

**Die Rolle Zytoskelett-assoziiierter Proteine bei der  
L1-vermittelten Neuritogenese und dem  
Neuritenwachstum**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften am Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Carina Figge**

geboren am 3. Januar 1980 in Haan

Hamburg, März 2009



Diese Arbeit wurde am Zentrum für molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg in der Abteilung für Biosynthese neuraler Strukturen unter der Leitung von Prof. Dr. M. Schachner durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. C. Betzel
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Schachner

Tag der Disputation: 6. Mai 2009



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Zelladhäsionsmoleküle . . . . .	9
1.1.1	Neurale Zelladhäsionsmoleküle . . . . .	10
1.1.2	Die Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle	10
1.1.3	Das Zelladhäsionsmolekül L1 . . . . .	12
1.1.4	L1 und das Zytoskelett . . . . .	17
1.2	Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum	20
1.2.1	Rho-GTPasen . . . . .	20
1.2.2	Cofilin-1 . . . . .	24
1.2.3	Regulation der Mikrotubuli bei Migration . . . . .	27
1.2.3.1	Lis1, Dynein, Doublecortin und Nde1 . . . . .	29
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>36</b>
3.1	Materialien . . . . .	36
3.1.1	Chemikalien . . . . .	36
3.1.2	Puffer und Lösungen . . . . .	36
3.1.3	Antikörper . . . . .	38
3.1.3.1	Verwendete Erstantikörper . . . . .	38
3.1.3.2	Verwendete Sekundärantikörper . . . . .	38

---

3.1.4	Inhibitorische Peptide . . . . .	39
3.1.5	Inhibitoren . . . . .	39
3.1.6	Molekulargewichtstandards . . . . .	39
3.1.7	Proteine . . . . .	40
3.1.8	Kits . . . . .	40
3.1.9	Transfektionsreagenzien . . . . .	41
3.1.10	Zelllinien . . . . .	41
3.1.11	Materialien für die Zellkultur . . . . .	41
3.1.12	Plasmide . . . . .	42
3.1.13	<i>e.coli</i> -Stämme . . . . .	43
3.1.14	Mauslinien . . . . .	43
3.2	Methoden . . . . .	44
3.2.1	Zellbiologische Methoden . . . . .	44
3.2.1.1	Kultivierung von Säugetierzellen . . . . .	44
3.2.1.2	Transfektion von Säugerzellen . . . . .	45
3.2.1.3	Beschichtung von Deckgläschen und Zellkulturplatten	46
3.2.1.4	Primärkultur von Hippocampusneuronen . . . . .	47
3.2.1.5	Transfektion von Hippocampusneuronen . . . . .	48
3.2.1.6	Primärkultur von Kleinhirnneuronen . . . . .	49
3.2.1.7	Stimulation von Kleinhirnneuronen mit Antikörpern	50
3.2.1.8	Neuritogenese- und Neuritenwachstumsexperimen- te mit Kleinhirnneuronen . . . . .	50
3.2.1.9	Produktion von Fc-markierten Proteinen im euka- ryotischen Expressionssystem . . . . .	51
3.2.1.10	Produktion von monoklonalen Antikörpern in Hybri- domazellen . . . . .	53
3.2.1.11	Oberflächenbiotinylierung . . . . .	54

---

3.2.1.12	Immunfluoreszenz . . . . .	55
3.2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	56
3.2.2.1	Transformation von Bakterien <sup>[251]</sup> . . . . .	56
3.2.2.2	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNS . . . . .	56
3.2.2.3	Reinigung von Plasmid-DNS mit Phenol-Chloroform . . . . .	57
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	58
3.2.3.1	Produktion von His-markierten Proteinen im proka- ryotischen Expressionssystem . . . . .	58
3.2.3.2	Produktion von GST-markierten Proteinen im proka- ryotischen Expressionssystem . . . . .	60
3.2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	62
3.2.3.4	Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen . . . . .	64
3.2.3.5	Western-Blotting . . . . .	66
3.2.3.6	Proteinkonzentrationsbestimmung per BCA-Test . . . . .	67
3.2.3.7	Herstellung von Maushirnhomogenat . . . . .	68
3.2.3.8	Fraktionierung von Hirngewebe der Maus . . . . .	68
3.2.3.9	Stimulation von Wachstumskegeln aus Maushirn . . . . .	70
3.2.3.10	Rho-GTPase Aktivitätstest . . . . .	71
3.2.3.11	Affinitätschromatographie . . . . .	72
3.2.3.12	Co-Immunpräzipitation . . . . .	75
3.2.3.13	<i>pull-down</i> . . . . .	75
3.2.3.14	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> . . . . .	76
3.2.3.15	Proteinvernetzung mit Sulfo-SBED . . . . .	77
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>79</b>
4.1	L1 und Lis1 . . . . .	79
4.1.1	Einfluss von Lis1 auf die L1-vermittelte Neuritogenese . . . . .	79
4.1.2	Einfluss von Nde1 auf die L1-vermittelte Neuritogenese . . . . .	82

---

4.1.3	Untersuchung einer potentiellen Interaktion von L1 mit DCX und Nde1 . . . . .	83
4.2	L1 und Rho-GTPasen . . . . .	85
4.2.1	Untersuchung der Aktivität der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA im Gehirn L1-defizienter Mäuse . . . . .	85
4.2.2	Untersuchung der Rho-GTPase-Aktivität in anti-L1-stimulierten Kleinhirnneuronen . . . . .	87
4.2.3	Untersuchung der Rho-GTPase-Aktivität in L1-stimulierten Neuroblastom-Zellen . . . . .	90
4.2.4	Untersuchung der Expression von Rac1 und Cdc42 in L1-defizientem Maushirn . . . . .	92
4.2.5	Einfluss von RhoA auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum .	93
4.2.6	Einfluss von RhoA auf die Oberflächenlokalisation von L1 . .	94
4.3	L1 und Cofilin . . . . .	98
4.3.1	Untersuchung einer möglichen Interaktion von L1 und Cofilin	98
4.3.2	Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Cofilin in L1-defizientem Maushirn . . . . .	100
4.3.3	Untersuchung der Cofilin-Aktivität in L1-Antikörper-stimulierten Kleinhirnneuronen . . . . .	101
4.3.4	Untersuchung der Cofilin-Aktivität in L1-Antikörper-stimulierten Wachstumskegeln . . . . .	102
4.3.5	Einfluss von Cofilin auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum	104
4.4	Neue L1-Interaktionspartner . . . . .	108
4.4.1	Suche nach neuen intrazellulären L1-Bindungspartnern mittels Affinitätschromatographie . . . . .	108
4.4.2	Suche nach neuen intrazellulären L1-Bindungspartnern mittels <i>crosslinking</i> . . . . .	111

---

<b>5 Diskussion</b>	<b>112</b>
5.1 L1 und Lis1 . . . . .	112
5.2 L1 und Rho-GTPasen . . . . .	117
5.3 L1 und Cofilin . . . . .	124
5.4 Neue L1-Interaktionspartner . . . . .	128
<b>6 Zusammenfassung</b>	<b>133</b>
<b>7 Summary</b>	<b>136</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b>	<b>139</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>181</b>
9.1 Abkürzungsverzeichnis . . . . .	181
9.2 Sequenzen der rekombinant in <i>E. coli</i> exprimierten Proteine . . . . .	187
9.3 Gefahrensymbole . . . . .	188
9.4 Gefahrstoffe . . . . .	188
9.4.1 Risiko- und Sicherheitssätze . . . . .	189
9.5 Publikationen . . . . .	192



# 1 Einleitung

## 1.1 Zelladhäsionsmoleküle

Menschen und Tiere bestehen aus einer Vielzahl an Zellen, die den unterschiedlichsten Aufgaben dienen. Dabei „kleben“ die Zellen nicht einfach aneinander, sondern bilden hochorganisierte, dreidimensionale Strukturen. Dafür verantwortlich sind verschiedene Zelladhäsions-Mechanismen, die durch Verbindung mit dem Zytoskelett der einzelnen Zellen den unterschiedlichen Geweben ein Gerüst geben, das ihrer Funktion angepasst ist. Durch Zelladhäsionen wird die genetische Information eines Organismus in seine dreidimensionale Form übertragen.

Das System der Zelladhäsion basiert vor allem auf zwei Bestandteilen: der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) und den Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules*, CAMs). Zelladhäsionsmoleküle sind integrale Membranproteine mit zytoplasmatischen, transmembranen und extrazellulären Domänen. Die zytoplasmatische Seite dient u. a. der Verbindung zum Zytoskelett, welches die Zelle durchzieht und ihr Stabilität und Form verleiht. Mit dem extrazellulären Teil erfolgt die homo- oder heterophile Bindung an andere Zellen oder an Moleküle der extrazellulären Matrix. Obwohl durch diese Verbindungen das Gewebe stabilisiert und fixiert wird, sind sie keineswegs starr und unflexibel, sondern stellen ein dynamisches System dar, welches schnell auf veränderte Bedingungen reagieren kann.

### 1.1.1 Neurale Zelladhäsionsmoleküle

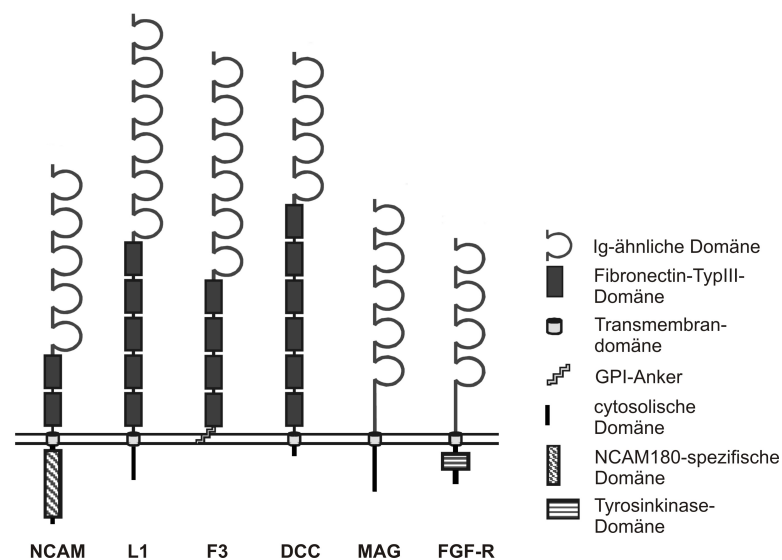
Die Entwicklung des Nervensystems besteht aus einer koordinierten Abfolge von Induktion, Proliferation, Migration und Differenzierung von Nerven- und Gliazellen. Nach Beendigung der Gehirnentwicklung kommen diese Prozesse jedoch nicht zum Stillstand. Durch äußere Einflüsse, z. B. während des Lernens, verändern sich Morphologie und Physiologie der Nervenzellen kontinuierlich, um das Gehirn an neue Gegebenheiten anzupassen (synaptische Plastizität). All diese Prozesse werden durch die Fähigkeit der Zellen, mit anderen Zellen und der extrazellulären Matrix zu interagieren, ermöglicht. Ein Großteil dieser Interaktionen wird durch neuronale Zelladhäsionsmoleküle vermittelt. Sie besitzen neben ihren adhäsiven Eigenschaften auch die Funktion von Signalüberträgern. Ihre große Anzahl und Vielfalt ermöglicht den Zellen, auf eine Unmenge unterschiedlicher Signale zu reagieren.

