eher durch das Fehlen von PSA hervorgerufen zu werden. Wahrscheinlich besitzen andere Zelladhäsionsmoleküle wie zum Beispiel das olfaktorische Zelladhäsionsmolekül OCAM die Fähigkeit, einige Funktionen von NCAM zu übernehmen und somit bei einem Fehlen von NCAM dieses zu kompensieren (Hu et al., 1996; Muller et al., 1996).

Bei Menschen konnte NCAM mit mehreren neurologischen Störungen in Verbindung gebracht werden. So zeigten unterschiedliche Studien eine Erhöhung der NCAM-Expression in der Zerebrospinalflüssigkeit von Patienten mit Schizophrenie und Depression (Poltorak et al., 1995; van Kammen et al., 1998).

2.4.1.2 L1

L1 gehört wie NCAM zur Ig-Superfamilie (Moos et al., 1988) und bildet innerhalb dieser Molekülfamilie zusammen mit Nr-CAM (Grumet et al., 1991), Neurofascin (Rathjen et al., 1987) und CHL1 (Holm et al., 1996) in der Maus, sowie deren Homologe in anderen Spezies (Bieber et al., 1989; Davis et al., 1993; Grumet et al., 1984) die L1-Unterfamilie (Rathjen and Schachner, 1984).

L1 ist ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 220 kDa und spielt sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Nervensystem eine Rolle. Es konnte auf der Zelloberfläche postmitotischer Neurone, ihrer Axone und Wachstumskegel identifiziert werden (Faissner et al., 1984; Rathjen and Schachner, 1984). L1 wird auch in Schwanzzellen, Melanozyten, hämatopoetischen Zellen und Epithelzellen exprimiert (Kadmon et al., 1998; Martini and Schachner, 1986; Martini et al., 1994; Nolte et al., 1999; Pancook et al., 1997; Takeda et al., 1996). Weiterhin scheint L1 bei Tumorwachstum und Metastasierung eine Rolle zu spielen, da es in vielen Tumorzelllinien, wie Neuroblastom- und Karzinomzellen exprimiert wird (Linnemann and Bock, 1989; Pancook et al., 1997; Reid and Hemperly, 1992).

L1 besteht aus sechs Ig-Domänen, fünf FN-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer kurzen hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne (Abb. 5).

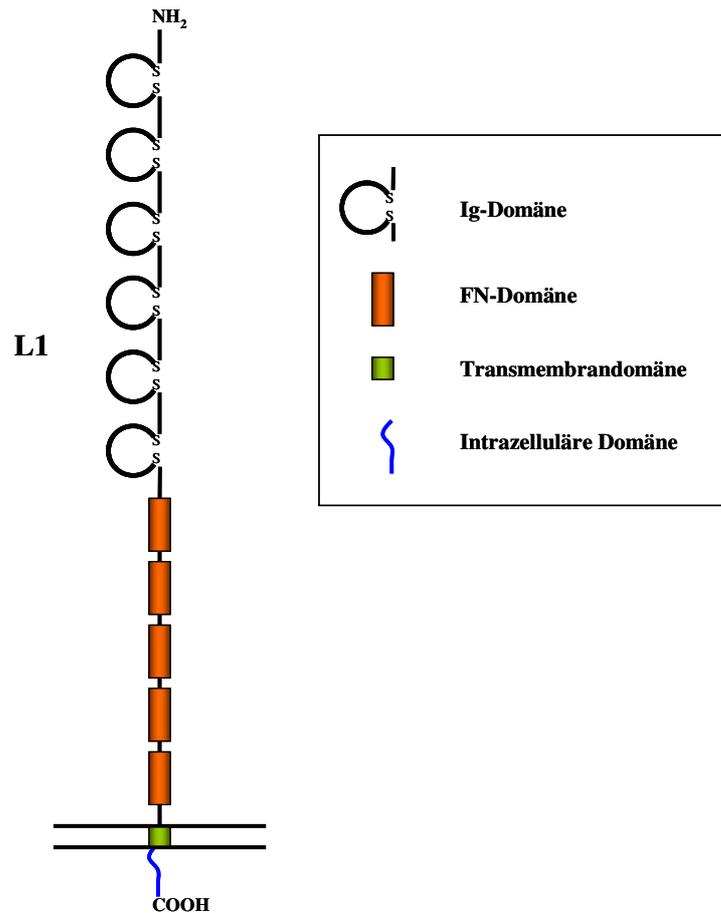


Abb. 5: Struktur des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1. L1 besitzt sechs Ig-Domänen und fünf FN-Domänen. An die FN-Domänen schließt sich ein transmembraner und ein zytoplasmatischer Bereich an.

Die extrazelluläre Domäne ist nicht nur für homophile Interaktionen, also L1-L1-Bindungen verantwortlich (Lemmon et al., 1989; Moos et al., 1988), sondern geht auch heterophile Bindungen mit anderen Proteinen ein. So konnten Bindungen zu den GPI-verankerten Zelladhäsionsmolekülen F3 und TAG-1 nachgewiesen werden (Brummendorf et al., 1993; Kuhn et al., 1991; Malhotra et al., 1998). Die Interaktion zwischen TAG-1 und L1 vermittelt Neuritenwachstum und Neuritenfaszikulation. Außerdem konnte TAG-1 als Korezeptor von L1 beschrieben werden (Buchstaller et al., 1996; Kuhn et al., 1991; Kunz et al., 1998). Für die Interaktion von L1 mit F3 ist die Bedeutung noch ungeklärt (Faivre-Sarrailh and Rougon, 1997; Olive et al., 1995). Auch NCAM kann mit L1 interagieren (Kadmon et al., 1990a). Diese Bindung ist von oligomannosidischen Zuckerstrukturen am L1-Molekül abhängig, die von einer Bindungsdomäne innerhalb der vierten Ig-Domäne des NCAM erkannt werden (Horstkorte et al., 1993; Kadmon et al., 1990a). Durch diese Interaktion wird die Bildung von

homophilen Bindungen zwischen L1-Molekülen unterstützt (*cis-assisted homophilic binding*). L1 interagiert mit einigen Integrinen, zum Beispiel dem Fibronectin-Rezeptor $\alpha 5\beta 1$ und dem Vitronectin-Rezeptor $\alpha v\beta 3$, um Adhäsion und Neuritenwachstum auf L1 Substrat auszulösen (Ebeling et al., 1996; Felding-Habermann et al., 1997; Montgomery et al., 1996; Moos et al., 1988; Ruppert et al., 1995). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass L1 durch $\alpha 5\beta 1$ Integrine die Migration in Richtung Fibronectin in HEK 293 Zellen verstärkt (Thelen et al., 2002). Weitere identifizierte Interaktionspartner von L1 sind unter anderem Rezeptor-Tyrosinphosphatasen (Friedlander et al., 1994) und der FGF-Rezeptor, der dadurch L1-vermitteltes Neuritenwachstum unterstützt (Doherty and Walsh, 1996).

Die zytoplasmatische Domäne kann Bindungen zu Molekülen des Zytoskeletts eingehen und mit Signaltransduktionsmolekülen, wie zum Beispiel den Proteinkinasen interagieren (Kenwrick et al., 2000). So konnte zum Beispiel eine Ankyrin-Bindedomäne im C-Terminus der zytoplasmatischen Domäne identifiziert (Davis and Bennett, 1994) und später auch eine direkte Bindung an Ankyrin nachgewiesen werden (Bennett and Chen, 2001). Womöglich stabilisiert die Ankyrin-Bindung eine L1-L1-Interaktion. Die zytoplasmatische Domäne von L1 enthält außerdem mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen und kann somit durch Kinasen phosphoryliert werden (Wong et al., 1996; Zisch et al., 1997), wodurch wiederum die L1-Zytoskelett-Interaktionen beeinflusst werden können (Zhang et al., 1998b). Die intrazelluläre Domäne im neuronalen L1 besitzt eine durch alternatives Splicing entstandene spezifische Sequenz Arg-Ser-Leu-Glu (RSLE), welche, zusammen mit einem Tyrosinrest, ein Signal für axonale Zielfindung und Clathrin- und Dynamin-vermittelte Endozytose darstellt (Kamiguchi and Lemmon, 1998; Kamiguchi et al., 1998).

L1 nimmt aufgrund der vielfältigen Interaktionspartner unterschiedliche Funktionen bei der Zelladhäsion (Grumet and Edelman, 1988; Moos et al., 1988; Rathjen and Schachner, 1984), der Zellmigration (Lindner et al., 1983), der Axonwegfindung (Castellani et al., 2000; Cohen et al., 1998), Axonwachstum und -faszikulierung (Fischer et al., 1986; Kunz et al., 1998; Lemmon et al., 1989; Rathjen et al., 1987), dem Zellüberleben von Neuronen (Chen et al., 1999; Loers et al., 2005), der Myelinisierung (Wood et al., 1990) und bei den Vorgängen der synaptischen Plastizität (Luthi et al., 1996) ein. Außerdem ist L1 an Signalwegen von Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt (Arami et al., 1996; Law et al., 2003; Luthi et al., 1996; Saghatelian et al., 2004; Scholey et al., 1995).

Das L1 Gen liegt beim Menschen auf dem Chromosom Xq28. Es sind mehr als hundert Mutationen im L1-Gen beim Menschen bekannt, die zu sehr unterschiedlichen Krankheitsbildern führen können (Kenwrick et al., 2000; Van Camp et al., 1996; Weller and

Gartner, 2001). Aufgrund der am häufigsten vorkommenden Symptome werden diese Krankheitsbilder als CRASH-Syndrom (*Corpus callosum hypoplasia, mental retardation, adducted thumbs, spasticity paraplegia and hydrocephalus*) bezeichnet (Fransen et al., 1996). Dabei liegen neurologische Störungen wie ein Hydrozephalus, Hypoplasie des corticospinalen Traktes und Corpus callosum im Vordergrund (Weller and Gartner, 2001). Auch Paraplegie der unteren Extremitäten wurde beschrieben. Die Schwere der Störungen wird dabei von der Art der Mutation bestimmt. Mutationen, welche die extrazelluläre Domäne des L1-Moleküls betreffen, führen eher zu schweren neurologischen Störungen, da sie teilweise den Verlust der Proteinfunktion nach sich ziehen, indem sie sowohl hetero- als auch homophile Interaktionen verhindern (Yamasaki et al., 1997). Eine Mutation in der zytoplasmatischen Domäne dagegen bringt meist weniger ausgeprägte Krankheitssymptome mit sich (Hortsch et al., 1995; Wong et al., 1995).

Bei L1-defizienten Mäusen können ähnliche Symptome wie bei Mutationen des menschlichen L1-Gens beobachtet werden. Sie zeigen ebenfalls Hydrozephalus, Hypoplasie des corticospinalen Traktes, des Corpus callosum und zusätzlich des Vermis cerebelli. Außerdem sind das Körpergewicht und die Lebenserwartung der Mäuse reduziert. Sie zeigen motorische Defizite und sind größtenteils infertil (Cohen et al., 1998; Dahme et al., 1997; Demyanenko et al., 1999; Fransen et al., 1998; Kamiguchi et al., 1998). Daher stellen L1-defiziente Mäuse ein geeignetes Tiermodell für die Analyse von L1-Mutationen und der Funktionen des L1-Moleküls dar.

2.4.2 Signaltransduktion und Neuritenwachstum durch NCAM und L1

NCAM und L1 haben beide die Möglichkeit, als membranständige Zelloberflächenmoleküle Signaltransduktionsvorgänge auszulösen (Doherty et al., 2000; Schuch et al., 1989). Vor allem in der Entwicklung des Nervensystems spielen Zelladhäsionsmoleküle durch das Vermitteln von Neuritenwachstum eine entscheidende Rolle.

NCAM kann durch homophile und heterophile Bindungen mit anderen Molekülen der Extrazellulären Matrix oder benachbarter Zellen Neuritenwachstum auslösen (Crossin and Krushel, 2000; Doherty et al., 1990). So konnte für NCAM140 gezeigt werden, dass ein Clustern des Moleküls durch homophile Interaktionen eine RPTP α vermittelte Dephosphorylierung und Aktivierung der Src-Kinase p59^{fyn} in *Lipid rafts* auslöst (Bodrikov et al., 2005), wodurch die fokale Adhäsionskinase FAK rekrutiert und transient aktiviert wird (Beggs et al., 1997; Beggs et al., 1994). Dies führt wiederum zur Aktivierung von c-Ras1

(Ras), einem kleinen GTP-bindenden Protein. Von Ras aus wird der Signalweg über eine Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase c-Raf1 (Raf) und weiter über MEK1/2 fortgeführt, wodurch ERK1/2 phosphoryliert wird. Diese Signalkaskade wird als mitogen-aktivierter Protein-Kinase (MAPK) -Signalweg bezeichnet (Kolkova et al., 2000; Schmid et al., 1999) und bringt eine Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB mit sich, welcher für das Auslösen von Neuritenwachstum notwendig ist (Jessen et al., 2001; Schmid et al., 1999). Jessen *et al.* (2001) konnten außerdem zeigen, dass nicht nur CREB, sondern auch der Transkriptionsfaktor c-FOS für NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum PC12 Zellen notwendig ist. Weder CREB noch c-FOS können die Inaktivierung des jeweils anderen Transkriptionsfaktors kompensieren.

Es scheint also möglich, dass ein Teil der von der Zelle exprimierten NCAM140-Moleküle konstitutiv mit p59^{fyn} in *Lipid rafts* assoziiert ist. Die Stabilisierung des NCAM/RPTP α /p59^{fyn}-Komplexes in *Lipid rafts*, welche wichtig für die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade ist, wird durch die Bindung von NCAM140 an das Prion-Protein PrP, ein GPI-verankertes und somit *Lipid raft*-assoziiertes Protein, erreicht (Santucci et al., 2005). Ist diese Interaktion in hippokampalen Neuronen gestört, zum Beispiel in NCAM- oder PrP-defizienten Mäusen, oder durch Blockierung der Bindestelle durch spezifische Antikörper, kann eine Beeinträchtigung des Neuritenwachstums beobachtet werden.

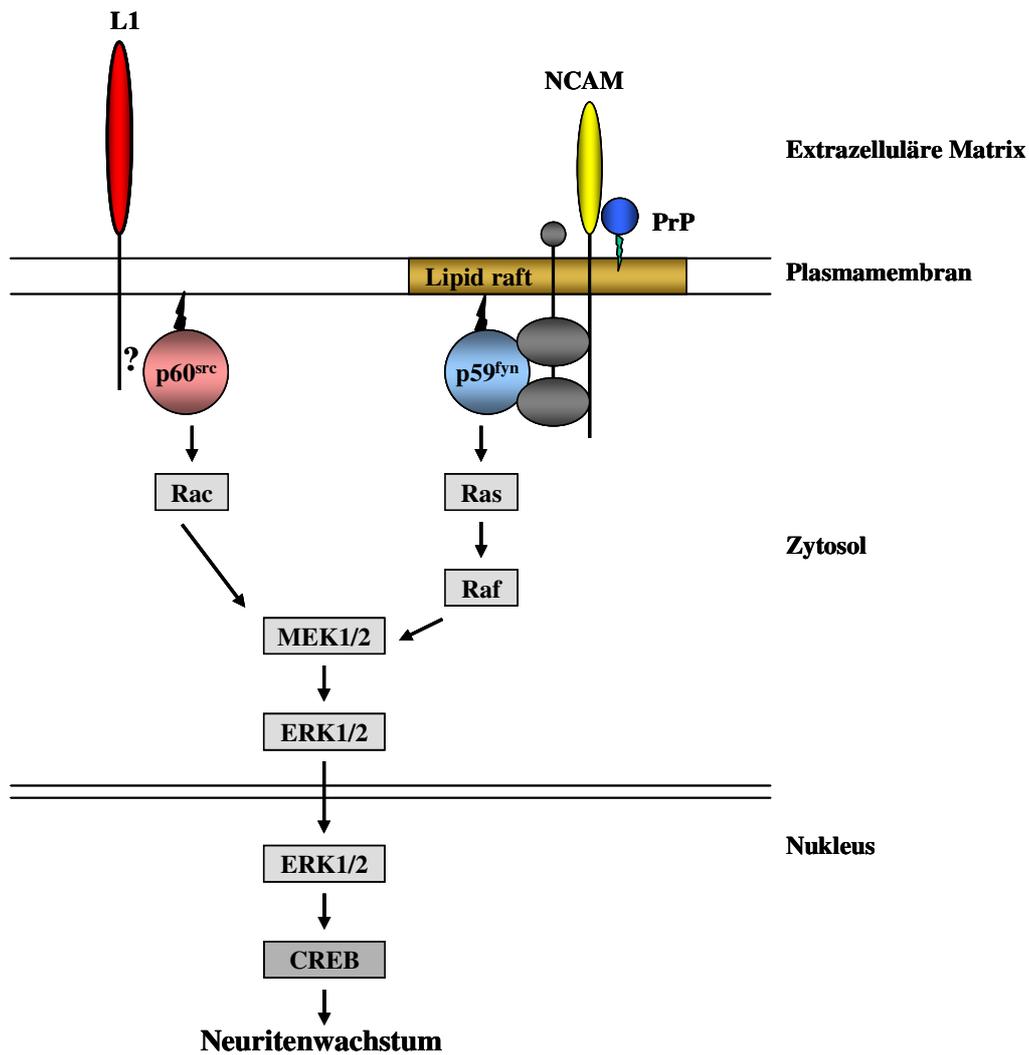


Abb. 6: Modell der von L1 und NCAM aktivierten MAPK-Signalkaskaden. NCAM rekrutiert RPTP α in *Lipid rafts* (Bodrikov et al., 2005), wo durch Stabilisierung des Proteinkomplexes aufgrund der Interaktion zwischen NCAM und PrP die Src-Kinase p59^{fyn} aktiviert wird (Santuccione et al., 2005). Dadurch werden Ras und Raf stimuliert (Kolkova et al., 2000; Walmod et al., 2004), wodurch letztendlich der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert und dadurch Neuritenwachstum ausgelöst wird. L1 kann durch Aktivierung der Src-Kinase p60^{src} und darauffolgende Aktivierung von Rac die gleiche MAPK-Signalkaskade regulieren (Kenwick et al., 2000; Panicker et al., 2003). Auf welchem Weg L1 die Src-Kinase p60^{src} aktiviert, ist noch weitgehend ungeklärt. Eine direkte Bindung konnte noch nicht nachgewiesen werden.

Außerhalb von *Lipid rafts* kann NCAM durch Binden an den FGF-Rezeptor Signaltransduktion ausüben (Niethammer et al., 2002). Durch diese Interaktion wird die Phospholipase C γ (PLC γ) aktiviert (Doherty et al., 2000; Saffell et al., 1997), welche Phosphoinositol-4,5-bisphosphat zu Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert. Die DAG-Lipase wandelt anschließend DAG zu Arachidonsäure um, welche N- und L-Typ Kalziumkanäle aktivieren kann. Beide durch NCAM aktivierten Signalkaskaden arbeiten zelltypspezifisch entweder unabhängig oder abhängig voneinander. So scheint in hippokampalen Neuronen eine gemeinsame Aktivierung beider Signalwege wichtig für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum zu sein, da das Inhibieren eines der Signalwege das gesamte Neuritenwachstum reduziert. In Neuroblastomazellen dagegen ist der FGF-Rezeptor für die NCAM-abhängige Aktivierung von ERK nicht von Bedeutung (Niethammer et al., 2002; Schmid et al., 1999).

Auch L1 kann über den MAP-Kinase-Signalweg Signaltransduktion ausführen (Abb. 6). Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass eine Inhibition von FAK, Ras, Raf oder MEK sowohl NCAM- als auch L1-abhängiges Neuritenwachstum beeinträchtigt (Kolkova et al., 2000; Schmid et al., 1999). Außerdem verstärkt L1 die haptotaktische Migration von B35 Neuroblastomazellen in Richtung Fibronectin, Vitronectin und Laminin durch Aktivierung der Kaskade p60^{src}, Phosphatidylinositol-3-Kinase und MAP-Kinase (Thelen et al., 2002). L1 verstärkt Neuritenwachstum in Zellkultur durch einen Signalweg, welcher p60^{src} (Ignelzi et al., 1994), Phosphatidylinositol-3 (PI3)-Kinase, Rac1 GTPase (Schmid et al., 2000) und die MAP-Kinase (Schaefer et al., 1999; Schmid et al., 2000) einschließt. Dieser MAPK-Signalweg steht in Beziehung zu einer Signalkaskade, die durch die Aktivierung von Integrinen gestartet wird (Clark et al., 1998; Meng and Lowell, 1998; Miranti et al., 1998).

Die RSLE Sequenz, welche für die Clathrin-abhängige Endozytose von L1 verantwortlich ist (Long et al., 2001; Schaefer et al., 1999), ist auch verantwortlich für die L1-verstärkte Migration und die MAPK-Aktivierung (Thelen et al., 2002).

Die Tyrosinkinase p60^{src} ist für die Dynamin-vermittelte Endozytose von L1 (Schmid et al., 2000) und anderen Rezeptoren (Carpenter, 2000) notwendig, da p60^{src} Tyrosinreste von Komponenten des endozytotischen Signalweges phosphorylieren kann (Ahn et al., 1999; Luttrell et al., 1999). Außerdem führt die Stimulation von EGF (*epidermal growth factor*) zu einer p60^{src} vermittelten Tyrosinphosphorylierung und Rekrutierung von Clathrin in Membranen (Wilde et al., 1999). Neueste Arbeiten zeigen, dass eine Interaktion zwischen Nrp1 und L1 die Sema3A-induzierte FAK-MAPK-Kaskade aktiviert (Bechara et al., 2008).

Die Entdeckung einer 20 Aminosäuren langen Region in der zweiten Ig-Domäne des FGF-Rezeptors, die einer kurzen Peptidsequenz innerhalb der extrazellulären Domäne von NCAM, N-Cadherin und L1 ähnelt (CAM-homologe Domäne), führte zu der Annahme, dass CAMs direkt mit dem FGF-Rezeptor interagieren können (Williams et al., 1994). Für NCAM konnte diese direkte Interaktion zwischen der Fibronectin-Domäne des Moleküls mit der zweiten und dritten Ig-Domäne des FGF-Rezeptors nachgewiesen werden (Kiselyov et al., 2003). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass nicht nur NCAM, sondern auch L1 Neuritenwachstum über die Aktivierung des FGF-Rezeptor-PLC γ -Signalwegs stimulieren kann. So hemmen Inhibitoren des FGF-Rezeptors, der PLC γ und der DAG-Lipase das durch NCAM- und L1-vermittelte Neuritenwachstum in primären Neuronen (Doherty et al., 1991; Hall et al., 1996; Mohammadi et al., 1998; Williams et al., 1994).

Diese Ausführungen machen deutlich, dass es trotz der Unterschiede in den Signalkaskaden, die NCAM- und L1-vermitteltes Neuritenwachstum stimulieren, sehr starke Quervernetzungen gibt.

3 Aufgabenstellung

In der Arbeit von Bodrikov *et al.* (2005) konnte gezeigt werden, dass NCAM die Src-Kinase p59^{fyn} in *Lipid rafts* aktiviert und dadurch einen Signalweg auslöst, der unter anderem das Auswachsen von Neuronen bedingt. Santucci *et al.* (2005) konnten zeigen, dass das GPI-verankerte Prion Protein NCAM in *Lipid rafts* stabilisiert und dadurch die Aktivierung von p59^{fyn} innerhalb von *Lipid rafts* möglich wird.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Mechanismus der Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p60^{src} durch das Zelladhäsionsmoleküle L1 zu analysieren. Im Weiteren war zu untersuchen, inwieweit die Signalwege, welche durch NCAM oder L1 ausgelöst werden, unabhängig voneinander arbeiten, oder ob beide Signalwege gleichzeitig aktiviert werden müssen. Insbesondere sollte eine mögliche Quervernetzung zwischen den durch L1 und NCAM vermittelten Signalwegen im Hinblick auf Neuritenwachstum analysiert werden.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden folgende Arbeitsschritte geplant:

1. Analysierung der Aktivierung von p60^{src} durch L1.
2. Untersuchung der Spezifität der Aktivierung von p60^{src} und p59^{fyn} durch NCAM bzw. L1 und die Rolle von *Lipid rafts* in diesem Prozess.
3. Funktionsanalysen in Bezug auf das Neuritenwachstum.

4 Material

4.1 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) sowie deren Hersteller sind in Tabelle 1 aufgelistet. Spezielle Chemikalien und verwendete Lösungen werden am Anfang jeder Methodenbeschreibung aufgeführt. Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt.

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid 29:1, 30% w/v	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Desoxycholat (DOC)	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Th. Geyer Hamburg GmbH & Co. KG (Hamburg, Deutschland)
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Mallinckroth Baker (Griesheim, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kalziumchlorid (CaCl ₂ * H ₂ O)	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Magermilchpulver	Frema Reform (Lüneburg, Deutschland)
Magnesiumchlorid (Mg CaCl ₂ * H ₂ O)	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
B-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol	Mallinckrodt Baker (Griesheim, Deutschland)
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Natriumfluorid (NaF)	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Saccharose, 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Tris	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Tab. 1: Allgemeine Chemikalien

Häufig verwendete Materialien wurden von folgenden Firmen geliefert:

Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)

Calbiochem (La Jolla, USA)

Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)

Greiner (Solingen, Deutschland)

Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland)

SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

4.2 Detergenzien

Die verwendeten Detergenzien sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

Bezeichnung	Hersteller
Brij-96	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
NP40	Calbiochem (La Jolla, USA)
Triton X-100	Fluka (Neu-Ulm, Deutschland)
Tween 20	Merck Biosciences GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tab. 2: Verwendete Detergenzien

4.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

In Tabelle 3 sind die am häufigsten verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung aufgelistet.