Die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle werden nach ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt: Integrine<sup>[125,232]</sup>, Cadherine, deren Adhäsion abhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  ist<sup>[140,276]</sup>, und die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie<sup>[33,300]</sup>.

### 1.1.2 Die Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle

Die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie werden in unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und erfüllen dort viele verschiedene Funktionen. Allen Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie ist die Immunglobulindomäne als Strukturelement gemein, eine kompakte Domäne mit zwei konservierten Cysteinresten, die durch zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter von 55-75 Aminosäuren Länge voneinander getrennt sind. Zur Familie gehören z. B. die Immunglobuline selbst, T-Zell-Rezeptoren, der *major histocompatibility complex* (MHC) und Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie der

*fibroblast growth factor-receptor* (FGF-R). Die neuronalen Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie enthalten neben der Immunglobulindomäne noch ein weiteres sich wiederholendes Strukturmerkmal, die Fibronectin-Typ-III-Domäne. Diese Domäne wurde erstmalig als 90 Aminosäuren umfassendes Motiv im extrazellulären Matrix-Molekül Fibronectin beschrieben<sup>[149]</sup>. Sie findet sich auch in anderen extrazellulären Matrix-Molekülen und ist an verschiedenen Interaktionen von Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt<sup>[242]</sup>. In Abb. 1.1 sind einige Mitglieder der



**Abbildung 1.1:** Die Immunglobulin-Superfamilie (nach Cunningham, 1995<sup>[50]</sup>): Mitglieder einiger Untergruppen sind *neural cell adhesion molecule* (NCAM)<sup>[26,280]</sup> und L1<sup>[227]</sup>, F3/F11/Contactin<sup>[233]</sup>, *deleted in colonrectal carcinoma* (DCC)<sup>[116]</sup>, *myelin associated glycoprotein* (MAG)<sup>[221]</sup> und *fibroblast growth factor-receptor* (FGF-R)<sup>[160]</sup>.

Immunglobulin-Superfamilie dargestellt, die zugleich auch Vertreter eigener Untergruppen sind. Eine der größten Untergruppen ist die L1-Familie, bestehend aus L1, *close homolog of L1* (ChL1), Neurofascin und *NgCAM related cell adhesion molecule*

(NrCAM). Die Moleküle der L1-Familie werden hauptsächlich während der Entwicklung des Nervensystems in Neuronen und Gliazellen exprimiert. Dort erfüllen sie Funktionen bei der Zellmigration, der Myelinisierung, sowie dem Wachstum und der Wegfindung von Axonen<sup>[32, 122]</sup>. Die wichtige Rolle der L1-Proteine wird durch die schweren neurologischen Defekte, die durch Mutationen in *L1*-Genen hervorgerufen werden<sup>[22, 48, 85, 108]</sup>, deutlich. Die meisten Mitglieder der L1-Familie besitzen eine ähnliche Struktur, bestehend aus sechs aminoterminalen Immunglobulin-Domänen, gefolgt von vier bis fünf Fibronectin-Typ-III-Modulen, einer Transmembrandomäne und einer 85–147 Aminosäuren langen und hochkonservierten zytoplasmatischen Domäne. Der extrazelluläre Teil dient sowohl der Interaktion mit anderen Proteinen, z. B. Proteinen der ECM (heterophile Interaktion), als auch der Interaktion mit L1-Molekülen (homophile Interaktion). Diese Interaktionen können *cis* oder *trans* stattfinden, d. h. mit Proteinen auf der „eigenen“ Zelloberfläche oder mit Proteinen der ECM oder auf der Oberfläche anderer Zellen. Auf diese Weise werden Adhäsion und Signalweiterleitung vermittelt. Die intrazelluläre Domäne von L1 interagiert mit Teilen des Zytoskeletts, mit Proteinkinasen und spielt eine Rolle bei der Endozytose.

### 1.1.3 Das Zelladhäsionsmolekül L1

Das neurale Zelladhäsionsmolekül L1 gehört zu den am besten untersuchten Zelladhäsionsmolekülen. L1-homologe Proteine wurden in unterschiedlichen Arten entdeckt, z. B. *nerve growth factor-inducible large external glycoprotein* (NILE, Ratte), Ng-CAM (Huhn), LAD-1 (Fadenwurm) und Neuroglian (Taufliege). Der Grad der Homologie zwischen den verschiedenen Arten reicht von 30 bis zu 60 %, wobei die höchste Übereinstimmung in der zytoplasmatischen Domäne zu finden ist. Die Homologien zwischen Mensch, Maus und Ratte liegen bei 92-97 %, wobei die zytoplasmatischen Domänen hier zu 100 % übereinstimmen.

L1 wird als etwa 200 kDa großes Glycoprotein exprimiert. Durch proteolytische Prozessierung entstehen Fragmente von 30, 50, 80, 140 und 180 kDa Größe<sup>[134, 168, 228]</sup>. L1 besteht aus sechs aminoterminalen Immunglobulin-Domänen, gefolgt von fünf Fibronectin-Typ-III-Modulen, einer Transmembrandomäne und einer 114 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne von L1 verfügt über 21 potentielle Glykosylierungsstellen. Tatsächlich tragen Zucker zu 25 % zur Gesamtmasse von L1 bei<sup>[168, 228]</sup>.

Durch alternatives Spleißen existieren zwei Isoformen von L1, die gewebe- und zellspezifisch exprimiert werden. Die neuronale Isoform besteht aus der gesamten kodierenden Sequenz (28 Exons), der nicht-neuronalen Isoform fehlen die Exons 2 und 27. Letztere findet sich z. B. im Nervensystem in Schwannzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten<sup>[275]</sup> sowie in der Epidermis und der Niere<sup>[58, 205]</sup>. Das in der nicht-neuronalen Isoform fehlende Exon 27 kodiert ein vier Aminosäuren langes Stück der intrazellulären Domäne von L1. Dieses RSLE-Motiv spielt eine wichtige Rolle bei der Endozytose<sup>[135]</sup> und der Neuritenverzweigung<sup>[45]</sup>.

Die Expression von L1 beginnt bereits in einer frühen Phase der neuronalen Entwicklung. Postmitotische Neurone, die zu ihren endgültigen Positionen im Gehirn wandern, zeigen auf ihrer Oberfläche L1<sup>[216]</sup>. Nach Beendigung der Migration ist L1 vorwiegend auf den auswachsenden Axonen und ihren Wachstumskegeln lokalisiert. Im adulten Nervensystem ist L1 nur noch auf nicht-myelinisierten Axonen zu finden<sup>[15, 180]</sup>. Im peripheren Nervensystem wird L1 auch von nicht-myelinisierenden Schwannzellen exprimiert<sup>[179, 180]</sup>.

Im Einklang mit seinem Expressionsmuster ist L1 in viele Prozesse des sich entwickelnden sowie des adulten Nervensystems involviert. Die wichtigste Funktion ist dabei die Zelladhäsion<sup>[105, 198, 228]</sup>, welche die Grundlage vieler weiterer Vorgänge bildet, für die L1 eine wichtige Rolle spielt. Dazu gehören die Migration

postmitotischer Neurone<sup>[10,168]</sup>, Axonwachstum und -bündelung sowie axonale Wegfindung<sup>[41,81,154,157,229]</sup>, Förderung des Zellüberlebens von Neuronen<sup>[43,171]</sup> und Myelinisierung<sup>[304]</sup>. Außerdem spielt L1 eine Rolle bei der Regeneration von Axonen<sup>[181]</sup>, bei der synaptischen Plastizität sowie Lern- und Gedächtnisprozessen<sup>[8,175,240,247]</sup>.

Diese vielfältigen Funktionen werden u. a. durch homophile Interaktionen von L1-Molekülen, die sowohl *cis* als auch *trans* stattfinden, vermittelt<sup>[111,162,193]</sup>. Dabei spielt die posttranslationale Prozessierung von L1 eine wichtige Rolle. Proteolyse durch ADAM-10, ADAM-7, PC5A und  $\gamma$ Secretase führt zu löslichen L1-Fragmenten, die das L1-vermittelte Neuritenwachstum sowie Adhäsion und Migration beeinflussen<sup>[134,176,186]</sup>. Neben den homophilen Wechselwirkungen sind auch die heterophilen Interaktionen von L1-Molekülen für viele L1-Funktionen essentiell (Abb. 1.2). Bisher bekannte Interaktionspartner von L1 sind die Zelladhäsionsmoleküle NCAM<sup>[133]</sup>, F3/F11/Contactin<sup>[31]</sup>, Axonin-1/TAG-1<sup>[153]</sup>, DM1-GRASP<sup>[57]</sup>, einige Integrine<sup>[67,243]</sup>, der FGF-Rezeptor<sup>[301]</sup>, CD9<sup>[259]</sup> und CD24<sup>[132]</sup>. Außerdem bindet L1 Moleküle der extrazellulären Matrix wie Laminin<sup>[106]</sup> und die Proteoglykane Phosphacan<sup>[189]</sup> und Neurocan<sup>[87]</sup>. Zudem bildet L1 zusammen mit Neuropilin-1 einen Rezeptor für Semaphorin3A, ein auf wachsende Neuriten repulsiv wirkender Signalstoff<sup>[37]</sup>. Intrazellulär existieren mehrere Wege, auf denen L1 Signale weiterleitet. Durch Interaktion von L1 mit dem FGF-Rezeptor wird dessen intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität aktiviert und eine Signalkaskade ausgelöst, die über die Aktivierung von Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) schließlich einen Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen verursacht<sup>[29,65,66,148,172,187,244,246,294,301]</sup>. Die erhöhte lokale Calciumkonzentration aktiviert calciumsensitive Kinasen, wie z. B. die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulinkinase II, die das Neuritenwachstum beeinflusst<sup>[101,268,278,305]</sup>. Weitere L1-abhängige Signalkaskaden werden durch Interaktionen mit den Proteinkinasen *chicken embryo kinase 5/EphB2* (Cek5), Casein kinase II und p90<sup>rsk</sup> ausgelöst<sup>[155,303,314,315]</sup>. Clustering

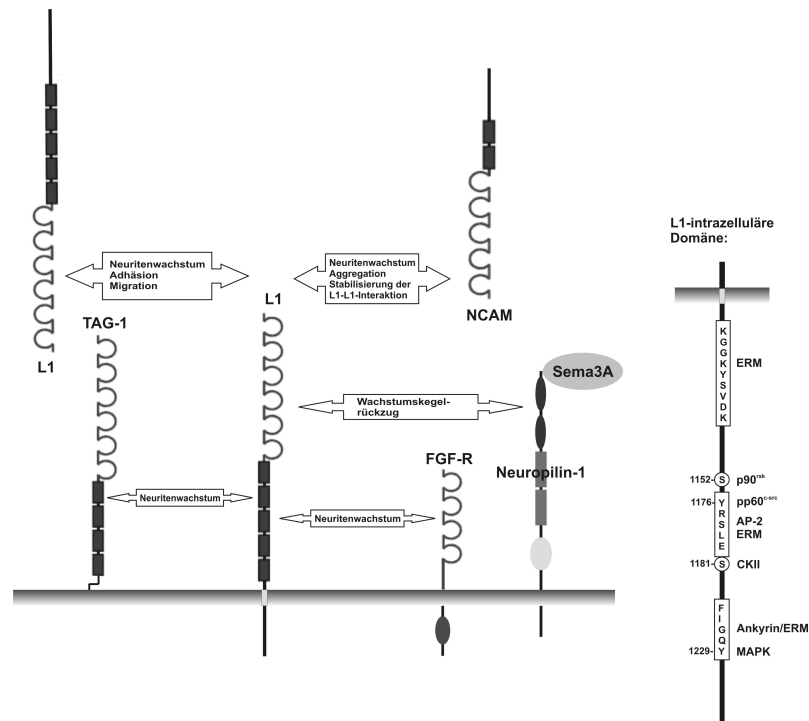


Abbildung 1.2: Extrazelluläre und intrazelluläre Interaktionen von L1

von L1 an der Zelloberfläche aktiviert die *mitogen activated protein kinase* (MAP-Kinase) und die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), was zu Neuritenwachstum und Migration führt<sup>[257]</sup>. Eine weitere Kinase, die in die L1-Signaltransduktion involviert ist, ist die Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup>. pp60<sup>c-src</sup>-defiziente Neurone zeigen ein vermindertes L1-abhängiges Neuritenwachstum<sup>[127]</sup>. Ob pp60<sup>c-src</sup> dabei direkt an L1 bindet, ist jedoch noch nicht geklärt. Zudem ist pp60<sup>c-src</sup> in die clathrinabhängige L1-Endozytose sowie die L1-vermittelte MAP-Kinase-Aktivierung involviert<sup>[254, 257]</sup>.

Mutationen im *L1*-Gen führen zu verschiedenen x-chromosomal rezessiv vererbba- ren neurologischen Erkrankungen, die unter dem Begriff L1-Syndrom zusammen-

gefasst werden<sup>[80]</sup>. Darunter sind das MASA-Syndrom (*mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumb*<sup>[20]</sup>), HSAS (*hydrocephalus due to stenosis of the aqueduct of Sylvius*<sup>[21]</sup>), SP1 (*spastic paraparesis type 1*<sup>[141]</sup>) und ACC (*agenesis of corpus callosum*<sup>[86, 131, 292]</sup>). Typische Symptome des L1-Syndroms sind Hydrozephalus, geistige Entwicklungsverzögerungen, Spastiken und eine Agenesie des Corpus Callosum. Die Mutationen betreffen das gesamte *L1*-Gen und beinhalten Punkt-, *missense*- und *nonsense*-Mutationen sowie Deletionen und Insertionen. Je nach Phänotyp können sie in drei Gruppen unterteilt werden (Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1:** Genotyp-Phänotyp-Relation von *L1*-Mutationen (aus Weller und Gärtner, 2001<sup>[296]</sup>)

	Genotyp	Phänotyp	potentielle L1-Funktion
Klasse I	Mutationen, die zur Abtrennung der extrazellulären Domäne führen	schwer	vollständiger Verlust der Proteinfunktion
Klasse II	<i>missense</i> -Mutationen in der extrazellulären Domäne	schwer bis mild	extrazelluläre Funktionen und Zelladhäsion nur z. T. erfüllt
Klasse III	Mutationen in der intrazellulären Domäne	mild	extrazelluläre Funktionen und Zelladhäsion bleiben erhalten

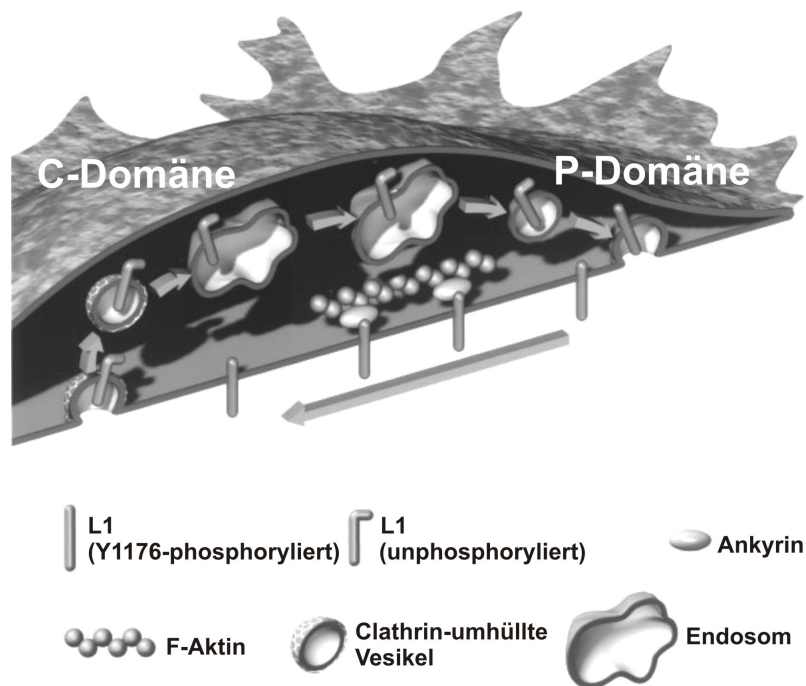
Art und Ausmaß der Symptome variieren stark innerhalb und zwischen den betroffenen Familien und lassen epigenetische Einflüsse auf die Mutationen vermuten<sup>[142]</sup>.

Zum besseren Verständnis des L1-Syndroms wurden Mausmodelle entwickelt, die Mutationen im *L1*-Gen aufweisen<sup>[49, 52]</sup>. Die konstitutiv L1-defizienten Tiere weisen einen dem Menschen sehr ähnlichen Phänotyp auf. Die beobachteten Veränderungen im zentralen Nervensystem sind u. a. Hypoplasien des corticospinalen Traktes, des Corpus Callosum und des Kleinhirnwurms sowie vergrößerte Ventrikel<sup>[49, 52, 59, 85]</sup>. Sie besitzen eine verkürzte Lebensdauer (abhängig vom genetischen Hintergrund), zeigen lokomotorische Defizite und ein gestörtes räumliches Lernvermögen<sup>[85]</sup>.



### 1.1.4 L1 und das Zytoskelett

L1-gesteuerte Prozesse wie Neuritenwachstum und Migration erfordern eine Reorganisation des Zytoskeletts. Dabei spielt das Zytoskelettprotein Aktin eine große Rolle. Durch ständiges Polymerisieren und Depolymerisieren von Filamenten, bestehend aus vielen G-Aktin-Untereinheiten, ermöglicht es das Ausbilden von Lamellipodien und Filopodien und schließlich die Fortbewegung von Wachstumskegeln oder der gesamten Zelle. Die mechanischen Kräfte dazu werden durch den rückwärtsgerichteten Strom von Aktinfilamenten generiert<sup>[166]</sup>.



**Abbildung 1.3:** Mechanismus des L1-Recyclings im neuronalen Wachstumskegel (nach Kamiguchi und Lemmon, 2000<sup>[135]</sup>)

Zelladhäsionsmoleküle wie L1 spielen dabei eine wichtige Rolle, da sie feststehende, extrazelluläre Moleküle mit dem Aktinstrom verbinden und somit eine Vorwärtsbewegung des Wachstumskegels oder der Zelle ermöglichen<sup>[167,273]</sup>. Dabei entsteht

ein Gradient, wobei an der Vorderkante viele, im hinteren Teil des Wachstumskegels weniger Zelladhäsionsmoleküle vorhanden sind. Im Wachstumskegel von Neuronen wird L1 in der hinteren C-Domäne des Wachstumskegels endozytiert und zur vorderen P-Domäne transportiert, wo es wieder an die Zelloberfläche gelangt<sup>[135]</sup> (Abb. 1.3).

Die Endozytose von L1 erfolgt via Clathrin-umhüllter Vesikel. Dabei bindet die intrazelluläre Domäne von L1 an AP-2, ein Adapterprotein, welches die Bindung von Membranproteinen an Clathrin-umhüllte Vesikel vermittelt<sup>[136,145]</sup>. Die Bindungsstelle von AP-2 ist das Motif YRSLE in der intrazellulären Domäne von L1<sup>[136]</sup>, welches in der nicht-neuronalen Isoform von L1 nicht vorkommt. Der Transport der Endosomen erfolgt vermutlich über Mikrotubuli, die bis in die P-Domäne der Wachstumskegel hineinreichen<sup>[135]</sup>. Wieder in die Membran integriert, bindet L1 an extrazelluläre Substrate wie z. B. Laminin. Eine Verknüpfung von L1 mit dem Zytoskelett und extrazellulären Substraten sowie das kontinuierliche Hinzufügen neuer Membranbestandteile zur Vorderkante des Wachstumskegels führen zur Translokation von L1 in die C-Domäne.