Puffer	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer	1 mM CaCl_2 1 mM MgCl_2 1 mM NaHCO_3 5 mM Tris/HCl, pH 7,3 0,32 M Saccharose
NP-40 Lysispuffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 1% NP-40 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 1 mM NaF 2 mM Na_3VO_4 pH 7,5
1x PBS	10 mM Na_2HPO_4 2,5 mM NaH_2PO_4 150 mM NaCl 3 mM KCl pH 7,3

10x PCR-Puffer	200 mM Tris/HCl 500 mM KCl 15 mM MgCl pH 8,8
Probenpuffer für SDS-PAGE (5x Laemmli-Puffer)	0,312 M Tris/HCl, pH 6,8 5% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerol 0,0005% (w/v) Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercaptoethanol
RIPA Puffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 1 mM NaF 2 mM Na_3VO_4 10 mM KCl 1 % (w/v) Deoxycholat 1 % (w/v) SDS pH 7,5
10x SDS Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1% SDS pH 8,3
50x TAE	2 M Tris-Acetat 100 mM EDTA pH 8,0
1x Transferpuffer für SDS-Gele	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,01% (w/v) SDS 10% (v/v) Methanol
1x TBS	0,1 mM Tris/HCl, 1,5 mM NaCl pH 7,5

Tab. 3: Häufig verwendete Puffer und Lösungen, sowie deren Zusammensetzung

4.4 Antikörper

4.4.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Herkunft
c-src	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
c-src (GD11)	Maus, monoklonal	Upstate
F3	Kaninchen, polyklonal	Labor von Prof. M. Schachner, ZMNH
F3	Ziege, polyklonal	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)
fyn	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology
fyn	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology
IgG	Maus Kaninchen	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. (Suffolk, UK)
L1	Kaninchen, polyklonal	Helen Strelakova, produziert im Labor von Prof. M. Schachner, ZMNH
L1 555	Ratte, monoklonal	Prof. M. Schachner, ZMNH (Appel et al., 1995)
NCAM 1b2	Kaninchen, polyklonal	Labor von Prof. M. Schachner, ZMNH (Kadmon et al., 1990b)
NCAM H28	Ratte, monoklonal	Produziert in Hybridomazellen, Dr. C. Goridis, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 8542, Paris, Frankreich
Non-Phospho-Tyr src	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
Phospho-Tyr src	Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology
PI(4,5)P ₂	Maus, monoklonal	Dr. Kiyoko Fukami, University of Tokyo, Tokyo, Japan
PrP	Meerschwein, polyklonal	Labor von Prof. M. Schachner, ZMNH
RPTPalpha	Kaninchen, polyklonal	Dr. Catherine J. Pallen, University of British Columbia, Vancouver, Kanada, oder Dr. Jeroen den Hertog, Hubrecht Laboratory, Netherlands Institute for Developmental Biology, Uppsala, Niederlande
TAG-1	Ziege, polyklonal	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland)

α Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
------------------	------------------	--

Tab. 4: Verwendete Antikörper und ihre Eigenschaften

4.4.2 Sekundärantikörper

Die für die Immunoblot-Analyse (Kap. 5.3.3) verwendeten Sekundärantikörper wurden von Dianova (Hamburg) bzw. Jackson Immuno Research (Suffolk, UK) bezogen. Die eingesetzten Antikörper waren mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und wurden in der Immunoblot-Analyse in einer Verdünnung von 1: 40000 eingesetzt. Für Immunoblot-Analysen von Immunpräzipitationen wurden vorgereinigte Sekundärantikörper eingesetzt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren.

4.5 Plasmide

Die den Expressionskonstrukten (Kap. 4.6) zugrunde liegenden Plasmide und ihre Eigenschaften sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Plasmide	Charakteristika	Herkunft/Referenz
pcDNA3 (5400 bp)	CMV-Promotor; SP6-Promotor; BGH pA; SV40-Promotor; origin und polyA; Neomycin ORF; Ampicillin ORF; CoIE1 origin;	Invitrogen GmbH
pRc/CMV (8621 bp)	PRc/CMV-Promotor; origin und polyA; Neomycin ORF; Ampicillin ORF;	Invitrogen GmbH

Tab. 5: Verwendete Plasmide und ihre Charakterisierung

4.6 Expressionskonstrukte

Die in den Transfektionsexperimenten (Kap. 5.1.4) verwendeten Expressionskonstrukte und ihre Eigenschaften sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

Insert	Plasmid	Größe des Inserts	Herkunft
F3	PRc/CMV	3275 bp	Dr. Gianfranco Gennarini, University of Bari, Italien
L1	pcDNA3	3873 bp	Birthe Schnegelsberg, ZMNH
NCAM140	pcDNA3	2600 bp	Dr. P. Maness, University of South Carolina, USA
PrP	pcDNA3	762 bp	Dr. Sylvain Lehmann, Institut de Génétique Humaine du CNRS, Montpellier, Frankreich

Tab. 6: Verwendete Expressionskonstrukte und ihre Eigenschaften

4.7 Enzyme

Enzym	Charakterisierung	Herkunft
Proteinase K	PCR-Grad, rekombinant	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
Taq-Polymerase		produziert von Peggy Putthoff, ZMNH
Trypsin	für Zellkultur, aus Rinderpankreas	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)

Tab. 7: Verwendete Enzyme und ihre Eigenschaften

4.8 Inhibitoren und Toxine

Die in den Experimenten eingesetzten Inhibitoren und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Name	Endkonzentration	Herkunft
Choleratoxin, HRP-gekoppelt	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Complete EDTA free	eine Tablette / 50 ml	Roche Diagnostics GmbH
Natriumfluorid NaF	1 mM	Merck Biosciences GmbH
Natriumvanadat Na ₃ VO ₄	2 mM	Merck Biosciences GmbH
PhosphoStop	eine Tablette / 10 ml	Roche Diagnostics GmbH

Tab. 8: Inhibitoren und Toxine, sowie ihre Charakterisierung

4.9 Molekulargewicht-Standards

Die verwendeten Standards, ihre Spezifität und Herkunft ist der Tabelle 9 zu entnehmen.

Bezeichnung	Spezifität	Herkunft / Referenz
100 bp DNA Standard	zwölf Banden im Bereich von 100 bis 1517 bp	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Germany)
All Blue (Precision Plus Protein™ Standards)	zehn Banden im Bereich von 10 bis 250 kDa	Bio-Rad Laboratories GmbH
Dual Color (Precision Plus Protein™ Standards)	zehn Banden im Bereich von 10 bis 250 kDa (25 kDa und 75 kDa rot markiert)	Bio-Rad Laboratories GmbH

Tab. 9: Verwendete Standards und ihre Spezifität sowie Herkunft

4.10 Oligonukleotide (Primer)

Primer für die Genotypisierung von F3-Mäusen	1.1 Bezeichnung
5'-AGT GTC TGA GGA GGA CAA AGG ATT TGG-3'	ConFOR
5'-GTG GGT GGA GAG CAT TAC TTG TAA ACT GG-3'	ConREV
5'-GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG TTC-3'	ConNeo
1.2 Primer für die Genotypisierung von NCAM-Mäusen	Bezeichnung
5'-CTG CCT CAG ATA GTG ACC CAG TGC-3'	NCAM up
5'-CGG AGA ACC TGC GTG CAA TCC ATC-3'	NCAM ko-dn
5'-TTG GAG GCA GGG AGC TGA CCA CAT-3'	NCAM wt-dn
1.3 Primer für die Genotypisierung von L1-Mäusen	1.4 Bezeichnung
5'-GGA ATT TGG AGT TCC AAA CAA GGT GAT C-3'	L1 arm 2
5'-TAC ATG CCA ATA CAA TGT AGG CTG C-3'	tTAup3
5'-AGA GGC CAC ACG TAC CGC AGC ATC-3'	L1-5'up2

Tab. 10: Primer für die Genotypisierung von verwendeten Mäusen

4.11 Zelllinien

Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über die verwendete Zelllinie und deren Eigenschaften.

Zelllinie	Herkunft	Referenz
CHO-K1 (<i>chinese hamster ovary</i>)	Dehydrofolatreduktase – defiziente Hamsterzelllinie	ATCC (American Type Culture Collection) CCL 61

Tab. 11: Verwendete Basiszelllinie und ihre Eigenschaften

4.12 Mauslinien

Mauslinie	Charakteristika	Herkunft / Referenz
C57BL/6J	Wildtyp, 3. Generation	Charles River WIGA GmbH (Sulzfeld, Deutschland)
F3 -/-	heterozygote Brutpaare	Barbara Ranscht, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, Kalifornien, USA (Berglund et al., 1999)
L1ki	L1/tTA knock-in, 129SvJ oder 129SvLM genetischer Hintergrund, hemizygoter Erbgang (L1-/y), Brutpaare mit heterozygoten Weibchen und Wildtyp-Männchen	Michael Kutsche und Melitta Schachner, ZMNH
NCAM -/-	C57BL/6J genetischer Hintergrund, homozygote Brutpaare	H. Cremer (Cremer et al., 1994)
PrP -/-	homozygote Brutpaare	(Santuccione et al., 2005)
RPTP α -/-	homozygote Brutpaare	Dr. den Hertog (Bodrikov et al., 2005)
TAG1 -/-	homozygote Brutpaare	Domna Karagogeos, Institute of Molecular Biology and University of Crete Medical School, Kreta, Griechenland (Fukamauchi et al., 2001)

Tab. 12: Verwendete Mauslinien, ihre Charakteristika und Herkunft

Für Experimente mit L1- und F3-defizienten Mäusen wurden als Kontrollen stets die Wildtyp-Geschwister aus den gleichen Würfen verwendet. Für alle anderen Experimente dienten Tiere der Mauslinie C57BL/6J als Wildtyp-Kontrollen. Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bzw. in der Tierhaltung des ZMNH.

4.13 Zentrifugen und Rotoren

1. Eppendorf 5804R Kühlzentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
2. Eppendorf 5810R, Rotor A-4-62 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
3. Sorvall Ultrazentrifuge, Rotor HB-6 (Kendro, Hanau, Deutschland)
4. Beckman XL-80 Ultrazentrifuge, Rotoren SW 40 Ti; SW 32 (Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland)

5 Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Allgemeine Bedingungen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂ – Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90%. Die für die Kultivierung der Zelllinien verwendeten Kulturflaschen und Kulturplatten wurden von der Firma Nunc (Wiesbaden) bezogen.

Für die Kultivierung und Langzeitlagerung der *chinese hamster ovary* (CHO) – Zelllinie wurde „Glasgow’s Minimal Essential Medium“ [GME-Medium (PAA Laboratories, Cölbe)] verwendet. Dem Basalmedium GMEM wurden die in Tabelle 13 zusammengefassten Zusätze hinzugefügt. Das Waschen der Zellen erfolgte mit Hank’s gepufferter Salz-Lösung (HBSS).

Zusatz	Konzentration	Herkunft
Fötales Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert)	5% (v/v)	PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland)
Penicillin (10,000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100x)	1x	PAA Laboratories
<i>non essential amino acids</i> (100x)	1x	PAA Laboratories
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM	PAA Laboratories
L-Glutamin (100x, 200 mM)	1 mM	Invitrogen GmbH
Glutamat / Aspartat (100x)	1x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Nucleoside (50x)	1x	PAA Laboratories

Tab. 13: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der CHO-Zelllinie

5.1.2 Passagieren der Zellen

Die Passage der CHO-Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ungefähr 90%. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Das Ablösen der adhären Zellen erfolgte bei Raumtemperatur durch die einminütige Inkubation der Zellen mit Trypsin (1:5000). Die abgelösten Zellen wurden in GMEM resuspendiert und im Verhältnis 1:10 in neue Kulturflaschen oder Kulturschalen überführt.

5.1.3 Langzeitlagerung

Für die Lagerung der CHO-Zellen über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen einer konfluenten Kulturflasche mit einer Größe von 75 cm² mit HBSS gewaschen, durch Trypsinierung vom Boden abgelöst und durch Zentrifugation bei 160 x g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in GMEM mit 10% (v/v) DMSO und 15% (v/v) FCS aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Einfriergefäß mit Isopropanol schrittweise auf -80°C abgekühlt und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte durch rasches Erwärmen auf 37°C und Überführung der Zellsuspension in Zellkulturflaschen mit vorgelegtem Medium. Nach Anheften der Zellen an den Boden der Kulturflasche wurden tote Zellen und verbliebenes DMSO durch Austauschen des Mediums entfernt.

5.1.4 Stabile Transfektion von CHO-Zellen

Serumfreies Kulturmedium:

GMEM	1x
<i>non essential amino acids</i> (100x)	1x
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM
L-Glutamin (100x, 200 mM)	1 mM
Glutamat / Aspartat (100x)	1x
Nucleoside (50x)	1x

Selektivmedium:

GMEM	1x
Fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)	5% (v/v)
<i>non essential amino acids</i> (100x)	1x
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM
L-Glutamin (100x, 200 mM)	1 mM
Glutamat / Aspartat (100x)	1x
Nucleoside (50x)	1x
Geneticin	1mg/ml

Für die stabile Transfektion wurden CHO-Zellen verwendet. Die Transfektion wurde mit Hilfe des Transfektionskits LIPOFECTAMINE PLUSTM Reagent (Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers (Shih et al., 1997) 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 (Plasmide mit Expressionskonstrukten) transfiziert, bei gleichzeitiger Transfektion mit mehreren Expressionskonstrukten wurden insgesamt 2 µg DNA verwendet. Es wurden 6 µl Plus Reagent und 4 µl Lipofectamin pro Well eingesetzt. Nach 3-stündiger Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz wurde die Transfektion durch Zugabe von serum- und antibiotikahaltigem Kulturmedium gestoppt.

Nach 2 Tagen Kultivierung wurden die Zellen gewaschen und so in 6-Well-Platten mit Selektivmedium gesplittet, dass eine Konfluenz von 20% erhalten wurde. Das Selektivmedium wurde im dreitägigen Abstand erneuert. Nach ca. 3 Wochen waren alle nicht stabil transfizierten CHO-Zellen aufgrund der fehlenden Resistenz gegenüber Geneticin abgestorben und einzelne Kolonien stabil transfizierter Zellen wurden sichtbar. Diese Kolonien wurden durch Picken mit einer Pipettenspitze in 12-Well-Platten vereinzelt und bei einer Konfluenz von 80% geerntet, lysiert und das Vorhandensein der transfizierten Proteine mittels Westernblot-Analyse geprüft. Positive Klone wurden eingefroren oder für weitere Experimente verwendet.

5.1.5 Lyse von CHO-Zellen

Die CHO-Zellen wurden dreimal mit HBSS und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit RIPA-Puffer bedeckt und bei 4°C für 1 Stunde unter gleichmäßigem Schwenken lysiert. Die lysierten Zellen wurden abgeschabt und bei 15000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für anschließende Experimente verwendet oder bei -20°C gelagert.

5.1.6 Kulturen von hippocampalen Neuronen (Primärzellkultur)

Die Experimente mit primären Zellkulturen von hippocampalen Neuronen wurden in Kooperation mit Dr. Leshchyns'ka und Dr. Sytnyk in der Arbeitsgruppe von Prof. Melitta Schachner durchgeführt.

Kulturmedium:

Neurobasal A Medium	Invitrogen GmbH
2% B-27	Invitrogen GmbH
Glutamin	Invitrogen GmbH
2 ng/ml Basic FGF	R&D Systems

Die Kulturen von hippocampalen Neuronen wurden von 0-3-Tage alten Mäusen durchgeführt. Die Neurone wurden für 24 Stunden in Kulturmedium (mit 10% Pferdeserum) auf Coverslips, welche mit poly-D-Lysin (100 µg/ml) beschichtet wurden, kultiviert.

5.1.7 Clustern von L1 an der Zelloberfläche von Neuronen

Lebende Neurone wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen L1, F3 oder PrP oder mit unspezifischen IgG (10 µg/ml) für 15 min kultiviert und die Antikörper anschließend mit Sekundärantikörpern für 5 min inkubiert, um ein Clustern der Proteine an der Zelloberfläche zu erreichen. Nach dem folgenden 5 minütigen Waschschrift wurden die Zellen fixiert und die gewünschten Antikörper detektiert (Kap. 5.1.9).

5.1.8 Neuritenwachstum

Für die Analyse des Neuritenwachstums von hippokampalen Neuronen wurden die Zellen für 20-24 h mit verschiedenen Antikörpern oder löslichen Fc-gekoppelten Proteinen inkubiert. Die jeweiligen Antikörper und löslichen Proteine werden im Ergebnisteil bei den einzelnen Versuchen aufgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Zugabe von 25% Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5 %) zum Kulturmedium fixiert.

Es wurden anschließend Bilder der Neurone bei RT am Axiophot 2 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit Hilfe einer AxioCam HRc Digitalkamera (Zeiss), der AxioVision Software (Version 3.1, Zeiss) und einem Plan-Neofluar 40x Objektiv (Blendennummer 0.75, Zeiss) erstellt.

Die Auswertung des Neuritenwachstums erfolgte mit Hilfe der Programme ImageJ (Public Domain) und Excel (Microsoft Corporation). Für die Auswertung des Neuritenwachstums wurden die Längen aller Neuriten pro Neuron von mindestens 100 Zellen gemessen.

5.1.9 Immunfluoreszenz

(Sytnyk et al., 2002)

Die Experimente mit Immunfluoreszenz-Färbungen an hippokampalen Neuronen wurden in Kooperation mit Dr. Leshchyns'ka und Dr. Sytnyk in der Arbeitsgruppe von Prof. Melitta Schachner durchgeführt.

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und alle Antikörper wurden in einer Lösung aus 1% (w/v) BSA in PBS verwendet. Hippokampale Neurone wurden für 15 min in 4% Formaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert. Diese Fixierung permeabilisiert die Membranen nicht. Daher konnten mit spezifischen primären Antikörpern Zelloberflächenproteine angefärbt werden, indem die fixierten Neurone zuerst mit 1% BSA in PBS für 20 min geblockt und anschließend mit den Antikörpern für 30 min inkubiert wurden. Es folgte eine Inkubation mit den korrespondierenden sekundären Antikörpern.

Wenn notwendig, wurden die Neurone ein zweites Mal für 5 min in 2% Formaldehyd in PBS fixiert, mit PBS gewaschen und mit 0,25% (v/v) Triton X-100 in PBS (pH 7,4) permeabilisiert. Es folgte eine Blockierung der Zellen mit 1% BSA in PBS für 20 min und eine Inkubation mit primären Antikörpern gegen intrazelluläre Proteine für 2 Stunden. Nach einer weiteren Inkubation von 45 min mit dem korrespondierenden Sekundärantikörper konnten die Zellen im Konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM510 (Zeiss), mit Hilfe der

LSM510 Software (Version 3, Zeiss), einem Öl-Plan-Neofluar 40x Objektiv (Apperturnummer 1.3, Zeiss) und einem 3x Digitalen Zoom analysiert werden. Zur Regulierung von Kontrast und Helligkeit wurde Corel Photo-Paint 9 (Corel Corporation) verwendet. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenz und die Verteilung entlang der Neuriten wurde mit der ImageJ Software durchgeführt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Genotypisierung von Mäusen

Zur Untersuchung des Genotyps von Mäusen, wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Durch die Verwendung von wildtyp- bzw. knockout/knockin-spezifischen Primern in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können charakteristische Bereiche amplifiziert werden, die mit Hilfe einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese und der Anfärbung mit Ethidiumbromid identifiziert werden können.

5.2.1.1 Verdau der Schwanzbiopsien

Proteinase-Puffer (BOSTON)	50 mM Tris/HCl
	50 mM KCl
	2,5 mM EDTA
	0,45% (v/v) NP-40
	0,45% (v/v) Tween 20
	0,1 mg/ml Proteinase K
	pH 8,0

Schwanzbiopsien wurden einen Tag nach der Geburt genommen, nachdem die Mäuse mittels einer speziellen Tätowiermaschine eindeutig markiert worden sind. Zur Isolierung der genomischen DNA aus den Schwanzbiopsien wurden diese mit jeweils 150 µl des Proteinase-Puffers über Nacht bei 56°C verdaut. Die Proben konnten danach direkt für die Genotypisierungs-PCR (Kap. 5.2.1.2) verwendet werden.

5.2.1.2 PCR zur Genotypisierung

(Saiki et al., 1988)

In Tabelle 14 ist die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes aufgelistet.

Lösungen	Eingesetzte Konzentrationen
10x PCR-Puffer, Gibco (Kap...)	1x PCR-Puffer
dNTPs	2.5 mM <i>each</i> = 10 mM
Primer	20 pmol/µl je Primer
DNS Matritze	~1 µg
Taq - Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 25 µl

Tab. 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Die Amplifizierung der DNA-Fragmente wurde in 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Dafür wurden die in Tabelle 14 aufgelisteten Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert und die DNA mit Hilfe der Taq-Polymerase (Life Technologies) vervielfältigt. Die Reaktionen wurden in Mj Research PTC-200 Thermocyclern durchgeführt. Die Programme für die jeweilige Genotypisierung sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Programmschritte	NCAM-Genotypisierung	L1-Genotypisierung	F3-Genotypisierung
1	95°C, 5:00 min	95°C, 5:00 min	95°C, 5:00 min
2	95°C, 0:45 min	95°C, 0:45 min	95°C, 0:45 min
3	65°C, 1:30 min	65°C, 1:30 min	65°C, 1:30 min
4	72°C, 1:30 min	72°C, 1:30 min	72°C, 1:30 min
5	29 Wiederholungen ab Schritt 2	30 Wiederholungen ab Schritt 2	29 Wiederholungen ab Schritt 2
6	72°C, 10:00 min	72°C, 10:00 min	72°C, 10:00 min
7	4°C, haltend	4°C, haltend	4°C, haltend

Tabelle 15: PCR-Programme zur Genotypisierung von Mäusen

In F3-knockout-Mäusen wurde das Exon 3 des F3-Genes durch eine Neomycinresistenz-Kassette ersetzt, was dazu führt, dass kein F3-Protein mehr produziert wird (Berglund et al., 1999). Das in der Agarose-Gelelektrophorese erwartete PCR-Produkt des Wildtypgens ist 166 bp lang, während die Länge des knockout-PCR-Produktes 369 bp beträgt.

In NCAM-knockout-Mäusen wurde das NCAM-Gen durch die Insertion einer Neomycinresistenz-Kassette in das Exon 3 zerstört (Cremer et al., 1994). Das im Agarosegel erwartete PCR-Produkt des Wildtypgens beträgt 300 bp, das knockout-PCR-Produkt ist 550 bp lang.

In L1-knockin-Mäusen wurde das L1-Gen durch die Insertion eines Tetracyclin-kontrollierten Transaktivators (tTA) (Gossen and Bujard, 1992) in das zweite Exon zerstört. Das Wildtyp-PCR-Produkt ist im Agarosegel 351 bp lang, während das knockin-PCR-Produkt eine Länge von 454 bp aufweist.

5.2.2 DNA Gelelektrophorese

Lösungen

1,5% (w/v) Agarose-Gel	1,5 g Agarose in 100 ml 1x TAE
Ethidiumbromid	10 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE
DNA-Probenpuffer (5x)	20% (w/v) Glycerol in 1x TAE

Durchführung

Die in der PCR erhaltenen Amplifikate wurden in einem Agarose-Gelsystem untersucht. Agarose-Gelsysteme sind die Standardmethoden für die Trennung von linearen DNA-Fragmenten, Plasmid-DNA und RNA.

Für die Elektrophorese wurden DNA Elektrophoresekammern der Firma Bio-Rad verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer solange erhitzt, bis sie sich vollständig gelöst hatte. Danach wurde sie auf ca. 60°C heruntergekühlt und in einer Gießvorrichtung in die dafür vorgesehenen Gelkammern gegossen. Nach vollständiger Polymerisation des Gels wurde dieses in der Elektrophoresekammer vollständig mit 1x TAE-Puffer überschichtet und die Proben, welche vorher in DNA-Probenpuffer aufgenommen wurden, in die dafür vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard diente der 100bp DNA Standard. Die Gelelektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt, bis die orangene Ladepufferfront am unteren Ende des Gels angekommen war. Es folgte eine Färbung des Gels in Ethidiumbromid für 15 min, welches sich in die DNA einlagert und unter UV Licht sichtbar gemacht werden kann. Die Dokumentation der Banden erfolgte mit Hilfe eines E.A.S.Y. UV-Licht Dokumentationssystems (Herolab, Wiesloh).

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration (BCA-Test)

(Smith et al., 1985)

Lösungen

BCA-Reagenz A	1% (w/v) Bicincholinsäure di-Natriumsalz 1,7% (w/v) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ 0,16% (w/v) Natriumtartrat 0,4% (w/v) NaOH 0,95% (w/v) NaHCO_3 , pH 11,25
BCA-Reagenz B	4% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

Durchführung

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Proben wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Reagent Kits der Firma Pierce (Bonn) in Mikrotiterplatten der Firma Nunc GmbH (Wiesbaden) durchgeführt. Die Proben wurden im Vergleich zu einer Standardreihe, bestehend aus 0, 100, 200, 500, 800, 1000 und 2000 $\mu\text{g/ml}$ BSA gemessen. Zur Herstellung der BCA-Lösung wurden Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis von 50:1 gemischt. 10 μl Probe wurden mit 200 μl BCA-Lösung vermischt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 210 μl pro Ansatz ergab. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C erfolgte die Messung der Extinktion bei 562 nm (ELISA-Reader, μQuant , Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der linearen Regression im Vergleich mit der Standardreihe bestimmt.