Die Verbindung von L1 zum rückwärtsgerichteten Strom der Aktinfilamente erfolgt u. a. über Ankyrin, ein spektrinbindendes Protein, welches eine Verbindung zum Aktinzytoskelett darstellt<sup>[54,55]</sup>. Die Ankyrin-Bindungsstelle FIGQY ist ein hochkonserviertes Motiv in der intrazellulären Domäne von L1, wobei eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes durch MAP-Kinase die Bindung von Ankyrin aufhebt<sup>[92,123,298,312]</sup>. Eine Inhibition der Bindung von Ankyrin an L1 durch Peptide resultiert in einem verbesserten L1-vermittelten Neuritenwachstum<sup>[96]</sup>.

Studien an Hinterwurzelganglien aus Hühnerembryos sowie B28-Gliomazellen zeigen eine Kolo-kalisation von L1 mit Aktinfilamenten, die entweder durch Behandlung mit Cytochalasin oder durch Deletion des membrannahen Teils (Lysin1147-

Lysin1150) der intrazellulären Domäne aufgehoben werden kann<sup>[51,164]</sup>. Dies deutet entweder auf eine direkte Interaktion der intrazellulären Domäne von L1 mit Aktin hin, oder auf eine Vermittlung dieser Bindung durch ein bisher unbekanntes Protein.

In kürzlich veröffentlichten Studien wurde ein weiteres Protein entdeckt, das L1 mit dem rückwärtsgerichteten Strom der Aktinfilamente in Verbindung bringt. Shimada *et al.* konnten zeigen, dass Shootin1, ein hirnspezifisches Protein, welches in Axonbildung und Polarisierung involviert ist<sup>[283]</sup>, sowohl L1 als auch die sich retrograd bewegenden Aktinfilamente in Wachstumskegeln bindet und somit L1 mit dem retrograden Strom verknüpfen könnte<sup>[261]</sup>.

Neben Ankyrin bindet L1 auch an Ezrin, ein Protein der Ezrin-Radixin-Moesin-Familie (ERM). Die Bindung von Ezrin an Aktin ist in die L1-abhängige Verzweigung von Neuriten involviert<sup>[60]</sup>. Cheng *et al.* konnten zeigen, dass die L1-Ezrin-Bindung sowohl von der membrannahen Region der intrazellulären Domäne von L1 (KGG-KYSVKDK) als auch dem RSLE-Motiv abhängt<sup>[45]</sup>. Zusätzlich zu diesen Motiven lokalisierten Tyukhtenko *et al.* via NMR-Analyse eine weitere Bindestelle von Ezrin im Ankyrinbindemotiv von L1<sup>[290]</sup>.

Für andere Moleküle der L1-Familie konnten noch weitere Zytoskelett-assoziierte Proteine als Bindungspartner identifiziert werden. So bindet Neurofascin an Doublecortin<sup>[146]</sup>, ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein<sup>[98]</sup>, und Syntenin-1<sup>[150]</sup>, welches als Adapterprotein fungiert und mit Aktinstressfasern colokalisiert ist<sup>[103]</sup>.

## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum

Neurone weisen eine besonders große morphologische Komplexität und eine Vielzahl an Strukturen auf. Dies reicht von meterlangen Axonen der Giraffe bis hin zu den tausenden winzigen Verzweigungen menschlicher Purkinjezellen. Für diese morphologische und damit auch funktionale Bandbreite ist eine ausgeklügelte Regulation des Zytoskeletts der Zelle notwendig. Zu klären, wie extrazelluläre Signale das Zytoskelett und damit die Form der Zelle beeinflussen, ist wichtig für das Verständnis des Nervensystems und seiner Funktion.

### 1.2.1 Rho-GTPasen

Wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts sind die Rho-GTPasen. Sie gehören zur Superfamilie der Ras-verwandten kleinen GTPasen und werden in allen eukaryotischen Zellen exprimiert. Zu den Rho-GTPasen gehören RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, RhoD, Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3, RhoG, TC10, TCL, RhoH/TFF, Chp, Wrch-1, Rif, RhoBTB1, RhoBTB2, Miro-1 und Miro-2<sup>[11]</sup>. Ihre Aktivität wird durch die Bindung von GDP (inaktiv) oder GTP (aktiv) reguliert. Der Wechsel zwischen den Aktivitätszuständen wird durch *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs)<sup>[258]</sup>, *GTPase activating proteins* (GAPs)<sup>[18]</sup> und *guanine nucleotide-dissociation inhibitors* (GDIs)<sup>[210]</sup> katalysiert (Abb. 1.4). Aktive Rho-GTPasen vermitteln eine Reihe verschiedener Funktionen, darunter Morphogenese, Migration, neuronale Entwicklung, Zellteilung, Vesikeltransport und Adhäsion<sup>[130]</sup>. Die am besten untersuchten Rho-GTPasen sind Cdc42, Rac1 und RhoA. Für sie sind bisher über 50 Bindungspartner bekannt, u. a. Serin/Threoninkinasen, Tyrosinkinasen, Lipasen und Oxidasen. Durch die Bindung der Rho-GTPasen kommt es vermutlich zu einem Konformationswechsel des Effektorproteins, der zu seiner Aktivierung führt<sup>[23]</sup>.

## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum 21

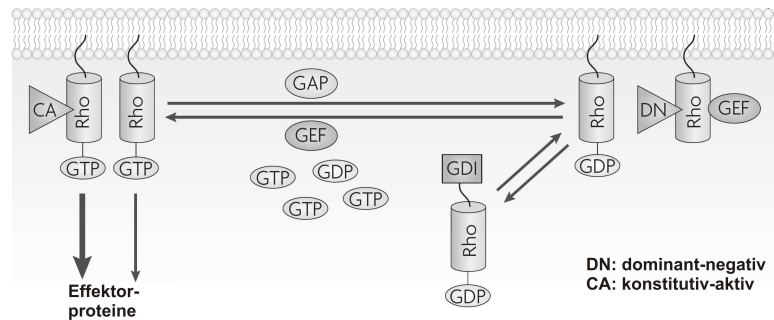


Abbildung 1.4: Regulation der Rho-GTPasen (aus Heasman und Ridley, 2008<sup>[115]</sup>)

Die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 sind für die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien verantwortlich. Diese Ausstülpungen, die entweder eine lamellen- oder fingerartige Form besitzen, dienen als Sensoren für die unmittelbare Umgebung eines Wachstumskegels während seiner Wanderung. Cdc42-defiziente Neurone zeigen eine verringerte Anzahl an Filopodien<sup>[91]</sup> und dominant-negatives Rac1 blockiert die Bildung von Lamellipodien in T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen<sup>[235]</sup>. Beide Proteine interagieren mit dem *actin-related protein-2/3* (Arp2/3), einem Proteinkomplex, der die Bildung von Verzweigungen der Aktinfilamente reguliert<sup>[190]</sup>. Die Interaktion erfolgt durch die Bindung an verschiedene Proteine der *Wiskott-Aldrich syndrome protein* Familie (WASP). *In vitro*-Experimente zeigen, dass Cdc42 direkt an N-WASP bindet und dadurch die Arp2/3-Bindestelle von N-WASP enthüllt<sup>[239]</sup>. Allerdings zeigen N-WASP-defiziente Zellen ein normales Filopodienwachstum<sup>[267]</sup>, weshalb der genaue Mechanismus, über den Cdc42 die Filopodienbildung reguliert, noch weiter untersucht werden muss. Rac1 interagiert mit einem N-WASP-verwandten Protein, dem *WASP-family verprolin-homologous protein* (SCAR/WAVE)<sup>[188]</sup>. Rac1 bindet nicht direkt an WAVE, jedoch an Nap125 und PIR121<sup>[68]</sup>, die mit WAVE einen Komplex bilden. Vermutlich wird der Komplex

## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum 22

---

durch die Bindung von Rac1 aufgelöst und das freie WAVE kann über Arp2/3 die Aktinpolymerisation beeinflussen.

Neben den WASP-Proteinen ist eine weitere Proteinfamilie für die Aktinpolymerisation verantwortlich, die Formine. Rho löst die Polymerisation von Aktin durch Interaktion mit *diaphanous-related formin* (DRF) und *mammalian diaphanous* (mDia1) aus. Dabei ändert das Formin-Protein seine Konformation und ist schließlich in der Lage, an die Enden von Aktinverzweigungen zu binden und dort die Polymerisation voranzutreiben<sup>[313]</sup>. Cdc42 bindet an mDia2, welches an der Bildung von Filopodien beteiligt ist<sup>[215]</sup>. Zusätzlich zur Verlängerung regulieren die Rho-GTPasen auch die Organisation der Aktinfilamente. Eine wichtige Rolle spielt hierbei die *Rho-associated, coiled-coil-containing protein* Kinase (ROCK). RhoA aktiviert ROCK, welche daraufhin die *myosin light chain* Phosphatase (MLC Phosphatase) phosphoryliert und damit inaktiviert. Dies führt zu einem Anstieg der MLC-Phosphorylierung und zu einer vermehrten Vernetzung von Aktinfilamenten durch Myosin II<sup>[237]</sup>.