5.3.2 Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

(Laemmli, 1970)

Lösungen

Acrylamid-Bisacrylamid 29:1	30% (w/v) in ddH ₂ O
APS	10% (w/v) in ddH ₂ O
1x SDS-Laufpuffer	10x SDS-Laufpuffer 1:10 in ddH ₂ O verdünnt
Probenpuffer für SDS-PAGE	
SDS	10% (w/v) in ddH ₂ O
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	

Durchführung

Sollten einzelne Proteine in einem Proteingemisch nachgewiesen werden, wurden die Proben eindimensional in reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen, unter Verwendung des Mini-Protean II Elektrophoresesystems (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers elektrophoretisch aufgetrennt. Dafür wurden Gele von 1 mm Dicke mit zehn oder fünfzehn Taschen hergestellt. Die Laufstrecke betrug 0,8 cm im Sammelgel und 4,5 cm im Trenngel. Die Konzentration des im Gel enthaltenen Acrylamids verhält sich antiproportional zu dem Größenoptimum der aufzutrennenden Proteine. Daher wurden je nach Größe des zu untersuchenden Proteins 8%-ige, 10%-ige, 12%-ige bzw. 16%-ige Gele verwendet. Die genaue Zusammensetzung dieser Gele ist in der Tabelle 16 zusammengefaßt.

Lösungen	1.5 Trenngel	1.6 Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	8%, 10%, 12% oder 16%	5%
Tris/HCl (1 M)	375 mM, pH 8,8	125 mM, pH 6,8
SDS (10%)	0,1% (v/v)	0,1% (v/v)
APS (10%)	0,025% (v/v)	0,06% (v/v)
TEMED	0,001 % (v/v)	0,025% (v/v)

Tab. 16: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngellösungen, 1 SDS-PAA-Gel, 1 mm

Nach dem vollständigen Polymerisieren des Gels wurde die Elektrophoresekammer gemäß des Protokolls zusammengebaut, die Taschen gewaschen und mit den Proben beladen.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 6 min erhitzt und kurz zentrifugiert. Als Größenvergleich diente ein zusätzlich aufgetragener Proteinmarker. Die Spannung der Elektrophorese für das Sammelgel betrug 60 V und wurde beim Übergang der Lauffront in das Trenngel auf 90 V erhöht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Kap. 5.3.3.1) und einer Immunreaktion unterzogen (Kap. 5.3.3.3).

5.3.3 Immunoblot-Analyse

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

5.3.3.1 Western Blot

Lösungen

1x Transferpuffer	10x TBS, 1:10 in ddH ₂ O verdünnt
PBST	PBS
	0,05% (v/v) TWEEN 20
Blockierlösung	5% (w/v) Magermilchpulver oder BSA in PBS

Durchführung

Bei der Western Blot-Analyse wurden die im SDS-PAA-Gelsystem aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran Nitrocellulose-Membran, Schleicher & Schuell, Daßel) transferiert. Dafür wurde eine MINI TRANSBLOT-Apparatur von BioRad (München) verwendet und das Transfer-Sandwich nach Herstellerangaben zusammengebaut. Der Transfer wurde bei 35 V über Nacht bei 4°C in Transferpuffer durchgeführt. Der in der SDS-PAGE verwendete Proteinmarker diente dabei als Kontrolle für einen erfolgreichen Transfer. Nach dem Transfer wurde die Membran 2 min in PBST gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine Stunde bei RT mit 5% Blockierlösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Immunreaktion (Kap. 5.3.3.3).

5.3.3.2 Dot Blot

Der Dot Blot ist eine schnelle Methode, um das Vorhandensein bestimmter Proteine oder Lipide in einer Probe nachzuweisen, ohne diese Probe vorher elektrophoretisch aufzutrennen. Dazu wurden jeweils 3 µl der zu untersuchenden Proben punktförmig auf eine Membran nebeneinander aufgetragen. Nach vollständiger Trocknung der Proben wurde die Membran mit 5% Blockierlösung behandelt und einer Immunreaktion (Kap. 5.3.3.3) unterzogen. Im Falle eines Nachweises des Gangliosides GM1 schloss sich eine Inkubation mit dem Toxin Cholera toxin in 5% Blockierlösung an, welches bereits mit HRP gekoppelt ist. Cholera toxin hat eine hohe Affinität, an GM1 zu binden (Reed et al., 1987). Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei RT. Nach fünfmaligem Waschen mit PBST konnte GM1 mittels einer ECL-Reaktion (Kap. 5.3.3.4) nachgewiesen werden.

5.3.3.3 Immunreaktion

(Ausubel et al., 1996)

Nach Absättigung der Membran mit 5% Blockierlösung wurde diese für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem in Blockierlösung verdünnten Erstantikörper inkubiert. Danach wurde nicht gebundener Antikörper durch drei 15 minütige Waschschrte mit PBST entfernt und die Membran für 1 h mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach weiteren drei 15 minütigen Waschschrten mit PBST konnte die Membran der Nachweisreaktion mittels ECL (Kap. 5.3.3.4) unterzogen werden.

Die verwendeten Antikörper und ihre Charakteristika sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

5.3.3.4 ECL-Reaktion

Die Nachweisreaktion erfolgte über die an den Zweitantikörper kovalent gebundene Meeretichperoxidase, die katalytisch chemilumineszente Substrate umsetzt.

Nach Beendigung der Waschschrte wurde die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischte Chemilumineszenzlösung [ECLTM Western Blotting detection reagents, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) bzw. Super Signal[®] West Dura Extended Duration Substrate, Pierce (Bonn)] auf die Membran gegeben und für ca. 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran in einer Klarsichthülle in eine Filmkassette gelegt. In

einem Dunkelraum wurde ein Röntgenfilm [Kodak[®] BioMax Light Film, Sigma-Aldrich (Deisenhofen)] aufgelegt, exponiert und entwickelt.

5.3.3.5 Densiometrische Bestimmung der Bandenintensität

Die Chemilumineszenz wurde mit den Softwares *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) oder TINA 2.09 (University of Manchester, UK) quantifiziert. Dafür wurde der entwickelte Film gescannt und die digitalisierten Bilder in das jeweilige Programm exportiert. Die quantifizierten Daten wurden mit Hilfe der Software Microsoft Excel analysiert.

5.3.3.6 Strippen der Nitrozellulosemembran

Stripping-Puffer 25 mM Glycin
 1% (w/v) SDS
 pH 2,2

Für die Detektion eines zusätzlichen Proteins auf der Membran mußte diese zuvor von den bereits gebundenen Antikörpern befreit werden. Dazu wurde die Membran zweimal für 10 min mit Stripping-Puffer inkubiert und danach zweimal mit PBST gewaschen. Dann folgte erneut eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen, bevor eine weitere Immunreaktion (Kap. 5.3.3.3) mit dem neuen Antikörper gegen ein bestimmtes Protein durchgeführt werden konnte.

5.3.4 Zellfraktionierung

5.3.4.1 Herstellung eines Gehirnhomogenates aus Gesamthirn

Für die Herstellung von Gehirnhomogenat wurde entweder frisch präpariertes oder eingefrorenes Gesamtgehirn von 0-3-Tage alten Mäusen verwendet. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Vergasung mit CO₂. Direkt im Anschluß wurden die Mäuse dekapitiert und die Schädeldecke geöffnet, um das Gesamtgehirn entfernen zu können. Danach wurde das Gehirn entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für spätere Versuche bei -80°C gelagert, oder es wurde sofort in 2 ml eiskalten Homogenisierungspuffer überführt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Mit Hilfe eines Glashomogenisators erfolgte die

Homogenisierung der Gehirne durch achtzehnmaliges Auf- und Abbewegen des Teflonpistills bis keine groben Gehirnteile mehr sichtbar waren. Dieses Gehirnhomogenat wurde für die Isolation von Membranfraktionen (Kap. 5.3.4.2), Immunoblot-Analysen (Kap. 5.3.3), Immunpräzipitationen (Kap. 5.3.10.2) oder als Positivkontrolle für die SDS-PAGE (Kap.5.3.2) verwendet.

5.3.4.2 Herstellung einer groben Membranfraktion

Zur Entfernung von Zellkernen und Zelltrümmern wurde das Homogenat für 15 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert und der so entstandene Überstand einer weiteren Zentrifugation bei 17000 x g für 15 min unterzogen (Sorvall Ultrazentrifuge, Rotor HB-6). Das entstandene Pellet wurde in TBS aufgenommen und als gesamte Membranfraktion für Immunoblot-Analysen oder zur *Lipid-Raft*-Isolierung verwendet. Allen Lösungen wurden Protease-Inhibitoren zugegeben.

5.3.4.3 Isolierung von Fraktionen angereichert mit *Lipid rafts*

Lösungen

80% (w/v) Saccharoselösung (A)	80% (w/v) Saccharose in 0,2 M Natriumcarbonat
30% (v/v) Saccharoselösung	hergestellt aus Saccharoselösung A in TBS
10% (v/v) Saccharoselösung	hergestellt aus Saccharoselösung A in TBS
0,5% (v/v) Brij-96	0,5% (v/v) Brij-96 in TBS
1% (v/v) Triton X-100	1% (v/v) Triton X-100 in TBS

***Lipid raft*-Isolierung aus Membranfraktionen von Mäusegehirnen**

(Leshchyn'ska et al., 2003)

Die Isolierung von Fraktionen angereichert mit *Lipid rafts* wurde nach Leshchyn'ska *et al.* (2003) modifiziert. 500µl der Membranfraktion von 0-3-Tage alten Mäusen wurden mit dem vierfachen Volumen des Detergenzes in TBS versetzt, dreimal durch eine Nadel gezogen und 20 min auf Eis inkubiert. Die Wahl der Detergenzien (1% Triton X-100 oder 0,5% Brij-96) richtete sich nach der Art der folgenden Versuche und wird im Ergebnisteil jeweils aufgeführt.

Nach Inkubation mit dem Detergenz wurde die Membranfraktion in einem Zentrifugenröhrchen mit gleichem Volumen einer 80% Saccharoselösung vermischt und mit 30%-iger, gefolgt von einer 10%-igen Saccharoselösung überschichtet und das Zentrifugenröhren mit TBS aufgefüllt. Dieser diskontinuierliche Gradient deckt dabei einen Dichtebereich ab, der sowohl über der Dichte der *Lipid rafts* als auch unter der Dichte liegt. Es folgte eine 17 stündige Ultrazentrifugation bei 230000 x g und 4°C. Während der Zentrifugation steigen die *Lipid rafts* im Saccharosegradienten auf, bis sie ihren Dichtebereich in der 10%igen Saccharoseschicht erreicht haben und als weiße schwebende Präzipitate sichtbar und isoliert werden können. Die Fraktion wurde in kaltem TBS aufgenommen und bei 100000 x g und 4°C pelletiert, um die Saccharose zu entfernen. Das entstandene *Lipid raft*-Pellet wurde in max. 200 µl TBS aufgenommen und für spätere Verwendung bei -20°C gelagert. Dem TBS wurden Proteaseinhibitoren zugegeben.

***Lipid raft*-Isolierung aus CHO-Zellen**

Für die Isolierung von *Lipid rafts* aus CHO Zellen wurden pro Isolierungsansatz CHO Zellen in Petrischalen kultiviert, um eine ausreichende Materialmenge zu erhalten. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten, wurden sie mit HBSS gewaschen und in 5 ml HBSS je Kulturschale mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 250 x g und RT sedimentiert und das HBSS abgenommen. Die anschließenden Arbeitsschritte glichen der oben beschriebenen *Lipid raft*-Isolierung aus Membranfraktionen mit dem Detergenz Triton X-100.

5.3.5 Proteinbindungs-Assays

5.3.5.1 Immunisolierung verschiedener Subtypen von *Lipid rafts*

Zur Isolierung verschiedener Subtypen von *Lipid rafts* wurde die aus der Membranfraktion gewonnene *Lipid raft*-Fraktion auf drei gleiche Ansätze aufgeteilt. Dies entsprach einer Gesamtproteinmenge zwischen 0,3 und 0,5 µg pro Ansatz. Pro Ansatz wurden 500 µl TBS zugegeben und jede Probe mit Protein A Agarosekügelchen (Santa Cruz Biotechnology) vorinkubiert um eine Reinigung von unspezifischen Bindungen zu erreichen. Anschließend wurden die jeweiligen Antikörper (NCAM- oder L1-spezifisch) oder IgG als Kontrolle dazugegeben und über Nacht rotierend bei 4°C inkubiert. Nachfolgend wurden 30 µl Protein

A Agarosekügelchen pro Ansatz dazugegeben und die Inkubation für weitere 4 Stunden fortgesetzt. Danach folgten 5 Waschschrte mit TBS bei 600 x g und 4°C. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Agarosekügelchen in 60 µl Laemmlipuffer aufgenommen, bei 98°C für 6 min erhitzt und mittels Immunoblot-Analyse (Kap. 5.3.3) untersucht.

5.3.5.2 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden mit Gehirnhomogenat durchgeführt. Das Homogenat mußte vor der Immunpräzipitation in 1 ml NP-40-Lyse- oder RIPA-Puffer 1 h bei 4°C inkubiert werden, um die Membranen zu lysieren und die Proteine für eine Präzipitation zugänglich zu machen. Das Lysat wurde bei 12000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Wahl des Lysepuffers richtete sich dabei nach der Stärke der Membranassoziation der zu untersuchenden Proteine. Dabei wurde Gesamtprotein mit einer Menge von 1 mg/ml pro Ansatz eingesetzt.

Das Lysat vom Homogenat wurde anschließend mit Protein A/G Agarosekügelchen (Santa Cruz Biotechnology) für 2 Stunden vorinkubiert, um mögliche unspezifische Bindungen zu reduzieren. Die Agarosekügelchen wurden bei 600 x g und 4°C sedimentiert und der Überstand mit den entsprechenden Antikörpern über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden 30 µl Agarosekügelchen zum Ansatz dazugegeben und für weitere 4 Stunden rotierend bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Agarosekügelchen sedimentiert, der Überstand verworfen und die Kügelchen viermal mit kaltem NP40-Lysepuffer gewaschen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit kaltem PBS, um das im Lysispuffer enthaltene Detergenz zu entfernen. Alle die Waschschrte betreffenden Zentrifugationen fanden bei 4°C und 600 x g statt. Nach dem letzten Sedimentationsschrte wurden die Agarosekügelchen in 60 µl Laemmlipuffer aufgenommen und unter permanentem Schütteln für 6 min bei 98°C erhitzt. Danach wurden die Proben einer Immunoblot-Analyse (Kap. 5.3.3) unterzogen oder bei -20°C gelagert.

5.3.6 Verpaarungs-Experimente mit NCAM- und L1-defizienten Mäusen

5.3.6.1 Haltungsbedingungen

Im Alter von 6-8 Wochen wurden vier weibliche L1-heterozygote Mäuse mit dem genetischen Background 129Svj und zwei männliche NCAM-knockout Mäuse mit dem

genetischen Hintergrund C57BL/6J von der Zuchtstation in die Tierhaltung des ZMNH überführt und bei einem 12:12 Licht:Dunkel-Zyklus und unter Standard-Haltungsbedingungen ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; 40-50 % Luftfeuchtigkeit, Nahrung und Wasser *ad libitum*) gehalten.

5.3.6.2 Zucht von Doppel-defizienten Mäusen

Um Mäuse zu züchten, die defizient in beiden Proteinen L1 und NCAM sind, mußte zuerst das NCAM-knockout-Gen in die L1ki-Linie gebracht werden. Dazu wurden je zwei weibliche L1-heterozygote (L1+/-) mit einer männlichen NCAM-knockout (NCAM-/-) Maus zusammengesetzt. Nachkommen aus dieser Verpaarung wurden für L1 und NCAM genotypisiert (Kap. 5.2.1).

Zwei weibliche Tiere der F₂-Generation mit dem Genotyp L1+/- NCAM+/- wurden mit einem Männchen mit dem Genotyp L1+/y NCAM-/- verpaart und deren Nachkommen ebenfalls genotypisiert. Insgesamt wurden 6 Würfe zur Auswertung herangezogen.

6 Ergebnisse

Die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1 sind wichtige Proteine während der Entwicklung des Zentralen Nervensystems. Sie spielen eine große Rolle für das Zellwachstum und die Migration von Nervenzellen, die Ausbildung des Wachstumskegels und Synaptische Plastizität.

Die Arbeit unterteilt sich in drei Abschnitte. Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit der näheren Charakterisierung der Aktivierung von p60^{src} durch L1. Im zweiten Teil wurden verschiedene Subtypen von *Lipid rafts* identifiziert, welche entweder L1 oder NCAM enthielten. Darauf folgten funktionelle Untersuchungen der durch L1 und NCAM aktivierten Signalwege und deren Quervernetzungen miteinander.

6.1 Die Abwesenheit von L1 resultiert in einer Reduktion der aktivierten Src-Kinase p60^{src}

Ein wichtiger Fortschritt im Verständnis von NCAM- und L1-vermittelten Signalmechanismen wurde durch Versuche, die zeigten, dass die Src-Kinase p59^{fyn}, nicht jedoch p60^{src} in NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum involviert ist (Beggs et al., 1997; Beggs et al., 1994), erhalten. Die Kinase p59^{fyn} ist palmitoyliert und dadurch in *Lipid rafts* angereichert. Dort assoziiert diese Src-Kinase mit der NCAM140 Isoform und kann dadurch FAK (*focal adhesion kinase*) aktivieren, wodurch wiederum der MAP-Kinase-Signalweg aktiviert und unter anderem Neuritenwachstum ausgelöst wird (Bodrikov et al., 2005; Niethammer et al., 2002).

Durch Untersuchungen mit dem Src-Kinase-Inhibitor Wortmannin konnten Loers *et al.* (2005) zeigen, dass Src-Kinasen ebenfalls eine Rolle in der L1-abhängigen Neuroprotektion spielen. Weiterhin ist in Neuronen von p60^{src}-defizienten Mäusen das L1-abhängige Neuritenwachstum blockiert, nicht jedoch in Neuronen von p59^{fyn}-defizienten Mäusen (Ignelzi et al., 1994; Schmid et al., 2000).

Somit wurde gezeigt, dass L1 durch Aktivierung der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p60^{src} und die darauffolgende Aktivierung des MAPK-Signalweges Neuritenwachstum auslösen kann. Über die genauen Mechanismen dieser Aktivierung ist jedoch bisher nichts bekannt. Um den Zusammenhang zwischen L1 und p60^{src} weiter zu untersuchen, wurde analysiert, ob das Fehlen von L1 in L1-defizienten (L1-/y) Mäusen Einfluss auf die Aktivierung von p60^{src} hat.

Der Aktivierungsstatus von p60^{src} kann durch phosphoryliertes Tyrosin 416 (Tyr416), bzw. nicht phosphoryliertes Tyrosin 527 (Tyr527) charakterisiert werden. Da die Antikörper gegen phosphoryliertes Tyr416 und dephosphoryliertes Tyr527 nicht p60^{src}-spezifisch sind, sondern auch die Phosphorylierungsstellen von p59^{fyn} erkennen können, wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit Hirnhomogenaten von 1-Tage alten Wildtyp (L1+/+)- und L1-defizienten Mäusen mit p60^{src}-spezifischen Antikörpern durchgeführt und anschließend die aktive Form von p60^{src} mittels phosphorylierungsspezifischen Antikörpern im Western Blot analysiert.

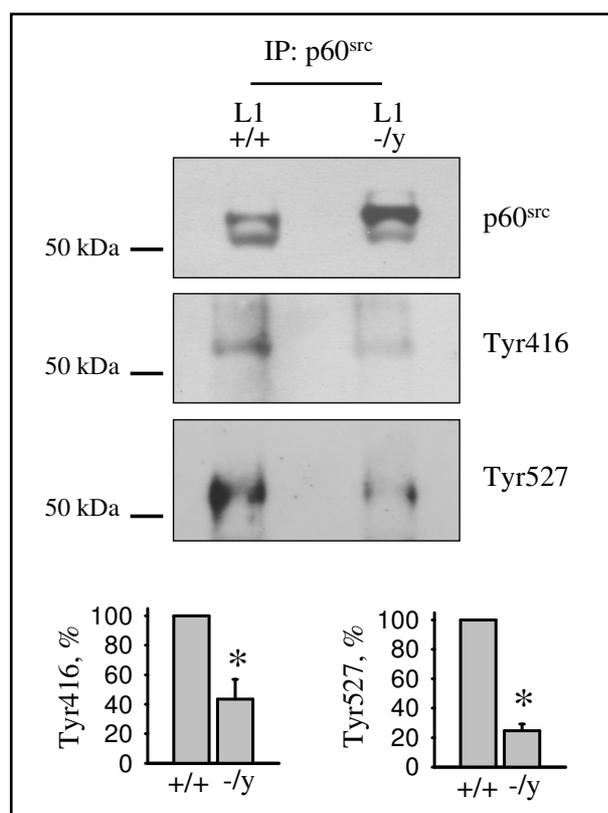


Abb. 7: Die aktive Form von p60^{src} ist in L1-defizienten Mäusen herunterreguliert. Immunpräzipitationen (IP) mit p60^{src}-spezifischen Antikörpern mit Gehirnhomogenaten von 1-Tage alten L1 +/+ und L1 -/y Mäusen wurden im Westernblot mit Antikörpern gegen das gesamte p60^{src} Protein, p60^{src} phosphoryliert am Tyr416 oder dephosphoryliert am Tyr527 untersucht. Die Grafen zeigen die Quantifizierung der Blots mit einer OD für L1+/+ bei 100%. Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) (n = 6) sind gezeigt. * p < 0,05 (gepaarter t-Test).

Das Signal in Hirnhomogenaten von L1-defizienten Mäusen, das durch Detektion von p60^{src} mit Antikörpern gegen p60^{src} phosphoryliert am Tyr416 erhalten wurde, war im Vergleich zu dem Signal in Wildtyp-Tieren um die Hälfte reduziert (Abb. 7). Das Signal von p60^{src} dephosphoryliert am Tyr527 war in L1-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen sogar mehr als die Hälfte reduziert (Abb. 7). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Aktivierung von p60^{src} in L1-defizienten Mäusen verringert ist und somit L1 bei der Aktivierung von p60^{src} unter basalen Bedingungen eine Rolle spielt.

6.2 L1 assoziiert mit p60^{src} via RPTP α

6.2.1 L1 assoziiert mit p60^{src}

Die Reduktion von aktiviertem p60^{src} in Gehirnhomogenaten L1-defizienter Mäuse deutet darauf hin, dass L1 in die Aktivierung von p60^{src} involviert ist. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein Clustern von L1 an der Zelloberfläche mit L1-spezifischen Antikörpern zur Verstärkung der p60^{src}-Aktivierung führt (Ignelzi et al., 1994).

Um eine mögliche Interaktion von L1 mit p60^{src} im Mausgehirn zu überprüfen, wurde p60^{src} aus Hirnhomogenaten von 0-3 Tage alten Wildtyp-Tieren präzipitiert (IP) und die Präzipitate wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines polyklonalen L1-Antikörpers auf das Vorhandensein von L1 untersucht. Ein Kontrollansatz mit unspezifischen Immunglobulinen (IgG) wurde parallel durchgeführt.

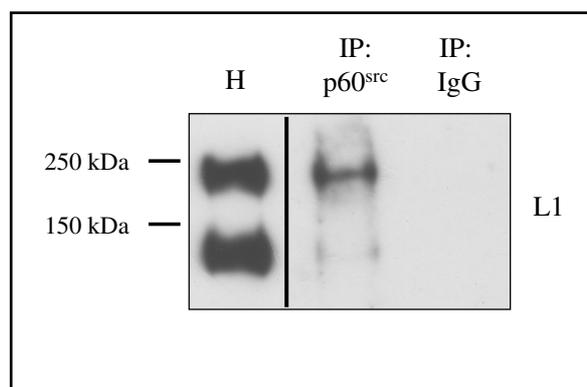


Abb. 8: L1 assoziiert mit p60^{src}. Immunpräzipitate (IP) aus Wildtyp-Hirnhomogenaten (H) mit p60^{src}-spezifischen monoklonalen Antikörpern wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines polyklonalen L1-Antikörpers untersucht. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit unspezifischen IgG. H: Input. Die Immunpräzipitation wurde in Kooperation mit Dr. Bodrikov im Institut von Prof. Schachner durchgeführt.

Im Präzipitat konnte L1 nachgewiesen werden (Abb. 8). L1 war jedoch nicht im Kontrollansatz zu detektieren, wodurch eine unspezifische Bindung der Proteine ausgeschlossen werden konnte (Abb. 8). Das Ergebnis der Immunpräzipitation läßt darauf schließen, dass die Proteine L1 und p60^{src} einen Komplex im Mausgehirn bilden.

Aufgrund der Koimmunpräzipitation von L1 mit p60^{src} sollte eine mögliche Kolokalisation beider Proteine in Kulturen von hippokampalen Neuronen mittels indirekter Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern überprüft werden.