Zur Bildung von Filopodien und Lamellipodien bedarf es nicht nur einer Reorganisation der Aktinfilamente. Mikrotubuli spielen ebenfalls eine wichtige Rolle. Sie besitzen eine polare Struktur, bestehend aus dem sogenannten Minus-Ende, welches meist am Centrosom lokalisiert ist, und dem Plus-Ende, welches in die Zellperipherie hineinragt. Proteine, die am Plus-Ende binden, beeinflussen die Stabilität der Mikrotubuli, indem sie entweder Wachstum oder Schrumpfen der Mikrotubuli auslösen (dynamische Instabilität). Proteine der Op18/Stathmin-Familie binden z. B. das Plus-Ende und verursachen den Abbau der Mikrotubuli<sup>[36]</sup>. Ausgelöst durch extrazelluläre Signale bewirken Rac1/Cdc42 die Phosphorylierung von Op18/Stathmin, was zu einer Inaktivierung und somit zur Verlängerung der Mikrotubuli führt<sup>[53]</sup>. Ein weiterer Effektor von Rac1/Cdc42 ist IQGAP, welches an der Vorderkante migrierender Zellen angereichert ist. IQGAP bindet über das *cytoplasmic linker protein 170* (CLIP-170) an das Plus-Ende von Mikrotubuli und rekrutiert diese hiermit in die

## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum 23

auswachsenden Bereiche der Zelle. Konstitutiv-aktives Rac1 oder Cdc42 führen zu einer erhöhten Bindung von IQGAP und dem *end-binding protein* (EB1), wodurch die Polarisierung der Zelle beschleunigt wird<sup>[88]</sup>. Cdc42 reguliert zudem durch Bindung an *polarity protein partitioning-defective-6* (PAR6) die Polarisierung der Zelle. PAR6 bildet mit PAR3 und die *atypical protein kinase C* (aPKC) den PAR-Komplex, der durch gezielte Rekrutierung von Proteinen die Ausbildung polarer Strukturen ermöglicht<sup>[207]</sup>. In Epithelzellen wurde gezeigt, dass Cdc42 für die korrekte Lokalisierung des PAR-Komplexes verantwortlich ist<sup>[178]</sup>. Zudem reguliert Cdc42 über den PAR-Komplex die Bindung von *adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein* (APC) und dem Mikrotubuli-Plus-Ende-bindenden Protein EB1, welche zur Stabilisierung und distinkten Lokalisierung der Mikrotubuli beitragen<sup>[192,297]</sup>.

Durch die Regulation der Polarisierung sind Rho-GTPasen in viele Vorgänge des Nervensystems involviert. Dazu gehören die axonale Wegfindung und Wachstum, wobei Rac1 für die Wegfindung und Cdc42 für das Wachstum verantwortlich zu sein scheint<sup>[42]</sup>. Studien an Oligodendrozyten und Schwannzellen zeigten zudem eine Rolle für Cdc42 bei der Schwannzellproliferation und für Rac1 bei der Ausbildung von Schwannzellfortsätzen und deren Stabilisierung<sup>[17,281]</sup>. Cdc42 ist zudem wichtig für die Differenzierung eines Neuriten zum Axon<sup>[91]</sup>. In unreifen, noch nicht polarisierten Neuronen sind RhoA, Rac1 und Cdc42 gleichmäßig in den Neuriten verteilt. Erst nach der Differenzierung in Dendriten und Axone findet sich Rac1 vorwiegend in den Axonen, RhoA in Dendriten und Cdc42 in allen Neuriten<sup>[263]</sup>. Die unterschiedlichen Funktionen der Rho-GTPasen spiegeln sich also auch in ihrer unterschiedlichen Lokalisation wieder.

Rac1/Cdc42 und RhoA besitzen außerdem wichtige Funktionen bei der Zellmigration und Chemotaxis. Vereinfacht dargestellt sorgen Rac1/Cdc42 für die Aktin-basierenden Ausstülpungen an der Vorderkante, wohingegen Rho an der Rückseite über ROCK und MLC für das Zusammenziehen der Aktinfilamente zuständig

## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum 24

---

ist<sup>[90, 128, 151, 237]</sup>. Rho reguliert zudem die Oberflächenlokalisierung von DCC, einem zur L1-Familie gehörenden Rezeptor des chemoattraktiven Signalstoffs Netrin-1 und sorgt auf diese Weise für eine rückläufige Wachstumskegelbewegung<sup>[197]</sup>. Bisher unveröffentlichte Daten von S. Gensler und C. Dotti (Universität Leuven) zeigen, dass die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 mit L1 interagieren. Dies konnte durch Co-Immunpräzipitationen aus Wachstumskegeln aus Rattenhippocampi gezeigt werden. Zudem konnte eine Co-Lokalisierung von Rac1 und Cdc42 mit L1 durch Immunfluoreszenz an Wachstumskegeln aus Rattenhippocampi beobachtet werden. RhoA hingegen zeigte keine Interaktion bzw. überlappende Immunfärbung. Die Hemmung von *p21-activated protein kinase 1* (PAK1) und *MAP kinase kinase kinase 1* (MEKK1) (Effektorkinasen von Rac1/Cdc42) führte zu einer deutlichen Verringerung des L1-abhängigen Neuritenwachstums und auch zu einer verringerten L1-abhängigen Polarisierung der Zellen, also der Entwicklung des Axons aus einem der auswachsenden Neuriten.

### 1.2.2 Cofilin-1

Cofilin-1 ist ein weiteres *downstream*-Effektorprotein der Rho-GTPasen. Es gehört mit muskulärem Cofilin-2 und dem *actin depolymerizing factor* (ADF) zur AC-Proteinfamilie. 1980 wurde ADF als erstes Mitglied dieser Familie aus dem Gehirn von Hühnern isoliert<sup>[14]</sup> und nach seiner Fähigkeit, Aktinfilamente zu depolymerisieren, benannt. Cofilin-1 wurde 1984 aus Schweinehirn isoliert<sup>[201]</sup>. Der Name begründet sich auf seiner Eigenschaft, mit Aktinfilamenten zu co-sedimentieren (*cofilamentous with actin*). Die Mitglieder der AC-Familie werden ubiquitär exprimiert und sind hochkonserviert. So exprimiert jede aktinexprimierende Säugerzelle auch ein oder mehrere Mitglieder der AC-Familie.

ADF, Cofilin-1 und Cofilin-2 sind aktindepolymerisierende Proteine. Sie generie-



ren zum einen monomeres Aktin (G-Aktin, von „globulär“) aus Aktinfilamenten (F-Aktin), zum anderen können sie ein einzelnes Filament in mehrere kurze Filamente teilen.

Aktinfilamente sind, genau wie Mikrotubuli, polare Strukturen. Sie besitzen ein schnell wachsendes Ende, das sogenannte *barbed end*, und ein langsam wachsendes Ende, das sogenannte *pointed end*. Am *barbed end* wird ATP-bindendes G-Aktin angefügt. Daraufhin wird ATP zu ADP und freiem Phosphat hydrolysiert. Somit besteht das Filament am *barbed end* aus ATP-Aktin, das *pointed end* aus ADP-Aktin. Cofilin besitzt eine höhere Affinität zu ADP- als ATP-Aktin, weshalb es bevorzugt am *pointed end* bindet und dort für die Freisetzung von Aktinmonomeren sorgt.

Die Aktivität von Cofilin wird auf unterschiedliche Weise reguliert, darunter Phosphorylierung am Serin 3<sup>[199]</sup>, pH-Wert<sup>[113,114]</sup>, Bindung von 14-3-3 Proteinen<sup>[100]</sup>, Konkurrenz mit Tropomyosin<sup>[19,211]</sup> und die Bindung an Phosphoinositide<sup>[310]</sup>. Verschiedene extrazelluläre Stimuli, z. B. EGF, NGF oder Semaphorin3A führen zu Änderungen der Phosphorylierung von Cofilin<sup>[2,185,311]</sup>. *In vitro*-Experimente zeigen, dass phospho-Cofilin nicht mehr in der Lage ist, an Aktin zu binden<sup>[1]</sup> oder es zu depolymerisieren<sup>[199]</sup>. Bisher sind zwei Kinasen bekannt, die für diese Inaktivierung verantwortlich sind: LIM-Kinasen (benannt nach der LIM-Domäne, die zuerst in den Proteinen Lin11, Isl-1 und Mec-3 gefunden wurde) und *testicular protein* Kinasen (TES-Kinasen)<sup>[9,285,308]</sup>. Die beiden Isoformen der LIM-Kinase, LIMK1 und LIMK2, werden ubiquitär exprimiert und durch die Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA reguliert<sup>[5,70,208]</sup>. Ein Effektorprotein von Rac1 und Cdc42 ist PAK1. PAK1 ist in der Lage, durch Phosphorylierung am Threonin 508 LIMK1 zu aktivieren<sup>[70]</sup>. RhoA reguliert die LIM-Kinase-Aktivität durch ROCK, welche ihrerseits LIMK2 am Threonin 505 phosphoryliert und damit aktiviert<sup>[272]</sup>. Die Aktivierung von TESK1 erfolgt ebenfalls durch RhoA, jedoch nicht über ROCK oder PAK1<sup>[284]</sup>. Ein möglicher Mechanismus wäre die Aktivierung des MAP Kinase Signalweges durch Rho, der zur

## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum 26

Aktivierung von TESK1 führt<sup>[284]</sup>. Die Inaktivierung von Cofilin durch die Kinasen wird durch Phosphatasen wieder aufgehoben. Zwei spezifische Phosphatase-Typen wurden bisher identifiziert, die Slingshot-Phosphatase-Familie (SSH1, SSH2 und SSH3) und Chronophin (CIN)<sup>[99,204]</sup>. Die Regulation der Cofilin-Aktivität ist in Abb. 1.5 schematisch dargestellt. Da Cofilin und seine Regulatoren in neuronalen

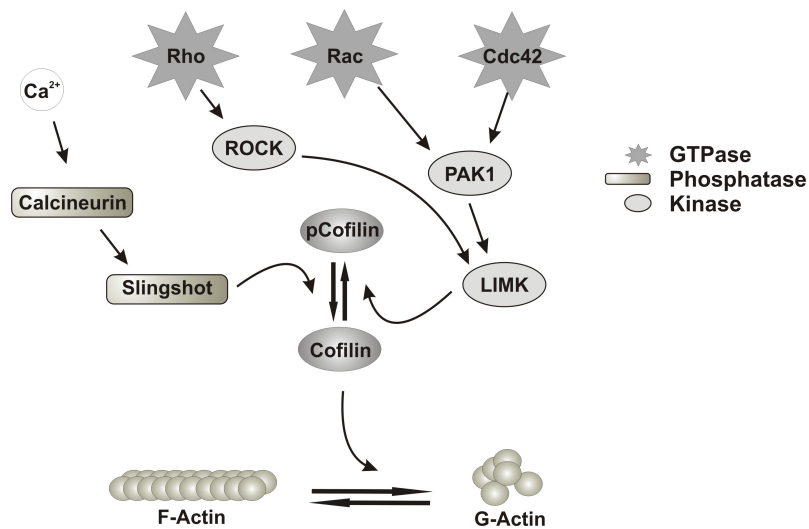


Abbildung 1.5: Regulierung der Aktivität von Cofilin

Wachstumskegeln angereichert sind<sup>[13,74,95,241]</sup> und dort die Dynamik des Aktinzytoskeletts beeinflussen, sind sie vermutlich an Neuritenwachstum und axonaler Wegfindung beteiligt. Tatsächlich wird durch Überexpression von Cofilin in PC12-Zellen, dorsalen Hinterwurzelganglien des Huhns und kortikalen Neuronen der Ratte das Neuritenwachstum verstärkt<sup>[74,184]</sup>. Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von LIMK1 in Neuronen zu einer verminderten Beweglichkeit des Wachstumskegels<sup>[74]</sup>. Auch das Kollabieren des Wachstumskegels als Reaktion auf Semaphorin3A oder Nogo-66 ist abhängig von LIMK1<sup>[2,124]</sup>. Diese Daten lassen auf einen negativen Effekt von LIMK1 auf das Neuritenwachstum schließen. Andere Studien zeigen

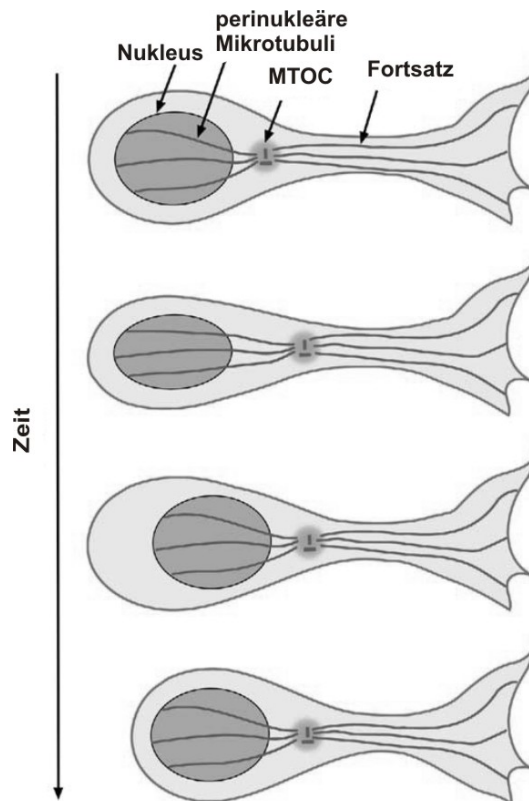
jedoch, dass die Überexpression von LIMK1 in Hippocampusneuronen ein erhöhtes Neuritenwachstum hervorruft, welches durch Inhibition von LIMK1 unterdrückt wird<sup>[161, 241, 289, 307]</sup>. Somit scheint die genaue Aufgabe der Phosphorylierung von Cofilin durch LIMK1 noch nicht ausreichend geklärt. Der Einfluß von Semaphorin3A auf die LIMK1-Aktivität und damit auch auf Cofilin ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse, da L1 mit Neuropilin-1 einen Rezeptor für Semaphorin3A darstellt<sup>[38]</sup>. L1 könnte also in den Effekt von Semaphorin3A auf LIMK1/Cofilin involviert sein.

### 1.2.3 Regulation der Mikrotubuli bei Migration

Neuronale Migration ist ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung des Nervensystems. Dabei zeigen Neurone eine bestimmte Form der Migration, die sie von anderen Zellen unterscheidet. Bei Fibroblasten und Neutrophilen wurde gezeigt, dass die wandernde Zelle Lamellipodien in Bewegungsrichtung ausbildet<sup>[236]</sup>. Zellkörper und Zellkern sind stark an die Vorwärtsbewegung der Vorderkante gekoppelt und bewegen sich stetig mit. Migrierende Neurone hingegen bilden lange Fortsätze aus, deren Bewegung vom Zellkörper und -kern entkoppelt sind<sup>[212]</sup>. Mit Hilfe dieser Fortsätze wird zunächst die Umgebung auf verschiedene repulsive oder attraktive Signalstoffe untersucht. Erst, wenn sich der Fortsatz konsequent in eine Richtung bewegt, folgt der Rest der Zelle<sup>[69, 299]</sup>.

Die Migration erfordert verschiedene Reorganisationen des Zytoskeletts. Eine wichtige Rolle spielen hier die Mikrotubuli. Die Mikrotubuli gehen vom sogenannten Centrosom oder *microtubule organizing center* (MTOC) aus, welches sich vor dem Zellkern befindet. Von dort strahlen die Mikrotubuli einerseits in den anterograden Fortsatz aus, andererseits umhüllen sie den Zellkern in Form eines Käfigs<sup>[102, 222, 238, 269, 277]</sup> (Abb. 1.6). Genau wie Aktinfilamente sind Mikrotubuli

polare Strukturen mit einem schnell und einem langsam wachsenden Ende (Plus- und Minus-Ende). Das Plus-Ende zeigt vom MTOC in die Peripherie der Zelle, wo es von Plus-Ende-bindenden Proteinen in die korrekte Richtung geleitet wird. Bei



**Abbildung 1.6:** Mikrotubuliorganisation im migrierenden Neuron (aus Tsai und Gleeson, 2005<sup>[288]</sup>)

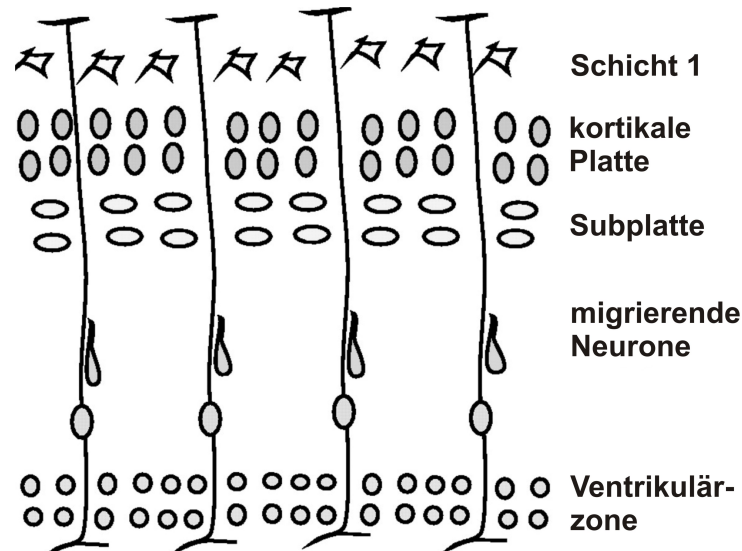
der Migration bildet sich zunächst der Fortsatz, der durch Mikrotubuli stabilisiert wird. Daraufhin bewegt sich das MTOC in den Fortsatz, dem schließlich der Zellkern folgt<sup>[269]</sup>.

Die gerichtete Migration von Zellen ist bei der Entwicklung des Nervensystems essentiell. Dies wird besonders am cerebralen Kortex deutlich. Er besteht aus sechs

Schichten, die sich während der Embryonalentwicklung ausbilden. Jede dieser Schichten zeichnet sich durch eine bestimmte Zusammensetzung aus verschiedenen Nervenzelltypen aus, die durch eine regulierte Migration der Neurone erreicht wird. Die Migration der Zellen erfolgt frei oder entlang von radialen Gliazellen. Ihre Fortsätze reichen radial aus der sogenannten Ventrikulärzone heraus und bilden den Wegweiser für die wandernden Neurone<sup>[223]</sup> (Abb. 1.7). Die radialen Gliazellen dienen auch als neuronale Vorläuferzellen<sup>[6,255]</sup>. Die ersten postmitotischen Neurone wandern aus und bilden die Präplatte, die sich später in die oben liegende Marginalplatte und die darunter liegende Subplatte unterteilt. Dabei bewegen sich die Zellen durch die sogenannte nukleäre oder somale Translokation, bei der sich ein Zellausläufer an die obere Schicht heftet, während der Zellkörper ihm in stetiger Bewegung folgt. Zwischen den so gebildeten Marginal- und Subplatten entstehen nach dem *inside-out*-Prinzip die weiteren Schichten, d. h. es entsteht zunächst Schicht VI, unter der sich dann die Schichten V-II ausbilden<sup>[173,224]</sup>. Aus der Marginalplatte wird später Schicht I. Dabei wird die nukleäre Translokation mit zunehmender Distanz der Schichten von der Ventrikulärzone durch die radiale Migration entlang der Gliazellen ersetzt.

### 1.2.3.1 Lis1, Dynein, Doublecortin und Nde1

Eine Vielzahl an Fehlbildungen des Gehirns gehen auf Migrationsdefekte während der Entwicklung zurück<sup>[63]</sup>. Solche *neuronal migration disorders* (NMDs) betreffen vorwiegend den Kortex, und viele von ihnen zählen zu den sogenannten Lissenzephalien. Lissenzephalien zeichnen sich durch eine verringerte Anzahl an Neuronen aus, die sich im für Lissenzephaliepatienten charakteristischen Fehlen der Faltungen des Kortex äußert (Agyrie oder Pachygyrie). Die gestörte Migration der Neurone führt zudem zu einer Fehlorganisation der kortikalen Schichten. Patienten zeigen vergrößerte Ventrikel, geistige Entwicklungsverzögerung und Epilepsie. Das Ausmaß



**Abbildung 1.7:** Aufbau des cerebralen Kortex (aus Hatten, 2002<sup>[112]</sup>): Zunächst entstehen die Marginalplatte (Schicht I) und die Subplatte. Die kortikale Platte teilt sich später in weitere Schichten auf.

der Symptome korreliert mit der Grad der fehlerhaften Laminierung des Kortex, wobei vier Subtypen unterschieden werden<sup>[64]</sup>.