1-Tage alte hippokampale Neurone in Kultur wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen L1 (Abb. 9; B, D, F, H) oder unspezifischen Immunglobulinen (IgG) (Abb. 9; A, C, E, G) stimuliert, indem die lebenden Zellkulturen mit den Antikörpern inkubiert wurden und anschließend durch die Inkubation mit sekundären Antikörpern ein Clustern an der Zelloberfläche ausgelöst wurde. Anschließend wurden die Neurone mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert.

In der Immunfluoreszenz überlappte die Verteilung von L1 in hippokampalen Neuronen entlang der Neuriten partiell mit der Verteilung von p60^{src} (Abb. 9; G). Ein Clustern von L1 an der Zelloberfläche von Neuronen, ausgelöst durch eine Inkubation der lebenden Neurone mit L1-spezifischen Antikörpern, verstärkte diese Kolokalisation von L1 und p60^{src} (Abb. 9; H). Dies ist ein Hinweis darauf, dass L1 und p60^{src} auch in intakten Zellen einen Proteinkomplex bilden. Im Gegensatz dazu zeigten L1 und p59^{lyn} nur eine geringe Überlappung in ihrer Verteilung entlang der Neuriten (Abb. 9; G). Diese Kolokalisation konnte auch nicht durch ein Clustern von L1 verstärkt werden (Abb. 9; H).

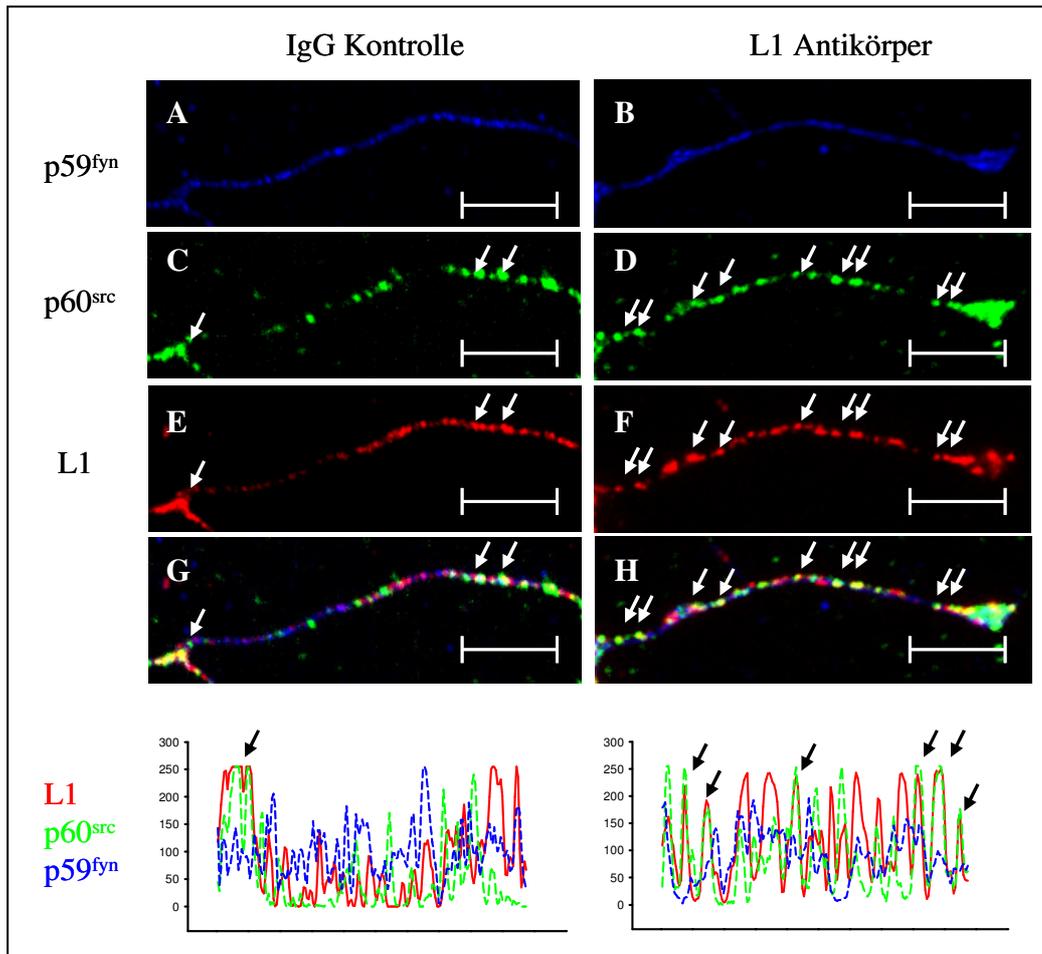


Abb. 9: Die Kolokalisation von L1 und p60src wird durch Clustern von L1 verstärkt. 1-Tage alte hippocampale Neurone von 0-3-Tage alten Mäusen wurden lebend mit polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen L1 (10 µg/ml; B, D, F, H) oder äquimolaren Mengen eines unspezifischen Immunoglobulins (IgG) (A, C, E, G) inkubiert. Nach der Cluster-induzierten Stimulation wurden die Neurone fixiert und mittels indirekter Immunfluoreszenz mit monoklonalen L1- (rot; E, F), p60^{src}- (grün; C, D) und p59^{fyn}-Antikörpern (blau; A, B) angefärbt. Repräsentative Neurone aus 4 unabhängigen Experimenten sind abgebildet. Die Skalierungsbalken haben jeweils eine Länge von 10 µm. Pfeile zeigen Gebiete mit deutlicher Kolokalisation. Die Grafen zeigen die Profile der Immunfluoreszenzintensität von L1, p60^{src} und p59^{fyn} entlang der Neuriten. Die Immunfluoreszenz-Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Leshyn'ska und Dr. Sytnyk im Institut von Prof. Schachner durchgeführt.

6.2.2 L1 assoziiert mit RPTP α

Die intrazelluläre Domäne von L1 besitzt keine bekannte Enzymaktivität oder Sequenzen, welche die Aktivierung von p60^{src} induzieren können.

Für NCAM und die Aktivierung von p59^{fyn} konnte RPTP α als Rezeptor-Tyrosinkinase identifiziert werden, die von NCAM in *Lipid rafts* rekrutiert wird und dort p59^{fyn} durch Dephosphorylierung von Tyr531 aktiviert (Bhandari et al., 1998; Bodrikov et al., 2005).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Tyrosinkinase-Inhibitor, das Erbstatin-Analog, nicht nur NCAM- sondern auch L1-vermitteltes Neuritenwachstum beeinflussen kann, jedoch keinen Einfluss auf das Integrin-vermittelte Neuritenwachstum hat (Williams et al., 1994).

Zheng *et al.* (1992) konnten zeigen, dass eine Überexpression von RPTP α in embryonalen Fibroblasten von Ratten p60^{src} aktiviert und diese Aktivierung in neoplastischer Transformation resultiert. Ähnliche Ergebnisse konnten durch Überexpression von RPTP α in den embryonalen Karzinomzellen P19 erzielt werden. Tyr527 von p60^{src} wurde dephosphoryliert, p60^{src} dadurch aktiviert und eine neuronale Differenzierung konnte beobachtet werden (Hertog et al., 1993). Ein weiterer Hinweis, dass RPTP α eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von p60^{src} spielt, zeigten Untersuchungen mit RPTP α -defizienten Mäusen. Bei diesen Mäusen kann eine verminderte Aktivität von p59^{fyn} und von p60^{src} beobachtet werden (Ponniah et al., 1999; Su et al., 1999). RPTP α kann somit als Aktivator von verschiedenen Src-Kinasen fungieren und könnte als Linkerprotein bei der Aktivierung von p60^{src} durch L1 eine Rolle spielen.

Um zu untersuchen, ob L1 mit RPTP α im Mausgehirn interagiert, wurde eine Immunpräzipitation mit RPTP α -spezifischen Antikörpern unter Verwendung von Hirnhomogenaten 0-3-Tage alter Wildtyp-Mäuse durchgeführt (Abb. 10). Die Immunpräzipitate wurden mittels Westernblot-Analyse auf Anwesenheit des Zelladhäsionsmoleküls L1 überprüft. Ein Kontrollansatz mit unspezifischen Immunglobulinen wurde parallel untersucht.

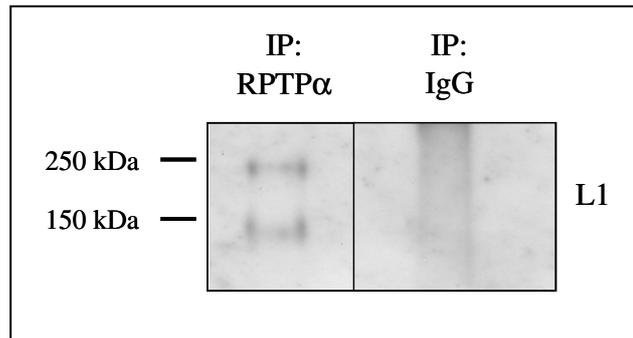


Abb. 10: RPTPα assoziiert mit L1. RPTPα-Immunpräzipitationen (IP) aus L1+/+ Hirnhomogenat wurden im Westernblot mit polyklonalen L1-Antikörpern analysiert. Ein Kontrollversuch mit unspezifischen IgG wurde parallel durchgeführt. Die Immunpräzipitation wurde in Kooperation mit Dr. Bodrikov im Institut von Prof. Schachner durchgeführt.

Aus Wildtyp-Hirnhomogenaten konnte L1 mit RPTPα koimmunpräzipitiert werden, was darauf hindeutet, dass beide Proteine einen Komplex formen (Abb. 10). L1 war nicht im Kontrollansatz zu detektieren, wodurch eine unspezifische Bindung im Immunpräzipitat ausgeschlossen werden konnte (Abb. 10).

6.2.3 RPTPα ist ein Linkerprotein zwischen L1 und p60^{src}

Um zu analysieren, ob RPTPα als Linker-Molekül zwischen L1 und p60^{src} fungiert, wurde die Interaktion beider Proteine in An- und Abwesenheit von RPTPα untersucht. Dazu wurden Immunpräzipitationen mit Wildtyp-Hirnhomogenaten und mit Hirnhomogenaten von RPTPα-defizienten Mäusen durchgeführt. p60^{src} wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper präzipitiert und die Proben mittels Westernblot-Analyse auf das Vorhandensein von L1 untersucht (Abb. 11).

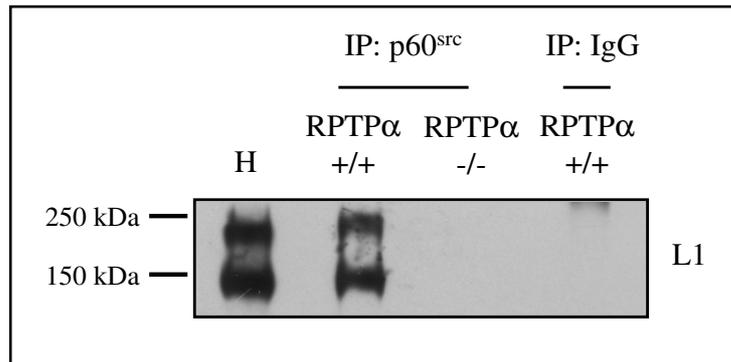


Abb. 11: RPTP α ist ein Linkerprotein zwischen L1 und p60^{src}. Immunpräzipitationen (IP) mit p60^{src}-spezifischen monoklonalen Antikörpern von RPTP α +/+ und RPTP α -/- Hirnhomogenat (H) wurden im Westernblot mit L1-spezifischen Antikörpern untersucht. Ein Kontrollansatz mit unspezifischen IgG wurde parallel durchgeführt. H: Input. Die Immunpräzipitation wurde in Kooperation mit Dr. Bodrikov am Institut von Prof. Schachner durchgeführt.

L1 konnte in p60^{src}-Immunpräzipitaten von Wildtyp-Hirnhomogenaten nachgewiesen werden, während in den Präzipitaten von Homogenaten RPTP α -defizienter Mäuse keine L1-spezifischen Banden sichtbar waren (Abb. 11). Daraus konnte der Schluss gezogen werden, dass RPTP α für die Komplexbildung zwischen L1 und p60^{src} wichtig ist und somit als Linkermolekül und Aktivator für p60^{src} in der durch L1 aktivierten Signalkaskade in Frage kommt.

6.3 NCAM und L1 bevorzugen unterschiedliche Membran-Mikrodomänen (*Lipid rafts*)

6.3.1 L1 kann in *Lipid rafts* detektiert werden

RPTP α kann also verschiedene Mitglieder der Src-Kinase-Familie, zu der auch p59^{fyn} und p60^{src} gehören, binden und aktivieren. L1- und NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum hängt jeweils von verschiedenen Src-Kinasen ab. NCAM löst Neuritenwachstum über die Aktivierung von p59^{fyn} aus, während L1 Neuritenwachstum durch die Aktivierung von p60^{src} induziert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Interaktionen zwischen den Src-Kinasen p60^{src} und p59^{fyn} und ihren Rezeptoren L1 und NCAM einer starken Spezifität unterliegen müssen, obwohl beide Moleküle wahrscheinlich RPTP α als Linkerprotein und Src-Kinase-Aktivator nutzen.

Die Moleküle der Familie der Src-Kinasen sind als wichtige Signaltransduktionsmoleküle in spezialisierten Membran-Mikrodomänen, den *Lipid rafts*, angereichert. Um Signalwege durch die jeweiligen Src-Kinasen zu aktivieren, müssen Moleküle zumindest zeitweise in diesen *Lipid rafts* lokalisiert sein.

Es konnte gezeigt werden, dass NCAM zur Aktivierung von p59^{fyn} temporär in *Lipid rafts* lokalisiert ist, während der Hauptanteil des Proteins außerhalb dieser Mikrodomänen zu finden ist (Niethammer et al., 2002). Auch L1 ist im Allgemeinen außerhalb von *Lipid rafts* lokalisiert, könnte aber zeitweise in *Lipid rafts* rekrutiert werden, um dort Signalwege zu aktivieren. Da auch RPTP α in *Lipid rafts* rekrutiert werden kann (Bodrikov et al., 2005), ist es naheliegend, dass die L1-vermittelte Aktivierung von p60^{src} in *Lipid rafts* stattfindet. Daher sollte untersucht werden, ob sich L1 in *Lipid rafts* mittels Westernblot-Analyse nachweisen lässt.

Die Isolierung von *Lipid rafts* wurde mit Hilfe einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dabei werden Zellstrukturen nach ihrer Dichte getrennt. Die Triton X-100 unlöslichen *Lipid rafts* wurden aus Membranfraktionen isoliert, welche aus Homogenaten von 1-3-Tage alten Wildtyp-Mäusen gewonnen wurden.

Die isolierten *Lipid rafts*, die zugrundeliegende Membranfraktion und das Ausgangsmaterial in Form des Homogenats wurden gelelektrophoretisch getrennt und das Vorhandensein von L1 in diesen Fraktionen mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 12).

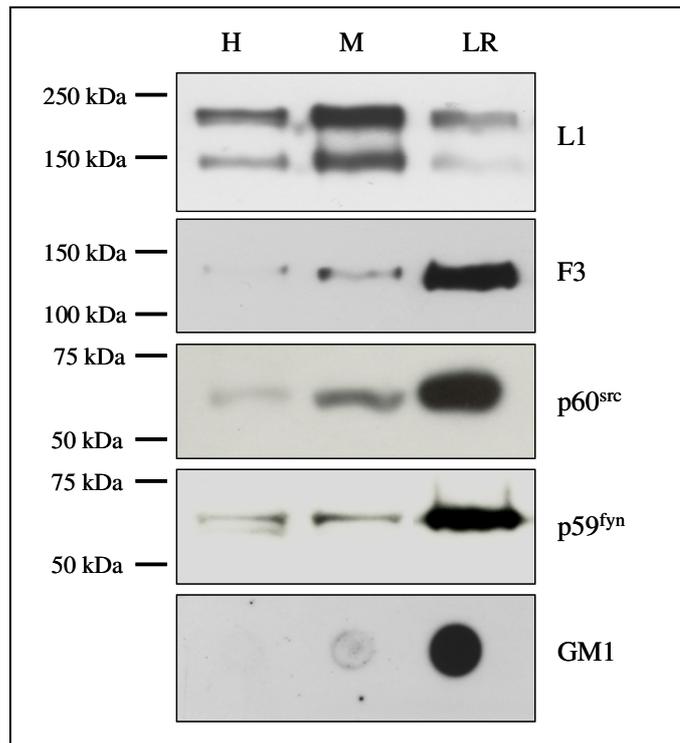


Abb. 12: L1 kann in *Lipid raft*-Fraktionen nachgewiesen werden. *Lipid rafts* (LR) wurden mittels 1% Triton X-100 und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und zusammen mit dem Homogenat (H) und der Membranfraktion (M) im SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot mit Antikörpern gegen L1, F3, p60^{src} und p59^{fyn} untersucht. Zur Überprüfung der Effizienz der *Lipid raft*-Isolierung diente ein Dot Blot mit Cholera-toxin zum Nachweis des *Lipid raft*-Markers GM1.

In den isolierten *Lipid raft*-Fraktionen konnte L1 detektiert werden, was vermuten lässt, dass L1, genauso wie NCAM, die Fähigkeit besitzt, sich in *Lipid rafts* aufzuhalten und dort Signalwege über die Aktivierung von p60^{src} anzuschalten (Abb. 12). Durch die sichtbare Anreicherung des Proteins in der Membranfraktion wird deutlich, dass sich ein Großteil von L1 außerhalb der *Lipid rafts* befindet. Diese Verteilung in der Plasmamembran konnte in früheren Untersuchungen auch für NCAM beobachtet werden (Niethammer et al., 2002). Zur Überprüfung der Effizienz der *Lipid raft*-Isolierung wurden zwei *Lipid raft*-Marker eingesetzt. F3 ist ein GPI-verankertes Molekül und dementsprechend in *Lipid rafts* angereichert. Die Westernblot-Analyse mit F3-spezifischen Antikörpern zeigte, dass in der *Lipid raft*-Fraktion eine Anreicherung dieses Proteins detektiert werden konnte, was eine effektive Isolierung von *Lipid rafts* nahelegt (Abb. 12). Auch das Gangliosid GM1, welches durch Cholera-toxin nachgewiesen werden kann (Reed et al., 1987), ist in der *Lipid raft*-Fraktion im Vergleich zur Membranfraktion am stärksten nachweisbar und zeigt, dass die Isolierung von *Lipid rafts* mit der verwendeten Methode erfolgreich war (Abb. 12).

Unterstützt wird diese Annahme durch eine sichtbare Anreicherung der Src-Kinasen p60^{src} und p59^{fyn} in der *Lipid raft*-Fraktion.

6.3.2 Isolierung von L1- und NCAM-positiven *Lipid rafts*

L1- und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum hängt von der Aktivierung zweier unterschiedlicher Src-Kinasen ab. NCAM aktiviert durch die Bindung an RPTP α die Kinase p59^{fyn}, während L1 durch Interaktion mit RPTP α die Kinase p60^{src} aktivieren kann. Diese Ergebnisse deuten auf eine starke Spezifität der Interaktion zwischen den Src-Kinasen und ihren Signalrezeptoren hin.

Neuere Untersuchungen legen nahe, dass in der Plasmamembran *Lipid rafts* mit unterschiedlicher Protein- und Lipidstruktur nebeneinander existieren (Pike, 2004).

Daher wurde folgende Hypothese aufgestellt: L1 und NCAM könnten in verschiedenen *Lipid rafts* in der Membran lokalisiert sein, um spezifisch entweder p60^{src} oder p59^{fyn} zu aktivieren. Um L1- und NCAM- enthaltende *Lipid rafts* zu isolieren, wurde eine Immunisolierung mit spezifischen Antikörpern gegen L1 und NCAM vom Gesamtpool der *Lipid rafts* durchgeführt. *Lipid rafts*, die mittels kaltem Triton X-100 isoliert wurden, formen Vesikel, bei denen der extrazelluläre Bereich der Membranen innerhalb der Vesikel lokalisiert ist und die innere Membranschicht die Vesikeloberfläche bildet. Diese Konformation wird als *inside-out* bezeichnet. Für die Immunisolierung sollten jedoch Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von L1 und NCAM verwendet werden. Daher wurden die *Lipid rafts* mit kaltem 0,5%igem Brij-96 isoliert, da dieses Detergenz Vesikel mit einer *right-side-out*-Orientierung formt und der extrazelluläre Bereich der Membran somit die Vesikeloberfläche bildet (Radeva and Sharom, 2004).

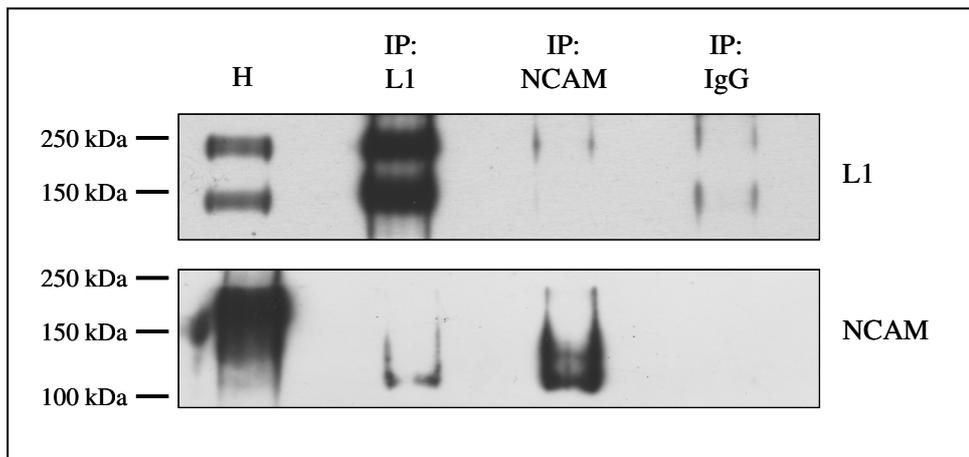


Abb. 13: Isolierung von L1- und NCAM-positiven *Lipid rafts*. L1 (IP:L1)- und NCAM (IP:NCAM)-positive *Lipid rafts* wurden vom Gesamtpool von *Lipid rafts*, welche mit kaltem 0,5% Brij-96 isoliert wurden, mittels Immunisolierung mit polyklonalen Antikörpern gegen L1 und NCAM separiert. Anschließend wurden die isolierten *Lipid rafts* mit L1- und NCAM-spezifischen monoklonalen Antikörpern im Westernblot untersucht. Der NCAM-spezifische Antikörper kann alle drei Hauptisoformen von NCAM detektieren. Eine Kontroll-Immunisolierung mit unspezifischen IgG (IP:IgG) wurde parallel durchgeführt. H: Hirnhomogenat.

Die Westernblot-Analyse der *Lipid rafts* zeigte, dass mit L1-spezifischen Antikörpern L1-positive *Lipid rafts* isoliert werden konnten, die kein NCAM140 enthielten. Es konnte jedoch eine geringe Menge an NCAM120 nachgewiesen werden (Abb. 13). NCAM120 wird hauptsächlich auf Gliazellen exprimiert. L1 ist in Neuron-Glia-Interaktionen involviert, um Zelladhäsion und Neuritenwachstum zu fördern (Bixby et al., 1988; Martini and Schachner, 1986; Seilheimer and Schachner, 1988). Möglicherweise waren die Isolationsbedingungen nicht stringent genug, um Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen vollständig zu zerstören. Mit NCAM-spezifischen Antikörpern konnten NCAM-positive *Lipid rafts* separiert werden, in denen kein L1 nachgewiesen werden konnte (Abb. 13).

Somit eignete sich diese Methode, verschiedene Subtypen, in dem Fall L1- und NCAM-positive *Lipid rafts* zu separieren. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, die Protein- und Lipid-Komposition beider *Lipid raft*-Proben zu untersuchen und miteinander zu vergleichen.