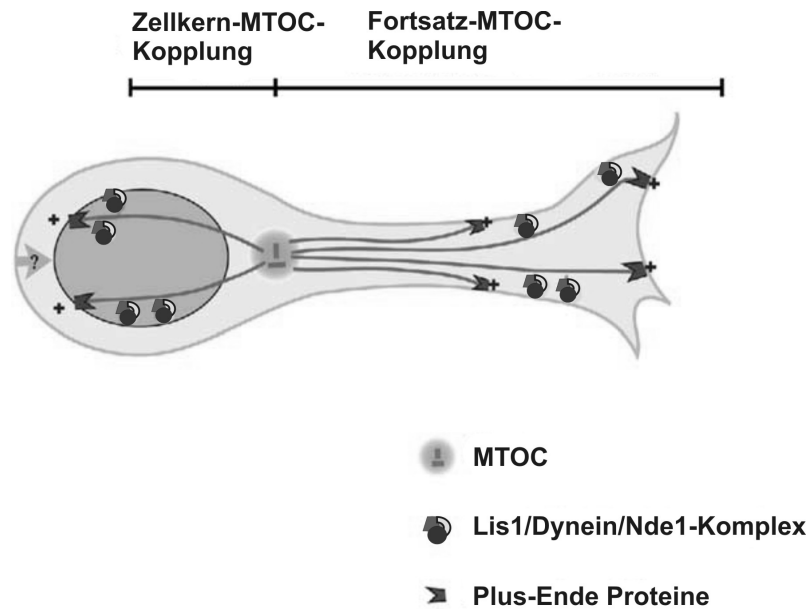
Lissenzephalie wird u. a. durch Mutationen im *Lis1*-Gen verursacht. Lis1 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, welches besonders stark im Gehirn exprimiert wird<sup>[62,234]</sup>. Es verfügt über sieben WD40-Domänen und eine LisH-Domäne. Die WD40-Domänen vermitteln Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, die LisH-Domäne dient der Dimerisierung von Lis1. *Lis1-knock-out* Mäuse sterben bereits kurz nach der Implantation, eine genetische Reduktion der Lis1-Expression führt zu Lissenzephalie-ähnlichen Phänotypen<sup>[121]</sup>. Lis1-siRNA-Experimente zeigen die essentielle Rolle von Lis1 bei der Kortikogenese, einschließlich der somalen Translokation und der Proliferation der Vorläuferzellen<sup>[252]</sup>. Dabei ist Lis1 vor allem in

## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum 31

die Bewegung der Zellkerns involviert. Die Neuritenlänge von Lis1<sup>+/-</sup>-Neuronen unterscheidet sich hingegen nicht von der wildtypischer Zellen<sup>[121]</sup>.

Lis1 bildet mit Dynein<sup>[77, 252, 265, 274]</sup>, einem Motorprotein, welches an Transportprozessen entlang von Mikrotubuli beteiligt ist, und weiteren Dynein-assoziierten Proteinen wie *Nuclear distribution protein nude-like 1* (Nde1) und *Nuclear distribution protein nude homolog 1* (Nde1) einen Komplex<sup>[78, 203, 252]</sup>. All diese Proteine sind an der Translokation des Zellkerns beteiligt. Bei der Zellmigration bewegt sich zunächst das MTOC in Richtung Fortsatz. Für die nachfolgende Bewegung des Zellkerns existieren zwei Modelle (Abb. 1.8). Nach Modell 1 ist der Dynein-Nde1-Lis1-Komplex an der Kernmembran verankert, und durch die Motoraktivität von Dynein in Richtung des Mikrotubuli-Minus-Endes wird der Zellkern in Richtung MTOC gezogen. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass Mutationen in Lis1, Dynein oder Nde1 zu einer Störung der Zellkern-MTOC-Kopplung führen<sup>[262, 277]</sup>. Das zweite Modell sieht den Dynein-Nde1-Lis1-Komplex in der Plasmamembran des Fortsatzes verankert, und die Motorbewegung führt zu einem Heranziehen des MTOC und nachfolgend des Zellkerns. Da Dynein sowohl in der Kernmembran als auch im Fortsatz nachgewiesen werden konnte, lassen sich die vorliegenden Beobachtungen durch beide Modelle erklären<sup>[35, 250]</sup>. Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner von Lis1 ist Doublecortin (DCX). Mutationen im *DCX*-Gen führen ebenfalls zu Lissenzephalie<sup>[97, 219]</sup>. DCX ist in viele Prozesse involviert, die auch durch Lis1 reguliert sind. Migrationsdefekte in heterozygoten Lis1 *knock-out* Neuronen oder durch Inhibition von Dynein können durch Überexpression von DCX wieder hergestellt werden. DCX ist vorwiegend an den perinukleären Mikrotubuli lokalisiert, und kommt als Teil des Lis1-Dynein-Komplexes vor<sup>[277]</sup>. Somit könnte es durch Stabilisierung der Mikrotubuli zur nukleären Translokation beitragen.

Neben den Mikrotubuli scheint Lis1 auch einen Einfluß auf das Aktinzytoskelett auszuüben. Kholmanskikh *et al.* konnten zeigen, dass bei für Lis1 heterozygoten *knock-*



**Abbildung 1.8:** Zwei mögliche Modelle zur Kerntranslokation: der Zellkern wird durch den Dynein-Nde1-Lis1-Komplex in Richtung MTOC gezogen, oder das MTOC wird zusammen mit dem Kern durch den im Fortsatz verankerten Dynein-Nde1-Lis1-Komplex in Vorwärtsrichtung bewegt.<sup>[288]</sup>

out Mäusen die Organisation des Aktinzytoskeletts defekt ist. Daher untersuchten sie die Aktivität der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA, wobei die Aktivität von Rac1 und Cdc42 verringert, während RhoA eine erhöhte Aktivität zeigte<sup>[143]</sup>. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Entwicklung des cerebralen Kortex in Cofilin-defizienten Mäusen. Bellenchi *et al.* entwickelten eine konditionale Cofilin-*knock-out*-Maus, bei der die Cofilin-Expression ab E 10,5 um etwa 95 % herabreguliert ist<sup>[16]</sup>. Diesen Mäusen fehlen u. a. einige Schichten des Kortex, ausgelöst durch eine verminderte radiale Migration während der Entwicklung. Außerdem waren Zellproliferation, Nukleokinese und das Neuritenwachstum gestört. Dieser Phänotyp erinnert stark an die Symptome von Lissenzephalie Patienten. Möglicherweise agieren



## 1.2 Regulation des Zytoskeletts bei Neuritogenese und Neuritenwachstum 33

---

Lis1 und Cofilin über einen gemeinsamen Signalweg, in den die Rho-GTPasen als Regulatoren involviert sind.

Eventuell ist Lis1 auch an der L1-abhängigen Neuritogenese beteiligt. Lis1 ist eines von mehreren Proteinen, dessen mRNA sich bei einer SAGE-Analyse (*serial analysis of gene expression*) von Hippocampi der sogenannten „GFAP-L1-Maus“ als hochreguliert herausstellte. Die GFAP-L1-Maus exprimiert L1 unter der Kontrolle des Promotors des für Astrozyten spezifischen *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und war ursprünglich generiert worden, um den Effekt von L1 auf die Regeneration von Nerven zu untersuchen. Die veränderte L1-Expression führt zu einem verbesserten räumlichen Lernvermögen und wirkt sich positiv auf das Neuritenwachstum aus<sup>[195,302]</sup>. Zudem konnte T. Schneegans im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Schachner, ZMNH, ein verringertes L1-abhängiges Neuritenwachstum bei Hippocampusneuronen, die mit mutiertem Lis1 transfiziert waren, zeigen<sup>[260]</sup>. Die hierbei verwendeten mutierten Formen von Lis1 unterbinden die Interaktion von Lis1 mit Nde1 und führen beim Menschen zu Lissenzephalie.

## 2 Ziele der Arbeit

Viele Prozesse, die bei der Entwicklung und Funktion des Nervensystems eine Rolle spielen, beruhen auf Änderungen der Zellmorphologie. Ausgelöst durch extrazelluläre Signale beginnen die Zellen mit der Umordnung ihrer zytoskelettalen Bestandteile. Dies ermöglicht z. B. die Migration und das Axonwachstum während der Entwicklung oder die Reorganisation synaptischer Kontakte bei Lernprozessen. Das Zelladhäsionsmolekül L1 spielt dabei eine wichtige Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die intrazelluläre Signalweiterleitung von L1, die die Regulation des Zytoskeletts beeinflusst, näher untersucht werden.

**Rho-GTPasen** Rho-GTPasen sind wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts. Unveröffentlichte Daten von S. Gensler und C. Dotti (Universität Leuven, pers. Mitteilung) deuten auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen L1 und den Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 hin. Die Interaktion der beiden Rho-GTPasen in Wachstumskegeln wurde durch Co-Immunpräzipitationen nachgewiesen. Ferner zeigen Immunfärbungen eine Co-Lokalisation an. Zudem wurde durch Hemmung zweier Rac1/Cdc42-Effektorkinasen das L1-vermittelte Neuritenwachstum und die L1-abhängige Polarisierung negativ beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit sollte daher analysiert werden, inwieweit die Aktivierung von L1 zu einer Aktivierung oder Inaktivierung der Rho-GTPasen führt.

Ein weiteres Ziel war es, die Rolle von RhoA beim L1-vermittelten Neuritenwachstum und der Neuritogenese zu klären.

**Cofilin** Die Bedeutung des direkt mit Aktin assoziierten Proteins Cofilin für das Neuritenwachstum wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt<sup>[2,74,161,184,289,307]</sup>. Cofilin ist ein ubiquitärer und essentieller Regulator des Aktinzytoskeletts und spielt daher auch bei Prozessen eine Rolle, in die L1 involviert ist. Eine mögliche funktionelle Interaktion von L1 und Cofilin ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob L1 das Zytoskelett durch die Aktivierung oder Inaktivierung von Cofilin beeinflusst.

**Lis1** Im Rahmen ihrer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Schachner, ZMNH, konnte T. Schneegans einen negativen Effekt von Mutationen im Mikrotubuli-assoziierten Protein Lis1 auf die L1-vermittelte Neuritogenese zeigen<sup>[260]</sup>. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, den zu Grunde liegenden molekularen Mechanismus zu entschlüsseln. Da eine Interaktion von L1 mit Lis1 durch Co-Immunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden konnte, sollten in diesem Zusammenhang die Proteine DCX und Nde1 als potentielle Adaptermoleküle analysiert werden. Auch sollte eine mögliche Beteiligung von RhoA untersucht werden.

**Neue L1-Interaktionspartner** Neben den oben genannten Proteinen sollte im Rahmen dieser Arbeit nach weiteren intrazellulären Bindungspartnern von L1 gesucht werden, die die Neuritogenese und das Neuritenwachstum beeinflussen.