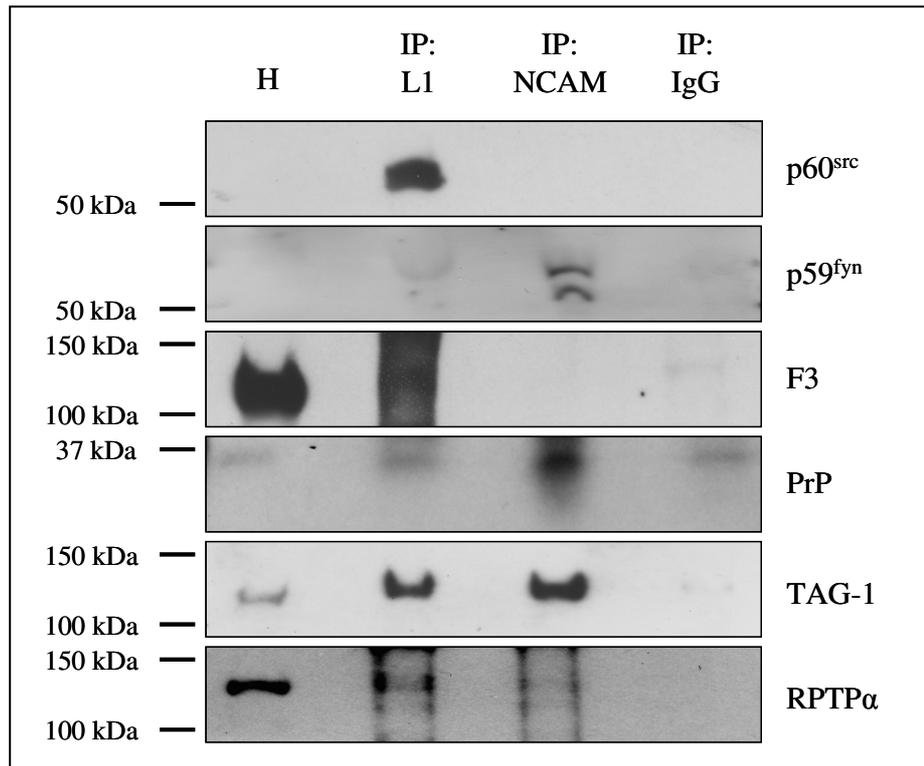


Abb. 14: Proteinzusammensetzung der L1- und NCAM-positiven *Lipid raft*-Subtypen. L1 (IP:L1)- und NCAM (IP:NCAM)-enthaltende *Lipid rafts* wurden vom Gesamtpool der *Lipid rafts*, welche mit kaltem 0,5% Brij-96 isoliert wurden, mittels Immunisolierung separiert. Dabei wurden die gleichen Proteinmengen pro Ansatz verwendet. Anschließend wurden die isolierten *Lipid rafts* mit p60^{src}-, p59^{fyn}-, F3-, TAG-1- und RPTP α -spezifischen Antikörpern im Westernblot untersucht. Eine Kontroll-Immunisolierung mit unspezifischen IgG (IP:IgG) wurde parallel durchgeführt. H: Hirnhomogenat.

Westernblot-Analysen mit verschiedenen Antikörpern zeigten, dass NCAM-positive *Lipid rafts* mit p59^{fyn} angereichert waren, jedoch kein p60^{src} enthielten (Abb. 14). Im Gegensatz dazu waren L1-enthaltende *Lipid rafts* positiv für p60^{src} und negativ für p59^{fyn} (Abb. 14). Im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen der Immunpräzipitationen (Abb. 10 und 11) und der Literatur (Bodrikov et al., 2005) konnte RPTP α in beiden *Lipid raft*-Subtypen identifiziert werden und hat somit die Möglichkeit, sowohl p60^{src} als auch p59^{fyn} in *Lipid rafts* zu aktivieren (Abb. 14).

Untersuchungen der Lipidkomposition unterschiedlicher *Lipid rafts* konnten zeigen, dass sich Subtypen von *Lipid rafts* nicht nur in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden, sondern auch eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung haben (Pike, 2004). L1- und NCAM-positive *Lipid rafts* sollten im Dot blot auf zwei Lipide hin untersucht werden, welche als *Lipid raft*-Marker anerkannt sind. GM1 ist ein Gangliosid und stark angereichert in *Lipid raft*-Fraktionen (Ferraretto et al., 1997; Yuan and Johnston, 2000). PIP₂ (Phosphoinositolphosphat) ist ebenfalls in *Lipid rafts* angereichert und stellt ein Signalmolekül dar, welches wesentlich an Signalkaskaden beteiligt ist (Testai et al., 2004; van Rheenen et al., 2005).

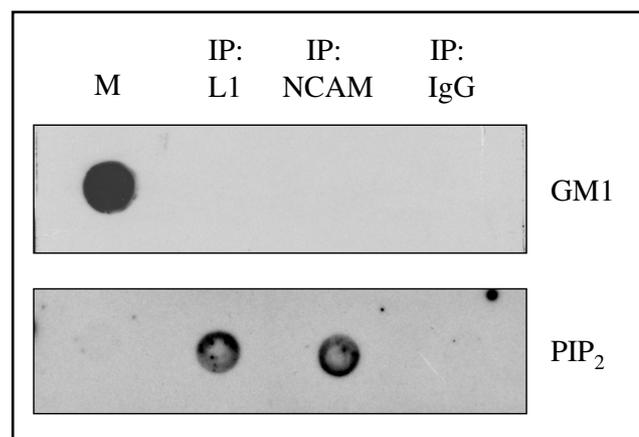


Abb. 15: Lipidzusammensetzung der L1- und NCAM-positiven *Lipid rafts*. L1 (IP:L1)- und NCAM (IP:NCAM)-enthaltende *Lipid rafts* wurden vom Gesamtpool von *Lipid rafts*, welche mit kaltem 0,5% Brij-96 isoliert wurden, mittels Immunisolierung separiert und 3 µl des jeweiligen Ansatzes auf eine Nitrozellulose-Membran punktförmig aufgetragen. Anschließend wurden die isolierten *Lipid rafts* mit einem PIP₂-spezifischen Antikörper oder mit Cholera-toxin-HRP für den Nachweis von GM1 untersucht. Eine Kontroll-Immunisolierung mit unspezifischen IgG (IP:IgG) wurde parallel durchgeführt. Für die IPs wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt. Ähnliche Resultate wurden in weiteren unabhängigen Versuchen erzielt. M: Membranfraktion.

Im Dot blot konnte gezeigt werden, dass PIP₂ sowohl in L1- positiven als auch NCAM-positiven *Lipid rafts* vorhanden ist (Abb. 15). Dabei konnten keine Unterschiede in der Signalstärke zwischen den beiden *Lipid raft*-Subtypen detektiert werden, was darauf schließen läßt, dass die Menge an PIP₂ in beiden *Lipid rafts* gleich ist. GM1 konnte mit Cholera-toxin im Dot blot nicht nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass dieses Gangliosid in L1- und NCAM-positiven *Lipid rafts* nicht vorhanden ist (Abb. 15).

6.3.3 Die GPI-verankerten Proteine F3 und PrP rekrutieren entweder L1 oder NCAM in p60^{src}- oder p59^{fyn}-angereicherte *Lipid rafts*

Ein wichtiger Mechanismus der Signaltransduktion von Zelladhäsionsmolekülen in *Lipid rafts* ist die Stabilisierung der Proteinkomplexe durch GPI-verankerte Proteine. So fördern sowohl *cis*- als auch *trans*- Interaktionen zwischen NCAM und PrP die Rekrutierung und Stabilisierung von NCAM in *Lipid rafts* und regulieren auf diese Art die Aktivierung der Src-Kinase p59^{fyn} (Santucci et al., 2005). Ist diese Interaktion in hippokampalen Neuronen zerstört, zum Beispiel in NCAM- oder PrP-defizienten Mäusen, wird das Neuritenwachstum stark beeinträchtigt.

Die GPI-verankerten neuronalen Zelladhäsionsmoleküle TAG-1 und F3 gehören wie L1 zur Ig-Superfamilie und Interaktionen beider Proteine mit L1 wurde beschrieben (Brummendorf et al., 1993; Kuhn et al., 1991). Daher wurden die isolierten L1- und NCAM-positiven Subtypen von *Lipid rafts* auf die Anwesenheit der GPI-verankerten Proteine PrP, F3 und TAG-1 im Westernblot untersucht. Wie erwartet war PrP als Interaktionspartner von NCAM, jedoch nicht von L1 in NCAM-positiven *Lipid rafts* stark angereichert (Abb. 14). Das Protein F3 dagegen konnte nur in L1-positiven *Lipid rafts* nachgewiesen werden (Abb. 14). Interessanterweise konnte die gleiche Menge an TAG-1 in beiden, L1- und NCAM-enthaltenden *Lipid rafts* detektiert werden (Abb. 14).

Somit könnten sowohl F3 als auch TAG-1 als mögliche Stabilisatoren für L1 in *Lipid rafts* fungieren. Da jedoch TAG-1 auch in NCAM-enthaltenden *Lipid rafts* detektiert werden konnte, scheint TAG-1 nicht für die Spezifität der Src-Kinase-Aktivierung durch L1 verantwortlich zu sein. Die folgenden Versuche konzentrierten sich daher auf F3 als Bindepartner und möglichen Stabilisator von L1 in *Lipid rafts*.

Um die biochemischen Daten der Immunisolierung zu unterstützen, wurden PrP und F3 an der Zelloberfläche von 1-Tage alten Kulturen hippokampaler Neurone mit spezifischen Antikörpern markiert (Abb 16). Diese Methode wird genutzt, um verschiedene Typen von *Lipid rafts* in intakten Zellen zu markieren (Harder et al., 1998).

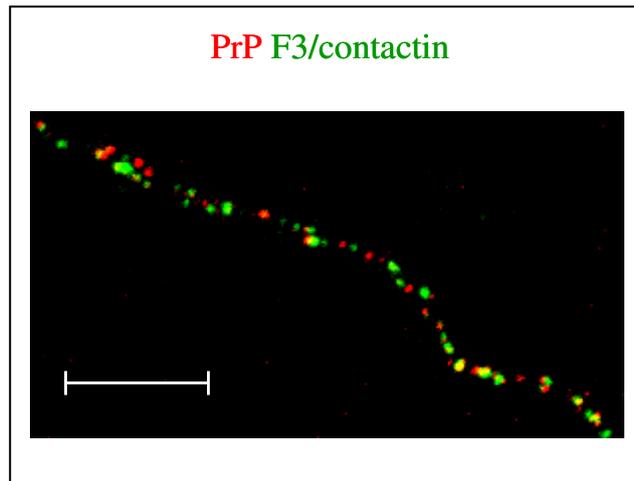


Abb. 16: PrP und F3 zeigen nur geringe Kolokalisation in der indirekten Immunfluoreszenz. 1-Tage alte Kulturen von hippocampalen Neuronen wurden mit Antikörpern gegen PrP (rot) und F3 (grün) angefärbt. Ein repräsentativer Neurit ist abgebildet. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 10 μm . Das Immunfluoreszenz-Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Leshyn's'ka und Dr. Sytnyk im Institut von Prof. Schachner durchgeführt und konnte in mehreren unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

Die Immunfluoreszenz zeigte, dass Antikörper-induzierte Cluster von PrP und F3 größtenteils getrennt voneinander in der Membran lokalisiert sind. Dieses Ergebnis bestärkt die Hypothese, dass F3 und PrP in verschiedenen *Lipid rafts* akkumulieren, F3 in L1/p60^{src}-positiven und PrP in NCAM/p59^{fyn}-positiven *Lipid rafts*.

Um die Rolle von F3 für die Stabilisierung von L1 in *Lipid rafts* zu analysieren, wurden CHO-Zellen mit L1 allein oder mit L1 und F3, bzw. L1 und PrP stabil kotransfiziert. Anschließend wurde der Gesamtpool an *Lipid rafts* aus den Zellmembranen isoliert und im Westernblot analysiert (Abb. 17). Eine Transfektion mit dem leeren Plasmid pcDNA3 diente als Kontrolle.

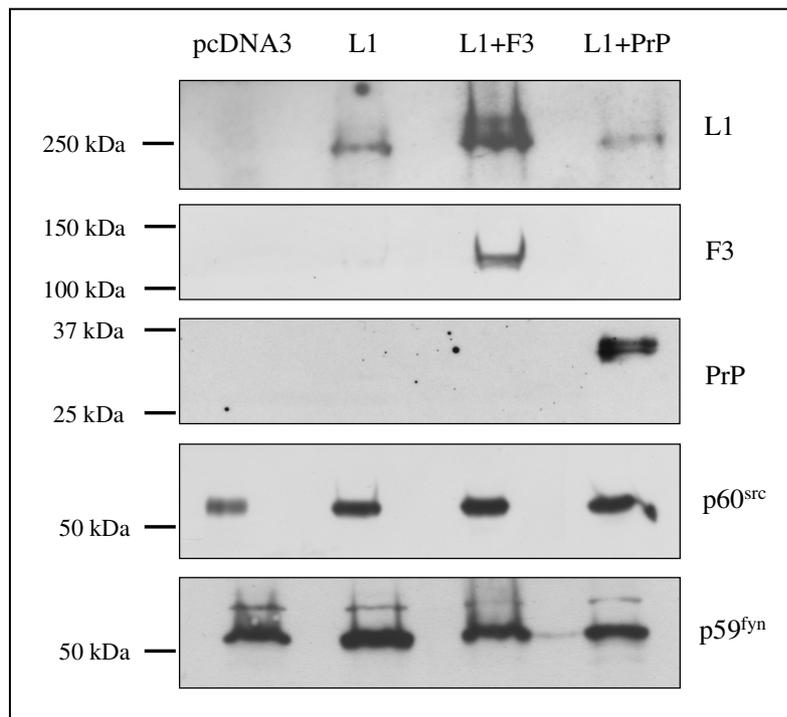


Abb. 17: Stabilisierung von L1 in *Lipid rafts* durch das GPI-verankerte Protein F3. CHO-Zellen wurden mit dem leeren Vektor pcDNA3, L1, L1 und F3 bzw. L1 und PrP transfiziert und der Gesamtpool von *Lipid rafts* mittels 1% kaltem Triton X-100 isoliert. In der anschließenden Westernblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern für die einzelnen Proteine wurde die Anwesenheit von L1, F3 und PrP untersucht. Die Immunoblot-Analysen mit p60^{src}- und p59^{fyn}-spezifischen Antikörpern dienten als Lade-Kontrolle. Die Ergebnisse konnten in weiteren unabhängigen Experimenten gezeigt werden.

Der Nachweis von L1 in *Lipid rafts* von CHO-Zellen mit spezifischen Antikörpern zeigte eine deutlich erhöhte Menge an L1 in *Lipid rafts*, wenn das Protein zusammen mit F3 kotransfiziert wurde, im Vergleich zu der Menge L1 in *Lipid rafts* von Zellen, die nur mit L1 transfiziert waren (Abb. 17). Im Gegensatz dazu bewirkte die Kotransfektion von L1 mit PrP keine Verstärkung der Rekrutierung von L1 in *Lipid rafts*, da keine Anreicherung der L1-Menge in *Lipid rafts* von L1/PrP-kotransfizierten Zellen im Vergleich zu nur mit L1 transfizierten Zellen detektiert werden konnte (Abb. 17). Western Blot-Analysen mit F3- und PrP-spezifischen Antikörpern zeigte, dass beide Proteine nur in den jeweils mit dem Protein transfizierten Zellen vorhanden waren und untransfizierte Zellen weder PrP noch F3 exprimieren.

Dieses Ergebnis berstärkt zusammen mit den Ergebnissen aus der Immunoisolierung von L1-positiven *Lipid rafts* die Vermutung, dass F3 ein Stabilisator für L1 in *Lipid rafts* ist und dadurch die L1-vermittelte Aktivierung von p60^{src} fördern kann.

6.4 Vernetzung der L1- und NCAM-vermittelten Signalwege

6.4.1 Durch L1 und NCAM wird Neuritenwachstum synergistisch gesteigert

Schon frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass L1 und NCAM als Signalmoleküle Informationen in die Zelle weiterleiten können (Doherty et al., 2000; Schuch et al., 1989). Eine Aktivierung dieser Rezeptoren an der Zelloberfläche durch homophile *trans*-Interaktion löst eine Signalantwort aus, die einen Kalzium-Einstrom in die Zelle und eine pH-Wert-Änderung einschließt und zu Neuritenwachstum führen kann.

Liganden-induziertes Clustern von L1 und NCAM an der Zelloberfläche von Neuronen resultiert ebenfalls in einer Steigerung des Neuritenwachstums (Bodrikov et al., 2005; Igelzi et al., 1994; Leshchyn'ska et al., 2003). Gereinigte extrazelluläre Fragmente von NCAM und L1, gekoppelt an eine Immunglobulin-Fc-Domäne sowie Antikörper gegen ihre extrazellulären Domänen werden somit standardmäßig in Neuritenwachstumsexperimenten eingesetzt, um die durch L1 oder NCAM ausgelösten Signalwege zu charakterisieren.

Da NCAM und L1 in unterschiedlichen nicht überlappenden *Lipid rafts* Neuritenwachstum durch die Aktivierung von Src-Kinasen auslösen, sollte untersucht werden, ob beide Moleküle das Neuritenwachstum synergistisch beeinflussen.

Kulturen von hippocampalen Neuronen wurden mit den extrazellulären Domänen von L1 und NCAM, gekoppelt an humanes Fc für 24 h inkubiert. Dabei wurden entweder L1-Fc und NCAM-Fc einzeln zu den Kulturen gegeben, oder es wurde mit beiden Fragmenten gemeinsam stimuliert.

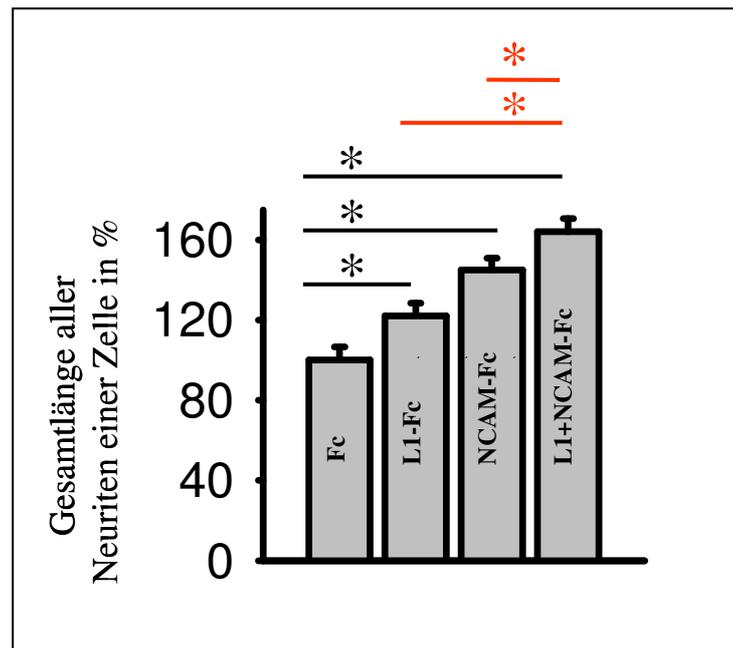


Abb. 18: Der Einfluss von L1-Fc und NCAM-Fc auf das Neuritenwachstum. Wildtypische hippocampale Neurone wurden auf poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert und mit Fc, L1-Fc, NCAM-Fc oder L1-Fc und NCAM-Fc zusammen für 24 h stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und die Summe aller Neuriten eines Neurons am Mikroskop gemessen. Der Graf zeigt die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 100 bis 150 gemessenen Neuronen pro Probe ($n > 150$). Mittelwerte \pm SEM sind gezeigt. Die mittlere Neuritenlänge von Fc-stimulierten Neuronen wurde als 100% angegeben. * $p < 0,01$ im t-Test. Neuritenwachstumsexperimente wurden in Kooperation mit Dr. Leshyns'ka und Dr. Sytnyk im Institut von Prof. Schachner durchgeführt.

In Übereinstimmung mit vorherigen Befunden waren die Neuritenlängen von Neuronen, kultiviert mit L1-Fc oder NCAM-Fc länger als die Neuritenlängen der mit Fc allein kultivierten Neurone (Abb. 18). Das bedeutet, dass sowohl L1-Fc als auch NCAM-Fc Neuritenwachstum induzieren kann. Neuritenlängen von Neuronen, welche mit L1-Fc und NCAM-Fc gemeinsam inkubiert wurden, waren sogar noch stärker verlängert im Vergleich zu der Inkubation mit den einzelnen Protein-Fragmenten (Abb. 18). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass L1 und NCAM zusammen Neuritenwachstum synergistisch verstärken.

6.4.2 L1 und NCAM können einander kompensieren

Da das Fehlen von L1 und NCAM jeweils die Aktivierung von p60^{src} bzw. p59^{fyn} beeinträchtigt, sollte untersucht werden, welchen Effekt das Fehlen dieser Proteine auf die Aktivierung der Src-Kinase des jeweiligen Gegenparts hat.

Es wurden Immunpräzipitationen von Hirnhomogenat 0-3-Tage alter L1 wt und L1-/-Mäuse mit p59^{fyn}-spezifischen Antikörpern (Abb. 19, A) bzw. von NCAM wt und NCAM-defizienten Mäusen mit p60^{src}-spezifischen Antikörpern (Abb. 19, B) durchgeführt und anschließend die aktiven Formen von p59^{fyn} und p60^{src} mittels Westernblot analysiert.

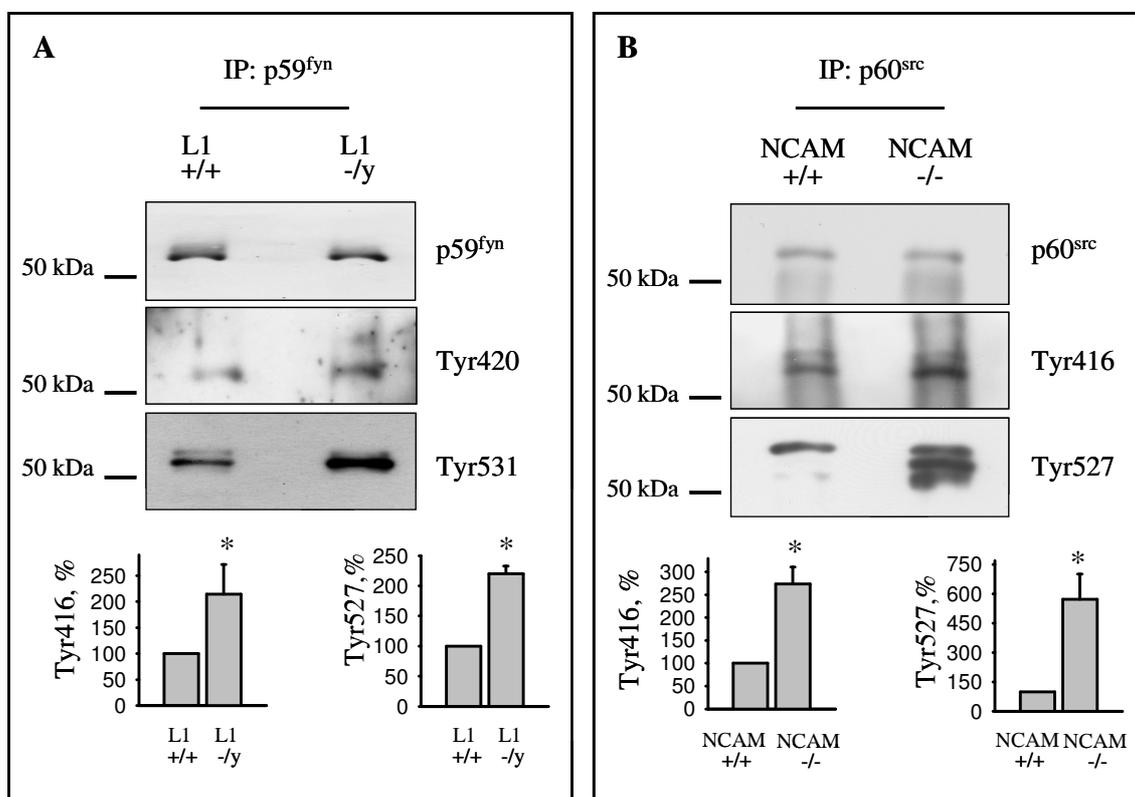


Abb. 19: Die durch L1 und NCAM vermittelte Aktivierung von p60^{src} und p59^{fyn} kompensiert für das jeweils andere Protein bei dessen Abwesenheit. Immunpräzipitationen (IP) mit p59^{fyn}-spezifischen Antikörpern von Hirnhomogenaten 0-3-Tage alter L1 +/+ und L1 -/- Mäuse wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen gesamtes p59^{fyn}, p59^{fyn} phosphoryliert am Tyr420 oder dephosphoryliert am Tyr531 untersucht. (A). Immunpräzipitationen (IP) mit p59^{src}-spezifischen Antikörpern von Hirnhomogenaten 0-3-Tag alter NCAM +/+ und NCAM -/- Mäuse wurden im Westernblot mit Antikörpern gegen gesamtes p60^{src}, p60^{src} phosphoryliert am Tyr416 oder dephosphoryliert am Tyr527 untersucht. (B). Die Grafen zeigen die Quantifizierung der Blots von vier unabhängigen Experimenten mit Bandenstärke von L1+/+ bzw NCAM+/+ bei 100% gesetzt. Mittelwerte ± SEM (n = 4) sind gezeigt. * p < 0,05 (gepaarter t-Test).

Westernblot-Analysen zeigten, dass in L1-defizienten Mäusen der Aktivierungsgrad von p59^{fyn}, sichtbar durch phosphoryliertes Tyr420 und dephosphoryliertes Tyr531 doppelt so hoch ist als in Wildtyp-Mäusen (Abb. 19, A). Dieses Ergebnis steht im beachtlichen Gegensatz zu der reduzierten Aktivierung von p60^{src} im gleichen Genotyp (Abb. 7).

Ein ähnlicher Effekt konnte für p60^{src} in NCAM-defizienten Mäusen beobachtet werden. Die aktive Form von p60^{src}, sichtbar durch phosphoryliertes Tyr416 und dephosphoryliertes Tyr527 war in Abwesenheit von NCAM stark heraufgesetzt im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 19, B). Auch dieses Ergebnis steht im starken Kontrast zum Aktivierungsgrad von p59^{fyn} in NCAM-defizienten Mäusen (Bodrikov et al., 2005).

Somit war die reduzierte Aktivierung von p60^{src} in L1-defizienten Mäusen von einer Verstärkung der p59^{fyn}-Aktivierung begleitet, während die reduzierte Aktivierung von p59^{fyn} in NCAM-defizienten Mäusen eine verstärkte Aktivierung von p60^{src} nach sich zog. Dies lässt vermuten, dass die L1/p60^{src}- und NCAM/p59^{fyn}- Signalwege einander kompensieren können, wenn einer der beiden Signalwege beeinträchtigt ist.

Um diese Hypothese zu bekräftigen, wurde der Einfluss von Antikörper-induziertem Clustern des Proteins L1 in lebenden NCAM+/+ und NCAM-/- hippocampaler Neuronen (Abb. 20, A) im Hinblick auf Neuritenwachstum untersucht. In lebenden L1+/+ und L1-/y hippocampalen Neuronen wurde eine Stimulation von NCAM durch NCAM-spezifische Antikörper ausgelöst (Abb. 20, B). Anschließend wurden die Neuritenlängen ausgewertet.

Sowohl die L1-spezifischen als auch die NCAM-spezifischen Antikörper können Neuritenwachstum in Wildtyp-Neuronen im Vergleich zur Stimulation mit unspezifischen IgG induzieren. Die Erhöhung des Neuritenwachstums als Antwort auf die Inkubation mit L1-Antikörpern war in NCAM-defizienten Neuronen circa dreimal höher im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 20, A). Nicht ganz so deutlich, aber dennoch sichtbar war die stärkere Antwort in Form von Neuritenwachstum bei L1-defizienten Neuronen im Vergleich zum Wildtyp nach Stimulation mit NCAM-Antikörpern (Abb. 20, B). Dieses Ergebnis zeigte jedoch keine Signifikanz im t-Test.

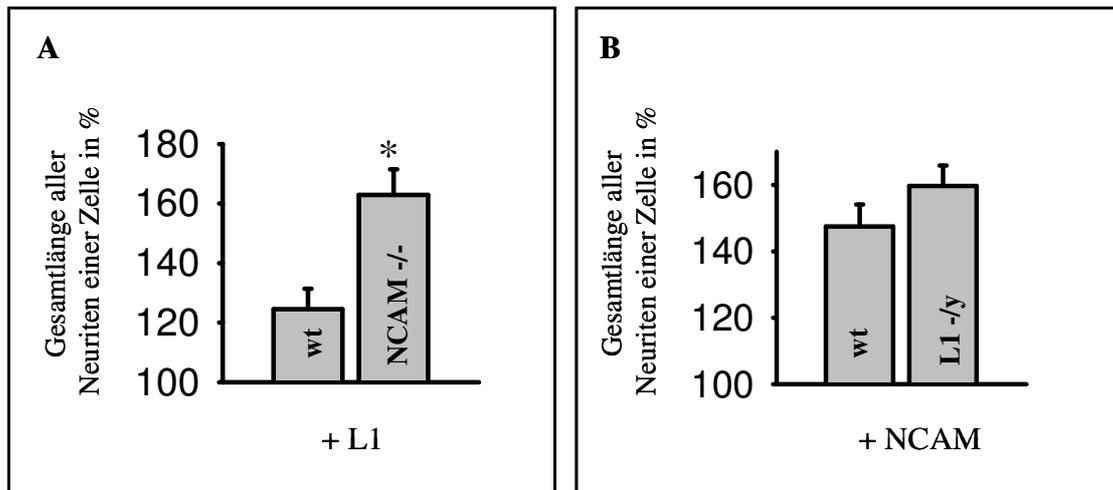


Abb. 20: Effekt von L1- und NCAM-spezifischen Antikörpern auf das Neuritenwachstum von Mäusen defizient im jeweils anderen Protein. Hippokampale Neurone von NCAM+/+ und NCAM-/- (A) oder L1+/+ und L1-/y Mäusen (B) wurden auf poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen kultiviert und mit polyklonalen Antikörpern gegen L1 (A) bzw. NCAM (B) für 24 Stunden stimuliert. Die Diagramme zeigen die Antwort auf die Antikörper in Form von Neuritenwachstum mit jeweils 100 bis 150 gemessenen Neuronen pro Probe in zwei unabhängigen Experimenten. Mittelwerte \pm SEM ($n > 150$) sind gezeigt. Die mittlere Neuritenlänge von IgG-stimulierten Neuronen wurde als 100% angegeben. * $p < 0,05$ im t-Test. Neuritenwachstums-Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Leshyn'ska und Dr. Sytnyk im Institut von Prof. Schachner durchgeführt.

Um diesen Effekt auf der Ebene der L1- und NCAM-Expression zu überprüfen, wurden die Mengen von L1 und NCAM in Homogenaten von 0-3-Tage alten Mausgehirnen in der Westernblot-Analyse untersucht.

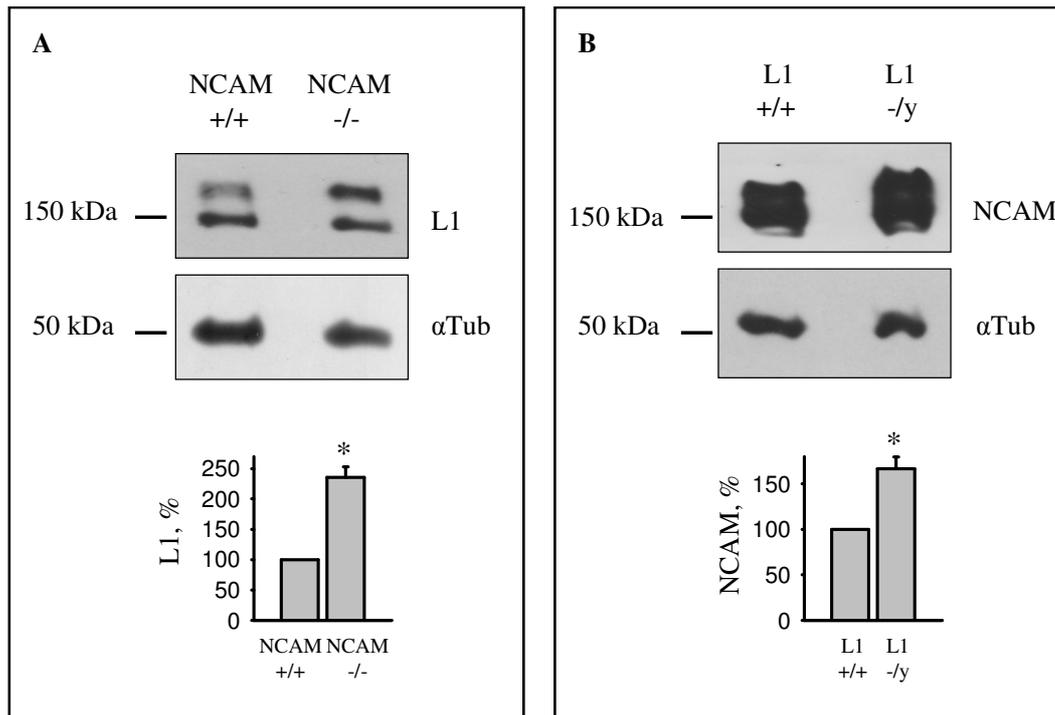


Abb. 21: Die Expression von L1 ist in Abwesenheit von NCAM und die Expression von NCAM ist in Abwesenheit von L1 erhöht. NCAM+/+ und NCAM-/- Hirnhomogenate (A) bzw. L1+/+ und L1-/y Hirnhomogenate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit L1-spezifischen (A), NCAM-spezifischen (B) und Tubulin (α Tub)-spezifischen (A, B) Antikörpern untersucht. Die Grafen zeigen die Quantifizierung der Bandenintensität (Mittelwerte \pm SEM, n = 3), wobei das Signal der Wildtyp-Proben als 100% gesetzt wurden. * $p < 0,05$ (gepaarter t-Test).

Interessanterweise war die Expression von L1 in NCAM-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen drastisch erhöht (Abb. 21, A), während die Expression von NCAM in L1-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nicht im gleichen Maße, jedoch ebenfalls stark erhöht war (Abb. 21, B). Die Tubulin-spezifischen Signale wurden als Ladekontrolle verwendet. Somit kann der Effekt der höheren Aktivierung von p60^{src} bzw. p59^{fyn} bei Abwesenheit von NCAM oder L1 auch darauf zurückzuführen sein, dass die Expression von L1 bei NCAM-defizienten Mäusen und die Expression von NCAM bei L1-defizienten Mäusen gesteigert ist.

6.4.3 L1- und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum in F3^{-/-}, PrP^{-/-} und TAG-1^{-/-} Neuronen ist verändert

Da die Lokalisierung von L1 und NCAM in *Lipid rafts* von verschiedenen GPI-verankerten Proteinen in unterschiedlichen Subtypen von *Lipid rafts* moduliert wird, sollte untersucht werden, ob die Abwesenheit von PrP, F3 oder TAG-1 einen Einfluss auf das L1- und NCAM-vermittelte Neuritenwachstum hat.

Kulturen hippokampaler Neurone von Wildtyp-Mäusen oder von Mäusen defizient in einem der Proteine PrP, F3 oder TAG-1 wurden für 24 h entweder mit L1-Antikörpern (Abb. 22, A) oder mit NCAM-Antikörpern (Abb. 22, B) oder als Kontrolle mit unspezifischen IgG inkubiert. Die Neuritenlänge der Neurone wurde anschließend analysiert und graphisch dargestellt (Abb. 22).

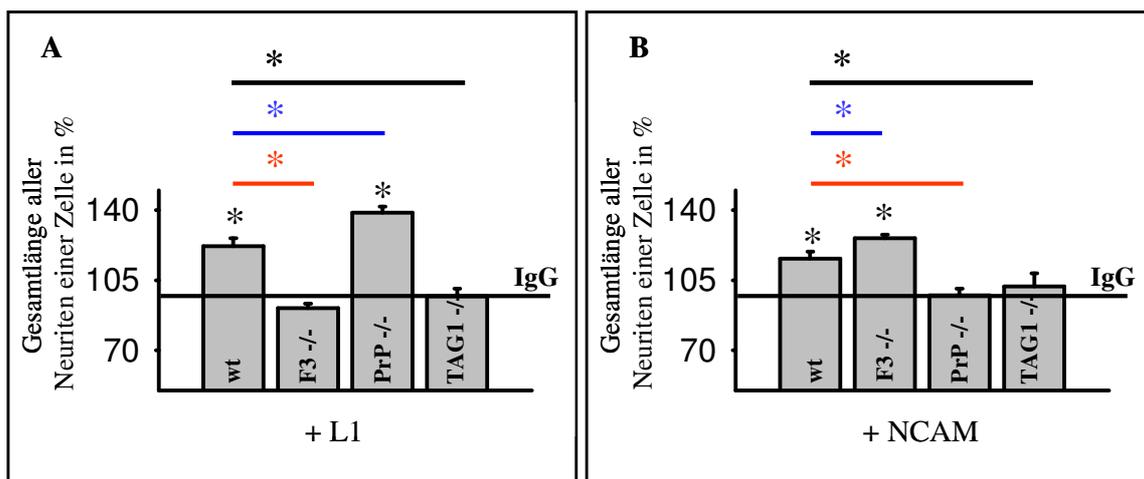


Abb. 22: Die Abwesenheit von PrP, F3 oder TAG-1 verändert L1- oder NCAM- vermitteltes Neuritenwachstum. Kulturen von Wildtyp, F3^{-/-}, PrP^{-/-} und TAG-1^{-/-} hippokampalen Neuronen wurden auf poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen für 24 h mit polyklonalen Antikörpern gegen L1 (A) oder NCAM (B) kultiviert. Die Diagramme zeigen die Antwort auf die Stimulation mit den Antikörpern als Mittelwerte der Neuritenlängen. Mittelwerte \pm SEM ($n > 150$) aus im Vergleich mit den Mittelwerten der Neuritenlängen von Neuronen des gleichen Genotyps, inkubiert mit unspezifischen IgG wurden als 100% gesetzt (schwarze Linie). * $p < 0,01$ (t-Test). Die Ergebnisse des Neuritenwachstums wurden in zwei unabhängigen Experimenten erhalten und in Kooperation mit Dr. Leshyns'kka und Dr. Sytnyk im Institut von Prof. Schachner durchgeführt.

In Einklang mit vorherigen Neuritenwachstumsexperimenten (Abb. 18 und 20) zeigten die hippokampalen Neurone im Vergleich zu IgG-stimulierten Neuronen eine Steigerung des Neuritenwachstums, wenn sie mit Antikörpern gegen L1 (Abb. 22; A) oder NCAM (Abb. 22; B) stimuliert wurden. Das durch Stimulation mit L1-Antikörpern ausgelöste Neuritenwachstum war vollständig blockiert in F3^{-/-} Neuronen (Abb. 22; A), nicht jedoch in PrP^{-/-} Neuronen. Im Gegensatz dazu war das Neuritenwachstum nach Stimulation mit NCAM-Antikörpern in PrP^{-/-} Neuronen vollständig blockiert, in F3^{-/-} Neuronen dagegen nicht (Abb. 22; B).

Interessanterweise ließ sich noch ein weiterer Effekt beobachten. Das Neuritenwachstum in PrP^{-/-} Neuronen war im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen nach L1-Stimulation verstärkt (Abb. 22; A). Die gleiche Auswirkung konnte nach Stimulation mit NCAM-Antikörpern in F3^{-/-} Neuronen beobachtet werden (Abb. 22; B). Auch hier konnte eine Steigerung des Neuritenwachstums im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den beobachteten Folgen nach L1- bzw. NCAM-Stimulation in NCAM- und L1-defizienten Neuronen (Abb. 20).

Im Fall der Stimulation mit L1- und NCAM-Antikörpern in TAG-1^{-/-} Neuronen ergab sich eine überraschende Beobachtung. Das erhöhte Neuritenwachstum als Antwort auf die Antikörperstimulation war für beide Proteine in TAG-1-defizienten Neuronen blockiert (Abb. 22; A und B).

Da TAG-1 sowohl in L1-positiven *Lipid rafts*, als auch in NCAM-positiven *Lipid rafts* detektiert werden konnte (Abb. 14), liegt zusammen mit den Ergebnissen der Neuritenwachstumsexperimente die Vermutung nahe, dass TAG-1 ein weiteres *Lipid raft*-Molekül ist, welches in L1- und NCAM-vermittelten Signalwegen eine Rolle spielt.

6.4.4 L1 und NCAM doppelt defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig

Sowohl L1-defiziente als auch NCAM-defiziente Mäuse haben ausgeprägte phänotypische Krankheitsmerkmale. Bei L1-defizienten Mäusen zeigt sich eine höhere pränatale Letalität der L1-defizienten Nachkommen, während die NCAM-defizienten Mäuse nach Mendel-Raten geboren werden (Cremer et al., 1994). Außerdem sterben L1- und NCAM-defiziente Mäuse nach der Geburt mit einer leicht höheren Rate als Wildtyp-Tiere. Trotzdem sind ein Großteil der L1- bzw. NCAM-defizienten Mäuse lebensfähig.

Vorangegangene Experimente haben gezeigt, dass L1 und NCAM einander kompensieren können, wenn eines der Proteine fehlt. Um zu überprüfen, ob diese Kompensation auch im

lebenden Organismus eine Rolle spielt, wurden Verpaarungsexperimente durchgeführt, um doppelt defiziente Mäuse zu charakterisieren. Dazu wurde zuerst eine L1+/- NCAM+/- - Mauslinie gezüchtet, deren Weibchen mit Männchen des Genotyps L1+/y NCAM-/- verpaart wurden. Die Nachkommen dieser Verpaarung wurden genotypisiert und statistisch ausgewertet (Tab. 17). Insgesamt wurden 32 Tiere aus 5 verschiedenen Würfen genotypisiert.

Mögliche Genotypen	Mendel'sche Verteilung	Anzahl der Mäuse in %
L1+/+ NCAM +/-	2	43,7
L1+/- NCAM+/- (Weibchen)	1	6,3
L1-/y NCAM+/- (Männchen)	1	0
L1+/- NCAM-/- (Weibchen)	1	9,4
L1-/y NCAM-/- (Männchen)	1	0
L1+/+ NCAM-/-	2	40,6

Tab. 17: Genotypen der Nachkommen von Verpaarungen mit Weibchen des Genotyps L1+/- NCAM+/- und Männchen des Genotyps L1+/y NCAM-/-.

Die Daten aus der Tabelle 17 zeigen, dass keine doppelt defizienten Mäuse gezüchtet werden konnten und die analysierten Genotypen nicht der erwarteten Mendel'schen Verteilung entsprachen, was darauf schließen läßt, dass eine hohe pränatale Letalität auftrat. Diese hohe embryonale Letalitätsrate konnte weder bei NCAM- noch bei L1-Mäusen beobachtet werden. Interessant ist auch die Entdeckung, dass keine Mäuse geboren wurden, die L1-defizient waren, aber für NCAM heterozygot. Somit konnten in diesem Verpaarungsversuch unabhängig vom NCAM-Genotyp keine L1-defizienten Mäuse gezüchtet werden.

7 Diskussion

7.1 L1 und NCAM führen Signaltransduktion in unterschiedlichen Subtypen von *Lipid rafts* durch

Lipid rafts sind Mikrodomänen in biologischen Membranen, welche mit Cholesterol (in tierischen Zellen), Sphingomyelin und Glykosphingolipiden, wie Cerebrosiden und Gangliosiden angereichert sind (Simons and Ikonen, 1997). Sie sind an Prozessen wie der Endozytose und Signaltransduktion beteiligt.

Die ersten Hinweise, dass *Lipid rafts* keine homogene Zusammensetzung der Lipide und Proteine besitzen, wurden durch Arbeiten von Schnitzer *et al.* (Schnitzer *et al.*, 1995) erhalten, in denen Caveolae vollständig von Triton X-100-resistenten *Lipid rafts* separiert werden konnten. Die Triton X-100-unlösliche Fraktion enthielt dabei den Gesamtpool an GPI-verankerten Proteinen der Zellmembran. In dieser Fraktion konnte kein Caveolin nachgewiesen werden, welches als Caveolae-Marker vollständig mit den Caveolae separiert werden konnte. Somit isolierten Schnitzer *et al.* (1995) zwei unterschiedliche Typen von *Lipid rafts* mit unterschiedlicher Protein- und Lipidkomposition.

Spätere Arbeiten, welche u.a. die Methoden der Immunsolierung verschiedener *Lipid rafts* mit unterschiedlichen Antikörpern (Madore *et al.*, 1999) oder die Isolierung von *Lipid rafts* mit verschiedenen Detergenzien (Schuck *et al.*, 2003) angewendet haben, machten deutlich, dass *Lipid rafts* heterogene Strukturen in der Membran darstellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Zelladhäsionsmolekül L1 mit Hilfe von RPTP α die Src-Kinase p60^{src} in *Lipid rafts* aktiviert (Abb. 8-11; Abb.14). Dieser Mechanismus ist der Aktivierung von p59^{lyn} durch den NCAM/RPTP α -Komplex sehr ähnlich (Bodrikov *et al.*, 2005). Die Spezifität der Aktivierung der verschiedenen Src-Kinasen könnte durch unterschiedliche Subtypen von *Lipid rafts* erklärt werden, welche für die Signalwege der Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM eine wichtige Rolle spielen (Abb. 13-14). Aufgrund der dargestellten Ergebnisse kann folgendes Modell vorgeschlagen werden (Abb. 23):

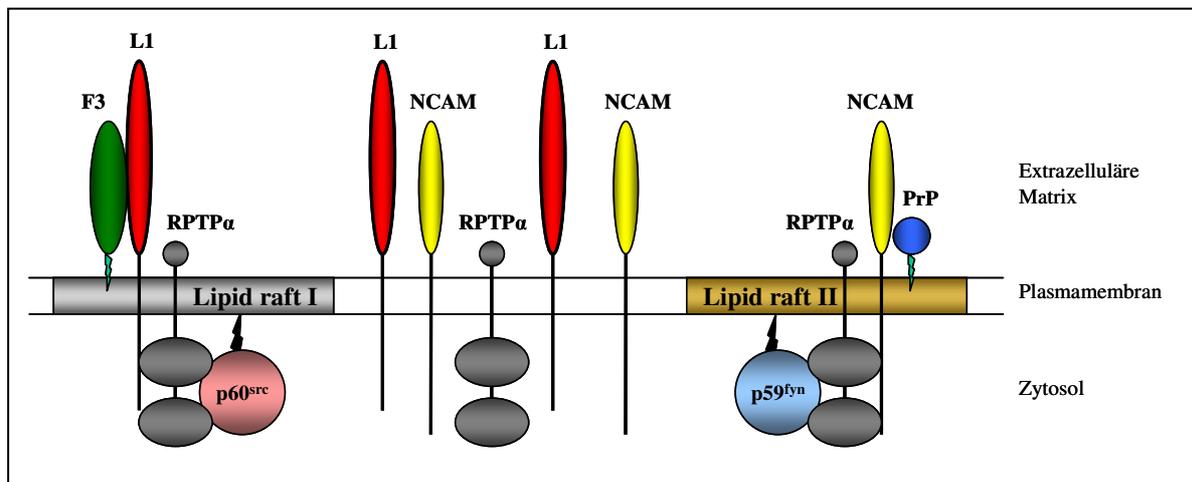


Abb. 23: Schematische Darstellung des Modells von L1- und NCAM-enthaltenden Signalkomplexen, welche in unterschiedlichen Subtypen von Lipid rafts lokalisiert sind. Die Mehrheit der Proteine L1, NCAM und RPTP α sind außerhalb von *Lipid rafts* in der Plasmamembran von Neuronen lokalisiert. Die Proteinkomplexe L1/RPTP α und NCAM/RPTP α können in verschiedene Subtypen von *Lipid rafts* rekrutiert werden (*Lipid raft I* und *Lipid raft II*), indem L1/RPTP α mit F3 interagiert, während NCAM/RPTP α an PrP bindet. Dabei sind F3-positive *Lipid rafts* angereichert mit p60^{src} (*Lipid raft I*) und PrP-positive *Lipid rafts* sind angereichert mit p59^{fyn} (*Lipid raft II*). Somit resultiert die Rekrutierung der L1/RPTP α - und NCAM/RPTP α -Komplexe in diese *Lipid rafts* in einer selektiven Aktivierung von p60^{src} und p59^{fyn}.

Die Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM sind zum großen Teil außerhalb von *Lipid rafts* in der Plasmamembran lokalisiert. Dort haben beide Proteine die Möglichkeit, an RPTP α zu binden. Während jedoch L1 zusammen mit RPTP α in *Lipid rafts* rekrutiert wird, in welchem das GPI-verankerte Protein F3 und die Src-Kinase p60^{src} angereichert sind (Abb. 13; Abb. 14) bevorzugt der NCAM/RPTP α -Komplex *Lipid rafts* mit einer Anreicherung von PrP und p59^{fyn} (Abb. 13; Abb. 14). In den *Lipid rafts* werden die Proteinkomplexe durch die jeweiligen GPI-verankerten Proteine stabilisiert (Abb. 17) und die Aktivierung der Src-Kinasen p60^{src} und p59^{fyn} wird möglich. Somit werden die L1- und NCAM-vermittelten Signalkaskaden, die im MAPK-Signalweg münden, in zwei unterschiedlichen *Lipid rafts* ausgelöst.

7.2 RPTP α fungiert als Linkermolekül zwischen L1 und p60^{src}

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass L1 im Mausgehirn Einfluss auf die Aktivierung der Src-kinase p60^{src} hat (Abb. 7). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Literatur, in welcher die Interaktion zwischen L1 und p60^{src} in Zellkulturen schon bestätigt werden konnte (Ignelzi et al., 1994). Da jedoch L1 in der intrazellulären Domäne keine bekannte Sequenz enthält, die als Src-Kinase-Aktivator bekannt ist, wurde nach einem Linkermolekül gesucht, welches durch Interaktion mit L1 die Kinase p60^{src} am Tyr527 dephosphorylieren und dadurch aktivieren kann.

In Koimmunpräzipitationen konnte RPTP α als mögliches Linkermolekül identifiziert werden (Abb. 10-11). Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass RPTP α nicht nur in der NCAM-vermittelten Aktivierung der Src-Kinase p59^{fyn} eine Rolle spielt (Bodrikov et al., 2005), sondern auch in der durch L1 ausgelösten Signalkaskade. Die Immunisolierungen von L1- und NCAM-positiven *Lipid rafts* verstärken diese Vermutung zusätzlich, da RPTP α in beiden Subtypen von *Lipid rafts* detektiert werden konnte (Abb. 14). Obwohl ungefähr 90% aller RPTP α -Moleküle außerhalb der *Lipid rafts* lokalisiert sind, zeigten frühere Untersuchungen, dass die Regulation der RPTP α -Funktionen auch mit der Lokalisierung in unterschiedlichen Membran-Mikrodomänen in Verbindung stehen (Bodrikov et al., 2005; Petrone and Sap, 2000). Somit ist es durchaus möglich, dass L1 das Protein RPTP α in *Lipid rafts* rekrutiert, und RPTP α die Src-Kinase p60^{src} aktivieren kann. Um die genauen Mechanismen dieser Interaktion und die Rekrutierung von RPTP α in *Lipid rafts* zu analysieren, müssten sich weitere Experimente anschließen. So wäre interessant, ob die Abwesenheit von L1, wie in L1-defizienten Mäusen einen Einfluss auf die Lokalisierung von RPTP α in *Lipid rafts* hat. Außerdem ist unklar, wie L1 in *Lipid rafts* rekrutiert wird. Für eine Lokalisierung von L1 in *Lipid rafts* wäre eine Modifikation am Molekül, z.B. in Form einer Palmitoylierung notwendig. Für NCAM konnte bereits gezeigt werden, dass eine posttranslationale Palmitoylierung des Proteins für die temporäre *Lipid raft*-Lokalisierung von NCAM verantwortlich ist (Niethammer et al., 2002). Weiterhin wäre wichtig, die L1-vermittelte Aktivierung von p60^{src} in RPTP α -defizienten Mäusen zu untersuchen, um die Interaktion aller drei Moleküle genauer zu charakterisieren. Direkte Interaktionen der Proteine könnten z.B. durch ELISA analysiert werden. Dabei wäre es interessant, ob die Interaktionen über extra- oder intrazelluläre Domänen stattfindet und inwieweit Glykosylierungen eine Rolle spielen.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Assoziation von L1 und p60^{src} in Abwesenheit von RPTP α . In der Koimmunpräzipitation konnte kein L1 mit p60^{src} in RPTP α -defizienten Mäusen detektiert werden (Abb. 11), obwohl bekannt ist, dass p60^{src} *in vitro* die Möglichkeit hat, L1 direkt an einem der beiden Tyrosinreste der zytoplasmatischen Domäne zu phosphorylieren (Schaefer et al., 2002). Eine Interaktion beider Moleküle ohne RPTP α ist daher nicht auszuschließen, obwohl eine direkte Bindung bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte.

7.3 Isolierung und Zusammensetzung von *Lipid rafts* mit nicht-ionischen Detergenzien

Neben Triton X-100 werden verschiedene andere Detergenzien verwendet, um *Lipid rafts* aus Membranen zu isolieren. So wurden Methoden zur Isolation von *Lipid rafts* mit verschiedenen Konzentrationen von Lubrol WX, Brij-58, Brij-96, Nonidet P40 und CHAPS beschrieben (Drevot et al., 2002; Ilangumaran et al., 1999; Madore et al., 1999; Roper et al., 2000; Schuck et al., 2003; Slimane et al., 2003). Diese Arbeiten mit unterschiedlichen Detergenzien resultierten in der Isolierung von *Lipid rafts* mit verschiedener Lipid- und Proteinzusammensetzung. *Lipid rafts*, welche mit Triton X-100 oder CHAPS isoliert wurden, waren stark mit Sphingolipiden und Cholesterol angereichert. Mit Brij-96 isolierte *Lipid rafts* waren mit Cholesterol und Sphingomyelin angereichert, jedoch nicht in gleichem Maße wie bei Triton X-100 unlöslichen *Lipid rafts* (Schuck et al., 2003). Eine Möglichkeit, dieses Phänomen zu erklären, ist die unterschiedliche Stringenz der Detergenzien, mit welcher *Lipid rafts* aus der Membran isoliert werden. Triton X-100 ist ein stärkeres Detergenz als Brij-96 und solubilisiert demzufolge stringenter Nicht-*Raft*-Proteine, kann jedoch ebenfalls Proteine solubilisieren, die schwächer mit *Lipid rafts* assoziieren. Brij-96 dagegen ist ein schwächeres Detergenz und bei der Isolierung der *Lipid rafts* könnten Membranbestandteile vorhanden sein, die *in vivo* keine *Lipid rafts* darstellen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass Detergenzien in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich stark solubilisieren. So konnten Schuck *et al.* (2003) zeigen, dass mit Brij-96 in MDCK Zellen *Lipid rafts* spezifischer isoliert werden können als in Jurkat Zellen.

In dieser Arbeit wurden *Lipid rafts* mit zwei verschiedenen Detergenzien isoliert, zum einen mit 1% Triton X-100 (Abb. 12; Abb. 17), zum anderen mit 0,5% Brij-96 (Abb. 13-15). Die effiziente Solubilisierung von Nicht-*Raft*-Komponenten mit Triton X-100 lassen die

Vermutung zu, dass das L1-Protein tatsächlich in *Lipid rafts* vorkommen kann (Abb. 12). Eine *Lipid raft*-Isolierung mit schwächeren Detergenzien würde eine stärkere Kontamination mit Proteinen vermuten lassen, die *in vivo* nicht in *Lipid rafts* lokalisiert sind. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich um eine *in vitro*-Methode handelt, die nicht vollständig auf die realen Bedingungen *in vivo* rückschließen läßt.

Brij-96 wurde in der Literatur als ein Detergenz beschrieben, welches in Neuronen und Myelin *Lipid rafts* mit gleicher Komposition wie Triton X-100 isoliert (Madore et al., 1999; Taylor et al., 2002). Da Brij-96 außerdem *Lipid raft* Vesikel formt, die für eine Immunisolierung mit Antikörpern gegen die extrazelluläre Domänen der Proteine die richtige Konformation haben [*right side out*, (Radeva and Sharom, 2004)] wurde dieses Detergenz für die Immunisolierung von Subtypen von *Lipid rafts* verwendet (Abb. 13-15).

Die unterschiedlichen Eigenschaften von Detergenzien machen deutlich, dass die Isolierung von *Lipid rafts* einige biochemisch bedingte Probleme mit sich bringt. Vermutungen, dass eine Extraktion mit Detergenzien eine Fusion verschiedener *Lipid rafts* mit sich bringen kann und eventuell Lipid-Wechsel zwischen Membranen bedingt (Edidin, 2003; Shogomori and Brown, 2003), zeigen zusätzlich, dass es nötig ist, neue, vor allem Detergenzien-freie Methoden zu entwickeln, um *Lipid rafts* und deren Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* zu analysieren. Die bisherigen Detergenzien-freien Methoden brachten nicht die gewünschten Ergebnisse, da auch hier Probleme wie Vermischen verschiedener Membranstrukturen und selektive Extraktion von Lipiden auftraten (Pike et al., 2002).

7.4 L1-positive *Lipid rafts* und NCAM-positive *Lipid rafts* unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung

In dieser Arbeit konnten durch Immunisolierungen mit spezifischen Antikörpern zwei verschiedene Subtypen von *Lipid rafts* identifiziert werden, die entweder L1- oder NCAM-positiv waren (Abb. 13). Western Blot-Analysen mit diversen Antikörpern konnten Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Proteinkomposition aufzeigen (Abb. 14). So zeigte sich, dass L1-positive *Lipid rafts*, aber nicht NCAM-positive *Lipid rafts* mit dem GPI-verankerten Protein F3 angereichert sind. NCAM-enthaltende *Lipid rafts* waren mit PrP angereichert (Abb. 14). Diese Ergebnisse gehen konform mit früheren Untersuchungen in denen die unterschiedliche Verteilung von GPI-verankerten Proteinen in *Lipid rafts* gezeigt wurden. So konnten Madore *et al.* (1999) mit einer ähnlichen Methode PrP-positive *Lipid*

rafts von Thy-1-positiven *Lipid rafts* separieren. Außerdem konnten sie nachweisen, dass unterschiedliche Glykoproteine in den zwei *Lipid raft*-Subtypen angereichert sind. Interessanterweise erwähnten sie, dass in ihren Untersuchungen nicht nur F3 sondern auch TAG-1 in Thy-1-positiven, aber nicht PrP-positiven *Lipid rafts* lokalisiert sind. In dieser Arbeit durchgeführte Immunisolierungen konnten dagegen TAG-1 sowohl in L1-positiven *Lipid rafts* als auch in NCAM- und PrP-positiven in *Lipid rafts* nachweisen. Die Extraktion mit Detergenzien kann zu einer Verstärkung des Clusters von verschiedenen *Lipid rafts* führen (Pike, 2004). Somit kann mit dieser Methode nicht ausgeschlossen werden, dass der Nachweis von TAG-1 in beiden Subtypen von *Lipid rafts* eine Kontamination mit anderen *Lipid rafts* darstellt. Möglicherweise handelt es sich auch um eine *trans*-Interaktion von benachbarten Zellen, die aufgrund der nicht-stringenten Isolationsbedingungen nicht getrennt wurden.

Eine weitere wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist die Lokalisierung von p60^{src} und p59^{fyn} in unterschiedlichen Subtypen von *Lipid rafts* (Abb. 14). Für beide Src-Kinasen konnte schon früher eine *Lipid raft* Lokalisierung beschrieben werden (de Diesbach et al., 2008; Resh, 2008; Shenoy-Scaria et al., 1994). Während jedoch p59^{fyn} aufgrund seiner posttranslationalen Modifikation in Form einer Palmitoylierung hauptsächlich in *Lipid rafts* lokalisiert ist, wird die Lokalisierung von p60^{src} in *Lipid rafts* kontrovers diskutiert. Die Src-Kinase p60^{src} wird posttranslational nur myristoyliert. Es wurde jedoch beschrieben, dass mindestens zwei zusätzliche Modifikationen in Form von Fettsäuren für eine *Lipid raft* Lokalisierung wichtig sind, wobei dies entweder eine Myristoylierung und Palmitoylierung (Moffett et al., 2000; Shaul et al., 1996) oder zwei Palmitoylierungen sein können (Arni et al., 1998; Zhang et al., 1998a). In den *Lipid raft* Präparationen mit Triton X-100 von Membranen des Mausgehirns konnte eine Anreicherung von p60^{src} in *Lipid rafts* detektiert werden (Abb. 12). Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den Ausführungen, dass eine Palmitoylierung Voraussetzung für die Lokalisierung in *Lipid rafts* ist (Koziak et al., 2000) und p60^{src} somit kein in *Lipid rafts* angereichertes Protein darstellt (Melkonian et al., 1999).

McCabe und Berthiaume (McCabe and Berthiaume, 1999) konnten zeigen, dass zweifach acylierte GFPs (*green fluorescent proteins*) zwar mit dem *Lipid raft* Marker GM1 kolokalisieren, jedoch nicht in Detergenz-resistenten Membranfraktionen nachgewiesen werden konnten. Daraus schlossen sie, dass in einigen Fällen eine mehrfache Acylierung nicht ausreicht, um Proteine in *Lipid rafts* zu lokalisieren. Sie vermuteten, dass zusätzliche Protein-Protein-Interaktionen nötig sind, um Proteine in *Lipid rafts* zu rekrutieren. Dies könnte auch

für die Lokalisierung von p60^{src} eine Rolle spielen und so zur Anreicherung der Src-Kinase in *Lipid rafts* führen.

Untersuchungen mit p60^{v-src} in MDCK-Zellen zeigten eine duale Verteilung von aktiviertem p60^{v-src} in der Plasmamembran (de Diesbach et al., 2008). Zum einen konnte das Protein in Endosomen detektiert werden, zu anderen in *Lipid rafts* der Plasmamembran. Außerdem konnte eine Thermoaktivierung die Lokalisierung von p60^{v-src} in *Lipid rafts* verstärken, was stark darauf hindeutet, dass für die Rekrutierung von p60^{v-src} in *Lipid rafts* Protein-Lipid-Interaktionen bzw. Protein-Protein-Interaktionen eine wesentliche Rolle spielen und die Aktivierung der Src-Kinase mit der *Lipid raft* Lokalisierung korreliert. So konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Kinaseaktivität mit einer Vermehrung der *Lipid raft* Lokalisierung dieser Moleküle einhergeht. Inwieweit das auf die Src-Kinase p60^{src} und die in dieser Arbeit beschriebene *Lipid raft*-Lokalisierung von p60^{src} übertragbar ist, bleibt unklar.

Eine weitere Erklärung für die sichtbare Anreicherung von p60^{src} in *Lipid rafts* von Membranen des Mausgehirns wäre, dass die Kinase in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Membranbereiche bevorzugt. So konnten Hur *et al.* (Hur et al., 2004) zeigen, dass p60^{src} in PC12-Zellen wesentlich in *Lipid rafts* lokalisiert ist. In Fibroblasten (Mukherjee et al., 2003) und MDCK-II-Zellen (Arreaza et al., 1994) dagegen konnte nur eine geringe Menge von p60^{src} in *Lipid rafts* identifiziert werden. Mukherjee *et al.* (2003) konnten in ihrer Arbeit die Unterschiede der Lokalisierung in verschiedenen Zelltypen klar herausstellen. Sie zeigten, dass eine neurale Splicevariante von p60^{src}, die in Nervenzellen exprimiert wird, zu ca. 20% in *Lipid rafts* lokalisiert ist. Dabei stellten sie fest, dass die Myristoylierung für die *Lipid raft* Lokalisierung von p60^{src} wichtig ist. Sie diskutierten auch, dass eine zusätzliche spezifische N-terminale Sequenz eine *Lipid raft* Lokalisierung bedingen könnte. Die genauen Mechanismen der *Lipid raft* Lokalisierung von p60^{src} bleiben jedoch weiterhin unklar.

Diese Ausführungen machen deutlich, dass es sehr starke strukturelle Unterschiede zwischen den Src-Kinasen p59^{fyn} und p60^{src} gibt. Das unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, in welcher die beiden Src-Kinasen in verschiedenen Subtypen von *Lipid rafts* lokalisiert sind (Abb. 14). Ihre unterschiedliche Assoziation mit *Lipid rafts* und diverse Protein-Protein- bzw. Protein-Lipid-Interaktionen lassen vermuten, dass p60^{src} und p59^{fyn} unterschiedliche Kompositionen von *Lipid rafts* im Mausgehirn bevorzugen. Eine Analyse der Lipidzusammensetzung beider Subtypen von *Lipid rafts* könnte mehr Aufschluss darüber geben.

7.5 GM1 und GPI-verankerte Moleküle bevorzugen unterschiedliche *Lipid rafts*

Die in dieser Arbeit isolierten Subtypen von *Lipid rafts* wurden auch auf zwei Lipide hin untersucht, die als *Lipid raft* Marker anerkannt sind. PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) ist ein Lipid, welches als Signalmolekül wesentlich an Prozessen der Signalweiterleitung durch die Zelle beteiligt ist. Es konnte zu gleichen Teilen in beiden Subtypen von *Lipid rafts* detektiert werden (Abb. 15). Überraschenderweise konnte das Gangliosid GM1 nicht in den L1- und NCAM-positiven *Lipid rafts* nachgewiesen (Abb. 15) werden, obwohl es in der Literatur als allgemein verwendeter *Lipid raft* Marker fungiert. Eine unzureichende *Lipid raft* Isolierung erscheint unwahrscheinlich, da in beiden Subtypen von *Lipid rafts* verschiedene GPI-verankerte Proteine angereichert waren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass spezifisch *Lipid rafts* isoliert wurden.

In neueren Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass *Lipid rafts* mit einer Anreicherung von GPI-verankerten Proteinen verschiedene Ganglioside enthielten, jedoch kein GM1. Die ersten Hinweise, dass GM1 in von GPI-verankerten Proteinen verschiedenen Membrandomänen lokalisiert ist, lieferten bereits die Arbeiten von Schnitzer *et al.* (1995). Die Autoren konnten *Lipid rafts* isolieren, welche mit GPI-verankerten Proteinen angereichert sind und kein GM1 enthalten. Sie zeigten, dass das gesamte GM1 zusammen mit der Caveolae-angereicherten Fraktion isoliert werden konnte, die keine Anreicherung von GPI-verankerten Proteinen enthielt. Weitere Arbeiten zeigten ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die unterschiedliche Verteilung von GPI-verankerten Proteinen und GM1 in Membrandomänen (Arvanitis *et al.*, 2005; Dietrich *et al.*, 2001). Daraus läßt sich ableiten, dass zumindest einige *Lipid rafts*, die mit GPI-verankerten Proteinen angereichert sind, GM1-negativ sind.

Eine weitere mögliche Interpretation wäre, dass Cholera toxin das Gangliosid GM1 nicht so spezifisch binden kann, wie bisher vermutet wurde. Neuere Untersuchungen diskutierten, dass Cholera toxin mit der Erhöhung der Menge an GM1 in der Plasmamembran seine Bindungseigenschaften mehr und mehr verliert (Shi *et al.*, 2007). Außerdem gab es Untersuchungen, die zeigten, dass Cholera toxin zwar *Lipid rafts*, aber nicht spezifisch GM1 erkennt (Blank *et al.*, 2007). Daher müßten sich Untersuchungen mit GM1-spezifischen Antikörpern anschließen, um ein Vorhandensein des Gangliosides in den isolierten Subtypen sicher ausschließen zu können. In diesem Zuge könnten auch weitere Ganglioside auf ihr Vorhandensein in den *Lipid rafts* hin getestet werden. Desweiteren könnten genauere Aussagen über unterschiedliche Lipidzusammensetzungen von *Lipid raft* Subtypen durch

chromatographische Methoden, wie Gaschromatographie oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie getroffen werden.

7.6 Artverwandte Proteine kompensieren füreinander

In dieser Arbeit konnten kompensatorische Effekte der Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM beschrieben werden. Diese Kompensation wird zum einen durch die Beobachtungen an der Src-Kinase-Aktivierung in L1- und NCAM-defizienten Mäusen deutlich. Wird die Aktivierung von p60^{src} durch das Fehlen von L1 in L1-/y-Mäusen stark eingeschränkt (Abb. 7), so kann eine Steigerung der p59^{fyn}-Aktivierung beobachtet werden (Abb. 19, A). Im Einklang dazu bewirken ein Fehlen von NCAM und eine damit verbundene Beeinträchtigung der p59^{fyn}-Aktivierung, dass die Menge an aktiviertem p60^{src} heraufreguliert wird (Abb. 19, B). Außerdem ist das L1- oder NCAM-vermittelte Neuritenwachstum gesteigert, wenn das jeweils andere Zelladhäsionsmolekül fehlt (Abb. 20, Abb. 22). Darüber hinaus konnte eine Steigerung der L1- bzw. der NCAM-Expression beobachtet werden, wenn der jeweilige Gegenpart fehlte (Abb. 21). Anhand dieser Ergebnisse läßt sich annehmen, dass die L1- und NCAM-vermittelten Signalwege sowohl synergistisch zusammenarbeiten als auch bei Blockierung von einem der beiden Signalwege füreinander kompensieren können.

Eine mögliche Erklärung für den kompensatorischen Effekt beider Proteine wäre, dass L1 und NCAM in der Wildtyp-Situation um die Bindung an RPTP α konkurrieren. Fehlt eins der beiden Proteine, wie dies z.B. in L1- oder NCAM-defizienten Mäusen der Fall ist, dann kann das jeweils andere Protein mehr RPTP α binden. Darüber hinaus ist die Expression von L1 in NCAM-defizienten Mäusen bzw. von NCAM in L1-defizienten Mäusen erhöht, was zu einer vermehrten Bindung von RPTP α führen könnte (Abb. 21). Damit ließe sich das verstärkte Neuritenwachstum bei Abwesenheit von L1 oder NCAM nach Stimulation mit Antikörpern gegen das noch vorhandene Protein erklären (Abb. 20). Ebenfalls wäre dadurch die erhöhte Aktivierung von p60^{src} in NCAM-defizienten Mäusen bzw. die gesteigerte Aktivierung von p59^{fyn} in L1-defizienten Mäusen zu erklären (Abb. 19).

Betrachtet man die kompensatorischen Effekte von L1 und NCAM genauer, fällt auf, dass beide Proteine einander wahrscheinlich nicht in gleichem Maße kompensieren können. So konnte beobachtet werden, dass die Steigerung der p60^{src}-Aktivierung in NCAM-/- Mäusen die Erhöhung der p59^{fyn}-Aktivierung in L1-/y Mäusen um ein Vielfaches übertrifft (Abb. 19). Auch das gesteigerte Neuritenwachstum nach einer L1-Stimulierung (Abb. 20) und die

Expressionserhöhung von L1 in NCAM-defizienten Mäusen (Abb. 21) ist auffällig höher als die durch NCAM ausgelösten kompensatorischen Effekte. Diese Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, dass L1 mehrere Signalkaskaden aktivieren kann und somit höhere kompensatorische Fähigkeiten besitzt, als NCAM. So kann L1 z.B. mit Signalwegen von Integrinen quervernetzt sein und auf diese Weise zusätzlich auf die Aktivierung der Src-Kinase p60^{src} wirken (Maness and Schachner, 2007).

Kompensatorische Effekte konnten schon früher für Mitglieder der IgSF beobachtet werden. So konnte in L1-defizienten Mäusen festgestellt werden, dass nicht alle Gehirn-Regionen, die L1 exprimieren können, in L1-/y-Mäusen beeinträchtigt sind. Für L1 und NrCAM doppelt defiziente Mäuse zeigten einen Phänotyp, der nicht mit der Summierung beider einzelner Phänotypen erklärt werden konnte. Dies ist ein Zeichen dafür, dass NrCAM für das Fehlen von L1 kompensieren kann und umgekehrt. Für Neurofascin und NrCAM konnten ähnliche kompensatorische Effekte beobachtet werden (Sakurai et al., 2001).

Interessanterweise wurden auch auf der Ebene der Src-Kinasen solche kompensatorischen Effekte beschrieben. Obwohl diese Kinasen stark überlappende Funktionen haben, sich ihre knockout-Phänotypen teilweise ähneln und vor allem lebensfähig sind, sterben schon 85-90% der Doppel-knockouts von p60^{src} und p59^{fyn}, sowie alle Triple-knockouts von p60^{src}, p59^{fyn} und p62^{yes} perinatal. Die Vermutung liegt also nahe, dass auch Src-Kinasen einander kompensieren können (Kuo et al., 2005).

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass verwandte Moleküle höchstwahrscheinlich die Fähigkeit besitzen, die Funktionen der fehlenden Proteine zu kompensieren, welche sie im Wildtyp-Gehirn nicht ausführen würden. Die Kompensierung einzelner Moleküle füreinander scheint ein lebensnotwendiger Mechanismus in Zellen zu sein. In der Evolutionsgeschichte war die Entwicklung solcher quervernetzten Signalsysteme wahrscheinlich wichtig, um das Überleben auch unter weniger günstigen genetischen Bedingungen zu gewährleisten.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CHL1	Close Homologe to L1
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
cm	Zentimeter
CRASH	Corpus callosum hypoplasia, mental retardation, adducted thumbs, spasticity paraplegia and hydrocephalus
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinasen
et al.	und weitere
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FN	Fibronektin
GMEM	Glasgow's Minimal Essential Medium
GPI	Glykosylinositolphosphat
h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferter Salz-Lösung
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> (Meerrettisch-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton

ki	knock-in
M	molar, mol/l
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
nm	Nanometer
NRTK	Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen
p.a.	per analysi
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PLC γ	Phospholipase γ
PSA	Polysialinsäure
PTK	Proteintyrosinkinasen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH	Src-Homologie-Domäne
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	Unit(s)
UV	Ultraviolett
V	Volt

v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
x g	x 9,81 m/s ²
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9 Referenzen

Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., and Fukuda, M. (1997). Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J Biol Chem* 272, 7182-7190.

Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., and 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.

Arni, S., Keilbaugh, S.A., Ostermeyer, A.G., and Brown, D.A. (1998). Association of GAP-43 with detergent-resistant membranes requires two palmitoylated cysteine residues. *J Biol Chem* 273, 28478-28485.

Arreaza, G., Melkonian, K.A., LaFevre-Bernt, M., and Brown, D.A. (1994). Triton X-100-resistant membrane complexes from cultured kidney epithelial cells contain the Src family protein tyrosine kinase p62yes. *J Biol Chem* 269, 19123-19127.

Arvanitis, D.N., Min, W., Gong, Y., Heng, Y.M., and Boggs, J.M. (2005). Two types of detergent-insoluble, glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains from isolated myelin. *J Neurochem* 94, 1696-1710.

Ausubel, L.J., Kwan, C.K., Sette, A., Kuchroo, V., and 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.

Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V., and Schlessinger, J. (1993). SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell* 74, 83-91.

Bennett, V., and Chen, L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 13, 61-67.

- Benting, J.H., Rietveld, A.G., and Simons, K. (1999). N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 146, 313-320.
- Berglund, E.O., Murai, K.K., Fredette, B., Sekerkova, G., Marturano, B., Weber, L., Mugnaini, E., and Ranscht, B. (1999). Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron* 24, 739-750.
- Bhatnagar, R.S., and Gordon, J.I. (1997). Understanding covalent modifications of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle. *Trends Cell Biol* 7, 14-20.
- Bixby, J.L., Lilien, J., and Reichardt, L.F. (1988). Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol* 107, 353-361.
- Blank, N., Schiller, M., Krienke, S., Wabnitz, G., Ho, A.D., and Lorenz, H.M. (2007). Cholera toxin binds to lipid rafts but has a limited specificity for ganglioside GM1. *Immunol Cell Biol* 85, 378-382.
- Bodrikov, V., Leshchyn'ska, I., Sytnyk, V., Overvoorde, J., den Hertog, J., and Schachner, M. (2005). RPTPalpha is essential for NCAM-mediated p59fyn activation and neurite elongation. *J Cell Biol* 168, 127-139.
- Brackenbury, R., Thiery, J.P., Rutishauser, U., and 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.
- Brewis, I.A., Ferguson, M.A., Mehlert, A., Turner, A.J., and Hooper, N.M. (1995). Structures of the glycosyl-phosphatidylinositol anchors of porcine and human renal membrane dipeptidase. Comprehensive structural studies on the porcine anchor and interspecies comparison of the glycan core structures. *J Biol Chem* 270, 22946-22956.
- Brown, D.A., Crise, B., and Rose, J.K. (1989). Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 245, 1499-1501.
- Brown, D.A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.

- Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Brown, M.T., and Cooper, J.A. (1996). Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta* 1287, 121-149.
- Brummendorf, T., Hubert, M., Treubert, U., Leuschner, R., Tarnok, A., and Rathjen, F.G. (1993). The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10, 711-727.
- Brummendorf, T., and Rathjen, F.G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6, 584-593.
- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. (1991). Oncogenes and signal transduction. *Cell* 64, 281-302.
- Carpenter, G. (2000). The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling. *Bioessays* 22, 697-707.
- Cartwright, C.A., Eckhart, W., Simon, S., and Kaplan, P.L. (1987). Cell transformation by pp60c-src mutated in the carboxy-terminal regulatory domain. *Cell* 49, 83-91.
- Chen, S., Mantei, N., Dong, L., and Schachner, M. (1999). Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J Neurobiol* 38, 428-439.
- Chothia, C., and Jones, E.Y. (1997). The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* 66, 823-862.
- Cooper, J.A., and King, C.S. (1986). Dephosphorylation or antibody binding to the carboxy terminus stimulates pp60c-src. *Mol Cell Biol* 6, 4467-4477.
- Courtneidge, S.A., Levinson, A.D., and Bishop, J.M. (1980). The protein encoded by the transforming gene of avian sarcoma virus (pp60src) and a homologous protein in normal cells (pp60proto-src) are associated with the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3783-3787.

Craig, A.M., and Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17, 267-310.

Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P., Scheff, S., and et al. (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 367, 455-459.

Cross, G.A. (1990). Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Annu Rev Cell Biol* 6, 1-39.

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

David-Pfeuty, T., Bagrodia, S., and Shalloway, D. (1993). Differential localization patterns of myristoylated and nonmyristoylated c-Src proteins in interphase and mitotic c-Src overexpresser cells. *J Cell Sci* 105 (Pt 3), 613-628.

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

de Diesbach, P., Medts, T., Carpentier, S., D'Auria, L., Van Der Smissen, P., Platek, A., Mettlen, M., Caplanusi, A., van den Hove, M.F., Tyteca, D., and Courtoy, P.J. (2008). Differential subcellular membrane recruitment of Src may specify its downstream signalling. *Exp Cell Res* 314, 1465-1479.

Dietrich, C., Bagatolli, L.A., Volovyk, Z.N., Thompson, N.L., Levi, M., Jacobson, K., and Gratton, E. (2001). Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys J* 80, 1417-1428.

Doherty, P., Williams, G., and Williams, E.J. (2000). CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade. *Mol Cell Neurosci* 16, 283-295.

Drevot, P., Langlet, C., Guo, X.J., Bernard, A.M., Colard, O., Chauvin, J.P., Lasserre, R., and He, H.T. (2002). TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J* 21, 1899-1908.

-
- Edelman, G.M. (1986). Cell adhesion molecules in neural histogenesis. *Annu Rev Physiol* 48, 417-430.
- Eddin, M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 414-418.
- Englund, P.T. (1993). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem* 62, 121-138.
- Ferguson, M.A. (1992). Colworth Medal Lecture. Glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors: the tale of a tail. *Biochem Soc Trans* 20, 243-256.
- Ferguson, M.A., and Williams, A.F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* 57, 285-320.
- Ferraretto, A., Pitto, M., Palestini, P., and Masserini, M. (1997). Lipid domains in the membrane: thermotropic properties of sphingomyelin vesicles containing GM1 ganglioside and cholesterol. *Biochemistry* 36, 9232-9236.
- Fransen, E., Vits, L., Van Camp, G., and Willems, P.J. (1996). The clinical spectrum of mutations in L1, a neuronal cell adhesion molecule. *Am J Med Genet* 64, 73-77.
- Friedlander, D.R., Milev, P., Karthikeyan, L., Margolis, R.K., Margolis, R.U., and Grumet, M. (1994). The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 125, 669-680.
- Garber, E.A., Krueger, J.G., Hanafusa, H., and Goldberg, A.R. (1983). Temperature-sensitive membrane association of pp60src in tsNY68-infected cells correlates with increased tyrosine phosphorylation of membrane-associated proteins. *Virology* 126, 73-86.
- Gauen, L.K., Zhu, Y., Letourneur, F., Hu, Q., Bolen, J.B., Matis, L.A., Klausner, R.D., and Shaw, A.S. (1994). Interactions of p59fyn and ZAP-70 with T-cell receptor activation motifs: defining the nature of a signalling motif. *Mol Cell Biol* 14, 3729-3741.

- Gomez-Mouton, C., Lacalle, R.A., Mira, E., Jimenez-Baranda, S., Barber, D.F., Carrera, A.C., Martinez, A.C., and Manes, S. (2004). Dynamic redistribution of raft domains as an organizing platform for signaling during cell chemotaxis. *J Cell Biol* *164*, 759-768.
- Goridis, C., Deagostini-Bazin, H., Hirn, M., Hirsch, M.R., Rougon, G., Sadoul, R., Langley, O.K., Gombos, G., and Finne, J. (1983). Neural surface antigens during nervous system development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *48 Pt 2*, 527-537.
- Gorter, E. and F. Grendel (1925). On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. 439-443. *J Exp Med* *41*, 439-443.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5547-5551.
- Grumet, M., Mauro, V., Burgoon, M.P., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. (1991). Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* *113*, 1399-1412.
- Gumbiner, B.M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* *84*, 345-357.
- Harder, T., Scheiffele, P., Verkade, P., and Simons, K. (1998). Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* *141*, 929-942.
- Harder, T., and Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 534-542.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B., and Kromhout, D. (1993). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* *20*, 21-29.
- Hooper, N.M., and Turner, A.J. (1988). Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem J* *250*, 865-869.
- Hunter, T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* *88*, 333-346.

-
- Hur, E.M., Park, Y.S., Lee, B.D., Jang, I.H., Kim, H.S., Kim, T.D., Suh, P.G., Ryu, S.H., and Kim, K.T. (2004). Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains. *J Biol Chem* 279, 5852-5860.
- Ignelzi, M.A., Jr., Miller, D.R., Soriano, P., and Maness, P.F. (1994). Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12, 873-884.
- Ilangumaran, S., Arni, S., van Echten-Deckert, G., Borisch, B., and Hoessli, D.C. (1999). Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinases in T lymphocyte plasma membranes. *Mol Biol Cell* 10, 891-905.
- Jorgensen, O.S. (1995). Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem Res* 20, 533-547.
- Jove, R., and Hanafusa, H. (1987). Cell transformation by the viral src oncogene. *Annu Rev Cell Biol* 3, 31-56.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., and Schachner, M. (1990a). Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol* 110, 209-218.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., and Schachner, M. (1990b). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 110, 193-208.
- Kaplan, K.B., Swedlow, J.R., Varmus, H.E., and Morgan, D.O. (1992). Association of p60c-src with endosomal membranes in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol* 118, 321-333.
- Kenwrick, S., Watkins, A., and De Angelis, E. (2000). Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9, 879-886.
- Kimizuka, F., Ohdate, Y., Kawase, Y., Shimojo, T., Taguchi, Y., Hashino, K., Goto, S., Hashi, H., Kato, I., Sekiguchi, K., and et al. (1991). Role of type III homology repeats in cell adhesive function within the cell-binding domain of fibronectin. *J Biol Chem* 266, 3045-3051.

- Kleene, R. and Schachner, M. (2004). Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci* 5, 195-208
- Koegl, M., Zlatkine, P., Ley, S.C., Courtneidge, S.A., and Magee, A.I. (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem J* 303 (Pt 3), 749-753.
- Kooyman, D.L., Byrne, G.W., McClellan, S., Nielsen, D., Tone, M., Waldmann, H., Coffman, T.M., McCurry, K.R., Platt, J.L., and Logan, J.S. (1995). In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* 269, 89-92.
- Koziak, K., Kaczmarek, E., Kittel, A., Sevigny, J., Blusztajn, J.K., Schulte Am Esch, J., 2nd, Imai, M., Guckelberger, O., Goepfert, C., Qawi, I., and Robson, S.C. (2000). Palmitoylation targets CD39/endothelial ATP diphosphohydrolase to caveolae. *J Biol Chem* 275, 2057-2062.
- Kuhn, T.B., Stoeckli, E.T., Condrau, M.A., Rathjen, F.G., and Sonderegger, P. (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115, 1113-1126.
- Kuo, G., Arnaud, L., Kronstad-O'Brien, P., and Cooper, J.A. (2005). Absence of Fyn and Src causes a reeler-like phenotype. *J Neurosci* 25, 8578-8586.
- Kuriyan, J., and Cowburn, D. (1997). Modular peptide recognition domains in eukaryotic signaling. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26, 259-288.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Pico, A., Porter, M., Kuriyan, J., and Miller, W.T. (1998). Intramolecular regulatory interactions in the Src family kinase Hck probed by mutagenesis of a conserved tryptophan residue. *J Biol Chem* 273, 32129-32134.
- Lasky, L.A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 64, 113-139.

Leshchyns'ka, I., Sytnyk, V., Morrow, J.S., and Schachner, M. (2003). Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKCbeta2 via betaI spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 161, 625-639.

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

Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davitz, M.A., and Rodriguez-Boulan, E. (1989). A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 109, 2145-2156.

Lisanti, M.P., and Rodriguez-Boulan, E. (1990). Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends Biochem Sci* 15, 113-118.

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

Low, M.G. (1987). Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J* 244, 1-13.

Low, M.G. (1989). Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J* 3, 1600-1608.

Low, M.G., and Saltiel, A.R. (1988). Structural and functional roles of glycosyl-phosphatidylinositol in membranes. *Science* 239, 268-275.

Lowell, C.A., and Soriano, P. (1996). Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev* 10, 1845-1857.

Madore, N., Smith, K.L., Graham, C.H., Jen, A., Brady, K., Hall, S., and Morris, R. (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J* 18, 6917-6926.

-
- Main, A.L., Harvey, T.S., Baron, M., Boyd, J., and Campbell, I.D. (1992). The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions. *Cell* *71*, 671-678.
- Maness, P.F., and Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* *10*, 19-26.
- Martini, R., and Schachner, M. (1986). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J Cell Biol* *103*, 2439-2448.
- Mayor, S., Menon, A.K., and Cross, G.A. (1991). Transfer of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors to polypeptide acceptors in a cell-free system. *J Cell Biol* *114*, 61-71.
- McCabe, J.B., and Berthiaume, L.G. (1999). Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization. *Mol Biol Cell* *10*, 3771-3786.
- McConville, M.J., and Ferguson, M.A. (1993). The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* *294* (Pt 2), 305-324.
- McConville, M.J., and Menon, A.K. (2000). Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). *Mol Membr Biol* *17*, 1-16.
- McLaughlin, S., and Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* *20*, 272-276.
- Melkonian, K.A., Ostermeyer, A.G., Chen, J.Z., Roth, M.G., and Brown, D.A. (1999). Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* *274*, 3910-3917.
- Moffett, S., Brown, D.A., and Linder, M.E. (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem* *275*, 2191-2198.

- Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Fruh, K., and Schachner, M. (1988). Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334, 701-703.
- Mukherjee, A., Arnaud, L., and Cooper, J.A. (2003). Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem* 278, 40806-40814.
- Murray, B.A., Owens, G.C., Prediger, E.A., Crossin, K.L., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. (1986). Cell surface modulation of the neural cell adhesion molecule resulting from alternative mRNA splicing in a tissue-specific developmental sequence. *J Cell Biol* 103, 1431-1439.
- Nada, S., Okada, M., MacAuley, A., Cooper, J.A., and Nakagawa, H. (1991). Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351, 69-72.
- Nakamura, N., Inoue, N., Watanabe, R., Takahashi, M., Takeda, J., Stevens, V.L., and Kinoshita, T. (1997). Expression cloning of PIG-L, a candidate N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase. *J Biol Chem* 272, 15834-15840.
- Neet, K., and Hunter, T. (1996). Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families. *Genes Cells* 1, 147-169.
- Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., and Schachner, M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J Cell Biol* 157, 521-532.
- Nosjean, O., Briolay, A., and Roux, B. (1997). Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim Biophys Acta* 1331, 153-186.
- Owens, G.C., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. (1987). Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 294-298.
- Paige, L.A., Nadler, M.J., Harrison, M.L., Cassady, J.M., and Geahlen, R.L. (1993). Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck. *J Biol Chem* 268, 8669-8674.

-
- Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* *1*, 188-211.
- Pawson, T. (1995). Protein-tyrosine kinases. Getting down to specifics. *Nature* *373*, 477-478.
- Petrone, A., and Sap, J. (2000). Emerging issues in receptor protein tyrosine phosphatase function: lifting fog or simply shifting? *J Cell Sci* *113* (Pt 13), 2345-2354.
- Pike, L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* *44*, 655-667.
- Pike, L.J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* *378*, 281-292.
- Pike, L.J., Han, X., Chung, K.N., and Gross, R.W. (2002). Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* *41*, 2075-2088.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K., and Horber, J.K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* *148*, 997-1008.
- Radeva, G., and Sharom, F.J. (2004). Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J* *380*, 219-230.
- Rathjen, F.G., and Schachner, M. (1984). Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J* *3*, 1-10.
- Rathjen, F.G., Wolff, J.M., Chang, S., Bonhoeffer, F., and Raper, J.A. (1987). Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions. *Cell* *51*, 841-849.
- Reed, R.A., Mattai, J., and Shipley, G.G. (1987). Interaction of cholera toxin with ganglioside GM1 receptors in supported lipid monolayers. *Biochemistry* *26*, 824-832.

-
- Reichardt, L.F., and Tomaselli, K.J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* *14*, 531-570.
- Resh, M.D. (1993). Interaction of tyrosine kinase oncoproteins with cellular membranes. *Biochim Biophys Acta* *1155*, 307-322.
- Resh, M.D. (1994). Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* *76*, 411-413.
- Resh, M.D. (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal* *8*, 403-412.
- Resh, M.D. (2008). The ups and downs of SRC regulation: tumor suppression by Cbp. *Cancer Cell* *13*, 469-471.
- Robbins, S.M., Quintrell, N.A., and Bishop, J.M. (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol* *15*, 3507-3515.
- Roche, S., Fumagalli, S., and Courtneidge, S.A. (1995). Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science* *269*, 1567-1569.
- Roper, K., Corbeil, D., and Huttner, W.B. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* *2*, 582-592.
- Rose, S.P. (1996). Cell adhesion molecules and the transition from short- to long-term memory. *J Physiol Paris* *90*, 387-391.
- Rudd, C.E., Janssen, O., Prasad, K.V., Raab, M., da Silva, A., Telfer, J.C., and Yamamoto, M. (1993). src-related protein tyrosine kinases and their surface receptors. *Biochim Biophys Acta* *1155*, 239-266.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-491.

- Sakurai, T., Lustig, M., Babiarz, J., Furley, A.J., Tait, S., Brophy, P.J., Brown, S.A., Brown, L.Y., Mason, C.A., and Grumet, M. (2001). Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and L1 in cerebellar granule cell development. *J Cell Biol* 154, 1259-1273.
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005). Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J Cell Biol* 169, 341-354.
- Schachner, M., and Martini, R. (1995). Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci* 18, 183-191.
- Schaefer, A.W., Kamei, Y., Kamiguchi, H., Wong, E.V., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Beach, C.M., Landreth, G., Lemmon, S.K., and Lemmon, V. (2002). L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol* 157, 1223-1232.
- Schlessinger, J., and Ullrich, A. (1992). Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9, 383-391.
- Schnitzer, J.E., McIntosh, D.P., Dvorak, A.M., Liu, J., and Oh, P. (1995). Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* 269, 1435-1439.
- Schuch, U., Lohse, M.J., and Schachner, M. (1989). Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3, 13-20.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., and Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5795-5800.
- Seilheimer, B., and Schachner, M. (1988). Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J Cell Biol* 107, 341-351.
- Shaul, P.W., Smart, E.J., Robinson, L.J., German, Z., Yuhanna, I.S., Ying, Y., Anderson, R.G., and Michel, T. (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem* 271, 6518-6522.

-
- Shenoy-Scaria, A.M., Dietzen, D.J., Kwong, J., Link, D.C., and Lublin, D.M. (1994). Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol* 126, 353-363.
- Shi, J., Yang, T., Kataoka, S., Zhang, Y., Diaz, A.J., and Cremer, P.S. (2007). GM1 clustering inhibits cholera toxin binding in supported phospholipid membranes. *J Am Chem Soc* 129, 5954-5961.
- Shogomori, H., and Brown, D.A. (2003). Use of detergents to study membrane rafts: the good, the bad, and the ugly. *Biol Chem* 384, 1259-1263.
- Sicheri, F., Moarefi, I., and Kuriyan, J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-609.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Slimane, T.A., Trugnan, G., Van, I.S.C., and Hoekstra, D. (2003). Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell* 14, 611-624.
- 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., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., and Bradley, A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64, 693-702.

- Stein, P.L., Vogel, H., and Soriano, P. (1994). Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev* 8, 1999-2007.
- Takeda, J., and Kinoshita, T. (1995). GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 20, 367-371.
- Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59, 237-252.
- Taylor, C.M., Coetzee, T., and Pfeiffer, S.E. (2002). Detergent-insoluble glycosphingolipid/cholesterol microdomains of the myelin membrane. *J Neurochem* 81, 993-1004.
- Testai, F.D., Landek, M.A., Goswami, R., Ahmed, M., and Dawson, G. (2004). Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: role of inhibition by phosphatidyl-myoinositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling. *J Neurochem* 89, 636-644.
- Thiery, J.P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., and Edelman, G.M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J Biol Chem* 252, 6841-6845.
- Thomas, S.M., Soriano, P., and Imamoto, A. (1995). Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature* 376, 267-271.
- Udenfriend, S., and Kodukula, K. (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 64, 563-591.
- van Meer, G., and Simons, K. (1982). Viruses budding from either the apical or the basolateral plasma membrane domain of MDCK cells have unique phospholipid compositions. *EMBO J* 1, 847-852.
- van Rheenen, J., Achame, E.M., Janssen, H., Calafat, J., and Jalink, K. (2005). PIP2 signaling in lipid domains: a critical re-evaluation. *EMBO J* 24, 1664-1673.
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 3, 97-130.

- Vaughn, D.E., and Bjorkman, P.J. (1996). The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules. *Neuron* 16, 261-273.
- Vidugiriene, J., and Menon, A.K. (1993). Early lipid intermediates in glycosylphosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J Cell Biol* 121, 987-996.
- Watanabe, R., Kinoshita, T., Masaki, R., Yamamoto, A., Takeda, J., and Inoue, N. (1996). PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 271, 26868-26875.
- Weller, S., and Gartner, J. (2001). Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* 18, 1-12.
- Wood, P.M., Schachner, M., and Bunge, R.P. (1990). Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J Neurosci* 10, 3635-3645.
- Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.
- Yamada, E. (1955). The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 445-458.
- Yamasaki, M., Thompson, P., and Lemmon, V. (1997). CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 28, 175-178.
- Yuan, C., and Johnston, L.J. (2000). Distribution of ganglioside GM1 in L-alpha-dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol monolayers: a model for lipid rafts. *Biophys J* 79, 2768-2781.
- Yurchak, L.K., and Sefton, B.M. (1995). Palmitoylation of either Cys-3 or Cys-5 is required for the biological activity of the Lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* 15, 6914-6922.
- Zhang, W., Tribble, R.P., and Samelson, L.E. (1998a). LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity* 9, 239-246.

Zhang, Z., Devarajan, P., Dorfman, A.L., and Morrow, J.S. (1998b). Structure of the ankyrin-binding domain of alpha-Na,K-ATPase. *J Biol Chem* 273, 18681-18684.

Zheng, X.M., Wang, Y., and Pallen, C.J. (1992). Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 359, 336-339.

Danksagung

Was bedeutet Forschung für mich? Mit Neugier biologischen Prozessen auf den Grund gehen, dabei neue Wege zu beschreiten und mit anderen Wissenschaftlern in einen regen Informationsaustausch zu treten, immer mit dem Wunsch im Herzen, das Wissen über das Leben zu erweitern. Sind diese Vorstellungen zu idealistisch? Wahrscheinlich! Und trotzdem habe ich in den 4 Jahren meiner Doktorarbeit versucht, an dieser Idee festzuhalten.

Eine gute Voraussetzung dafür war ein spannendes Thema, welches mich von Anfang an fasziniert hat. Ich danke Frau Prof. Dr. Melitta Schachner für die Möglichkeit, dass ich genau an dieser Fragestellung in ihrem Institut arbeiten durfte. Wie es eine Zelle schafft, Ordnung in ihre vielfältigen biochemischen Prozesse zu bringen, fesselt mich immer wieder.

Schon während meiner Diplomarbeit bei Prof. Dr. Hans-Peter Mühlbach wurde mein Interesse für Proteinkomplexe und Interaktionspartner geweckt. Auch während meiner Doktorarbeit stand er mir mit Rat und Tat zur Seite. Ich war jederzeit in seiner Arbeitsgruppe in Klein Flottbek willkommen und hatte oft das Gefühl, „nach Hause“ zu kommen. Die Herzlichkeit, mit der ich jedesmal von Hanny, Nicole, Nanette, Dagmar und Heidrun begrüßt wurde, war unglaublich wohltuend und kraftspendend.

Im ZMNH gab es reichlich Unterstützung. Ich danke Dr. Vladimir Sytnyk, Dr. Iryna Leshchyn'ska und Dr. Vsevolod Bodrikov für ihre Kooperationsbereitschaft. Ihre Ideen haben das Projekt wesentlich mitbestimmt und vorangetrieben. Sie haben mich täglich vor neue Herausforderungen gestellt, die mich persönlich stark geprägt haben und mir aufzeigten, dass meine Vorstellungen von Forschung nicht immer der Realität entsprechen.

Es gab Zeiten während dieser Doktorarbeit, die mich menschlich sehr gefordert haben. In solchen Zeiten stand mir Doreen immer zur Seite. Von Beginn an haben wir die Zeit am ZMNH zusammen bestritten: diskutiert, pipettiert, gelacht, gesungen, Rechnungen bearbeitet, Kaffee getrunken und uns gegenseitig unterstützt! Ich kann nicht in Worte fassen, wie wichtig mir diese Freundschaft in den 4 Jahren geworden ist.

Unterstützt wurde ich von weiteren wunderbaren Menschen. Ohne Annikas rettende Massagen hätte ich wohl mehr schmerzvolle Zeiten im Institut erlebt. Sie hat mich unglaublich beruhigt, wenn es mal ein wenig stressiger wurde. Mit Elisa habe ich nicht nur meine kulturellen Interessen geteilt. Die abendlichen Theater-, Kino- und Konzertbesuche waren bereichernd und haben neue Kraft für die Aufgaben im Labor gespendet. Vasudha, Aparna, Shen und Nan haben mich sehr beeindruckt. Sie sind mit so viel Liebe und ehrlichem Interesse auf andere Menschen zugegangen, ohne Vorurteile und falsche Vorsicht. Sie hatten

jederzeit ein offenes Interesse, über Versuche, Ergebnisse und Protokolle zu diskutieren. Sie haben uns ihre indische und chinesische Kultur nähergebracht und dadurch ein großes Stück Toleranz in unsere Herzen gepflanzt. Ich möchte an dieser Stelle auch Gaby und Iris für ihre liebevolle Unterstützung während des Schreibens dieser Arbeit danken. Und natürlich meiner Denkhalle mit Joon und Bibhu, den charmantesten Männern im Institut.

Und wie viel einfacher wäre die Zeit wohl gewesen, wenn ich Kerstin und Inga früher kennengelernt hätte! Die aufmunternden Keks-Zeiten, das kurze Vorbeischauen und das herzliche Lachen waren am Ende der Doktorarbeit eine wunderbare Stärkung. Zu diesem Mädels-Gespann gehört natürlich auch meine wunderbare Ann, durch die ich Kerstin und Inga erst kennengelernt habe.

Ja, es gab ein Leben neben der Forschung. Ich habe die zwei besten Mitbewohner, die ich mir in der Zeit nur wünschen konnte. Nicole hat mir zu Hause den Rücken frei gehalten, während mir Ena zeigte, wie unbefangene Kinder die Welt entdecken können. Meine „alten“ Freunde Anja, Angela und Stefan glaubten wie immer an mich, machten mir Mut und hatten immer ein offenes Ohr für meine Probleme. Wir haben schon viele Abschlüsse zusammen erlebt und erlitten. Ich bin gespannt, welche Hürden wir noch in unserem Leben gemeinsam nehmen werden. Ich danke außerdem meiner Freundin Sabine. Ich erinnere mich noch genau, wie sie nach meiner ersten Diplomprüfung mit Erdbeeren und Sekt auf mich gewartet hat. Auch während meiner Doktorarbeit war sie mit ihrem Sanftmut immer an meiner Seite. Es gibt so viele weitere Menschen, die mich mit ihren Durchhalteparolen, wunderschönen gemeinsamen Abenden und ihrer Liebe durch die Doktorarbeit getragen haben. Iris, Kathrin, Marlen... sie alle sind mir ins Herz gefallen!

Zum Schluß möchte ich meiner Familie danken. Vor allem mein Opa hat schon früh die Weichen für eine wissenschaftliche Laufbahn gelegt, indem er mir als kleines Kind in seinem Mikroskop das Leben in den Regenpfützen zeigte. Das Mikroskop steht seit vielen Jahren bei mir im Regal und zeigt mir, wo meine Wurzeln sind. Ich danke auch meinem Mann Krzysiek für seine Liebe und seinen bedingungslosen Glauben an mich: „Das Leben wäre vielleicht einfacher, wenn ich dich nicht getroffen hätte. Es wäre nur nicht mein Leben.“ (Erich Fried).