## **3 Materialien und Methoden**

### **3.1 Materialien**

#### **3.1.1 Chemikalien**

Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel wurden von folgenden Herstellern in analysenreiner Qualität bezogen:

Merck, Darmstadt

Fluka, Buchs

Sigma-Aldrich, München

Carl Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

#### **3.1.2 Puffer und Lösungen**

Im folgenden werden allgemeine Puffer und Lösungen aufgelistet. Spezielle Puffer, Lösungen und Medien werden in den entsprechenden Kapiteln angegeben.

Homogenisierungspuffer	20,0 mM Tris/HCl
	150 mM NaCl
	1,00 mM MgCl <sub>2</sub>
	1,00 mM CaCl <sub>2</sub>

---

	Proteaseinhibitoren pH 7,4
Ripa-Puffer	50,0 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1,00 mM EDTA 1,00 % NP-40 Proteaseinhibitoren pH 7,4
PBS	150 mM NaCl 8,00 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,70 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,5
TBS	10,0 mM Tris/HCl 150 mM NaCl pH 7,5
TBST	10,0 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 pH 7,5
LB-Medium	10,0 g/L Bacto-Trypton 10,0 g/L NaCl 5,00 g/L Hefeextrakt pH 7,4
LB-Agar	20.0 g/L Agar in LB-Medium

### 3.1.3 Antikörper

#### 3.1.3.1 Verwendete Erstantikörper

anti-	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Caspase-3 (pc)	Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signaling Technologies, Danvers/USA
Cdc42 (mc)	Maus	1:250 WB	Pierce, Bonn
Cofilin (mc)	Maus	1:2.000 WB	BD Biosciences, Heidelberg
phospho-Cofilin (mc)	Kaninchen	1:1.000 WB	Cell Signaling Technologies, Danvers/USA
Doublecortin (pc)	Ziege	1:200 WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Dynein (pc)	Kaninchen	1:1.000 WB	Cell Signaling Technologies, Danvers/USA
eEF2 (pc)	Kaninchen	1:1.000 WB	Cell Signaling Technologies, Danvers/USA
Fc-HRP (pc)	Ziege	1:4.000 WB	Sigma-Aldrich, München
GAPDH (mc)	Kaninchen	1:1000 WB	Cell Signaling Technologies, Danvers/USA
GFAP (pc)	Kaninchen	1:500 IF	DakoCytomation, Glastrup/DK
GST (pc)	Ziege	1:4.000 WB	GE Healthcare, Freiburg
His (pc)	Kaninchen	1:1.000 WB	Cell Signaling Technologies, Danvers/USA
L1 (pc)	Kaninchen	1:5000 WB	PINEDA, Berlin
L1 555 (mc)	Ratte	1:15.000 WB	eigene Produktion
L1 557 (mc)	Ratte	50 $\mu$ g/mL Stim.	eigene Produktion
L1 izd (mc)	Maus	1:2.000 WB	Covance, Princeton/USA
LIMK1 (mc)	Maus	1:1.000 WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
phospho-LIMK1 (pc)	Kaninchen	1:1.000 WB	Cell Signaling Technologies, Danvers/USA
Lis1 (pc)	Ziege	1:1.000 WB	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Nde1 (pc)	Kaninchen	1:2.000 WB	überlassen von C.A. Walsh, Boston/USA
Rac1 (mc)	Maus	1:1.000 WB	Pierce, Bonn
RhoA (mc)	Maus	1:500 WB	Pierce, Bonn
$\alpha$ -Tubulin (mc)	Maus	1:1.000 WB, IF	Sigma-Aldrich, München
$\beta$ -III-Tubulin (pc)	Kaninchen	1:5.000 WB	Covance, Princeton/USA

pc: polyklonal, mc: monoklonal, WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz, Stim.: Stimulation

#### 3.1.3.2 Verwendete Sekundärantikörper

Alle HRP-konjugierten Sekundärantikörper wurden von Jackson ImmunoResearch, Suffolk/UK, bezogen und in 10.000- oder 20.000-facher Verdünnung eingesetzt. Für die Immunfluoreszenz wurde als Sekundärantikörper ein anti-Kaninchen-Antikörper

verwendet, der mit Cy2 als Fluorophor konjugiert war (1:200, Jackson ImmunoResearch, Suffolk/UK).

### 3.1.4 Inhibitorische Peptide

	Sequenz	target
S3	Biotin-(EACA)MASGVAVSDGVIKVFNYGRKKRRQRRR-OH	LIMK1
pS3	Biotin-(EACA)MA(pS)GVAVSDGVIKVFNYGRKKRRQRRR-OH	SSH
revS3	Biotin-(EACA)NFVKIVGDSVAVGSAMYGRKKRRQRRR-OH	-

Alle Peptide wurden von Schafer-N, Kopenhagen/DK, in mindestens 80 %iger Reinheit bezogen.

### 3.1.5 Inhibitoren

	target	Konz.	Hersteller
Complete <sup>TM</sup>	Proteasen	1x	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	alkalische und Serin/Threonin-protein Phosphatasen	1x	Sigma-Aldrich, München
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2	saure, alkalische und Tyrosin-protein Phosphatasen	1x	Sigma-Aldrich, München
Cyclosporin A	Calcineurin	20 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, München
Y-27632	ROCK	10 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, München

### 3.1.6 Molekulargewichtstandards

Precision Plus Protein <sup>TM</sup> Standard Dual Color	Bio-Rad, Hercules/USA
Spectra <sup>TM</sup> Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB, Frankfurt a. M.

## 3.1.7 Proteine

BSA	Sigma-Aldrich, München
Insulin	Sigma-Aldrich, München
DNase I	Sigma-Aldrich, München
Trypsin	Sigma-Aldrich, München
PLL	Sigma-Aldrich, München
Transferrin	Calbiochem, Darmstadt
GST-PAK1-CRIB	Pierce, Bonn
GST-Rhotekin-RBD	Pierce, Bonn
<i>ImmunoPure Immobilized Protein A</i>	Pierce, Bonn
<i>ImmunoPure Immobilized Protein G</i>	Pierce, Bonn
Protein G PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Protein A PLUS-Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
MagnaBind Streptavidin	Thermo Fisher, Waltham/USA
<i>BioMag Streptavidin Particles</i>	Polysciences, Eppelheim
Papain	Sigma-Aldrich, München
Normalserum (Ziege)	Jackson ImmunoResearch, Suffolk/UK
IgG aus Rattenserum	Sigma-Aldrich, München
IgG aus Kaninchenserum	Sigma-Aldrich, München
IgG aus Mausserum	Sigma-Aldrich, München

## 3.1.8 Kits

EZ-Detect <sup>TM</sup> Rac1 Activation Kit	Pierce, Bonn
EZ-Detect <sup>TM</sup> Cdc42 Activation Kit	Pierce, Bonn
EZ-Detect <sup>TM</sup> RhoA Activation Kit	Pierce, Bonn
<i>MicroBC Assay: protein quantification kit</i>	Uptima
Plasmid Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
<i>Small Cell Number Nucleofector Kit</i>	amaxa, Köln



### 3.1.9 Transfektionsreagenzien

FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
MATra-A Reagent	IBA Biotagnology, Göttingen

### 3.1.10 Zelllinien

N2a	Maus Neuroblastom-Zelllinie, etabliert aus einem spontanen Tumor eines Albino A-Mäusestammes <sup>[209]</sup> .
CHO-K1	<i>Chinese hamster ovary</i> , Dehydrofolat-reduktase-defiziente Hamsterzelllinie, etabliert aus einer Ovarienbiopsie <sup>[270]</sup> .
555/557-Hybridoma	Hybridomazellen aus Ratte, die die monoklonalen L1-Antikörper 555 bzw. 557 produzieren <sup>[7]</sup> .

### 3.1.11 Materialien für die Zellkultur

fötales Kälberserum	PAA, Cölbe
fötales Kälberserum ( <i>Ultra low IgG</i> )	PAA, Cölbe
Pferdeserum	PAA, Cölbe
Penicillin (10.000 Units/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAA, Cölbe
<i>non essential amino acids</i> (100 x)	PAA, Cölbe
Glutamat/Aspartat (100 x)	Sigma-Aldrich, München
Nucleoside (50 x)	Sigma-Aldrich, München
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe
GMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Hybridomed	Invitrogen, Karlsruhe
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
BME	Invitrogen, Karlsruhe
Neurobasal A	Invitrogen, Karlsruhe
B27 supplement	Invitrogen, Karlsruhe

Sämtliche Kunststoffmaterialien wurden von Greiner (Frickenhäusen), Sarstedt (Nümbrecht) und BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

### 3.1.12 Plasmide

	Beschreibung	Hersteller
pcDNA3	euk. Expressionsvektor	Invitrogen, Karlsruhe
pLIS1-WT	euk. Expressionsvektor für humanes LIS1 in pcDNA3	überlassen von C.A. Walsh, Boston/USA
pLIS1-H149R	punktmutierter LIS1-Expressionsvektor aus pLIS1-WT in pcDNA3	überlassen von C.A. Walsh, Boston/USA
pLIS1-S169P	punktmutierter LIS1-Expressionsvektor aus pLIS1-WT in pcDNA3	überlassen von C.A. Walsh, Boston/USA
pEGFP	euk. Expressionsvektor für <i>enhanced green fluorescent protein</i> (eGFP)	Clontech, Saint-Germain-en-Laye/F
GST-Cofilin-1	prok. Expressionsvektor für murines Cofilin1 als GST-Fusionsprotein in pGEX2T	überlassen von I. Bach, Worcester/USA
L1	euk. Expressionsvektor für murines LI in pcDNA3	M. Schachner
His-L1izd/cfi	prok. Expressionsvektor für die intrazelluläre Domäne von L1 mit 6fach His-Markierung in pQE30	M. Schachner
His-NCAM140izd	prok. Expressionsvektor für die intrazelluläre Domäne von NCAM140 mit 6fach His-Markierung in pQE30	M. Schachner
GST-PAK1-CRIB	prok. Expressionsvektor für die CRIB-Domäne von PAK1 als GST-Fusionsprotein in pGEX2T	überlassen von A. Hall, New York/USA
GST-Rhotekin-RBD	prok. Expressionsvektor für die RBD-Domäne von Rhotekin als GST-Fusionsprotein in pGEX2T	überlassen von A. Hall, New York/USA

prok.: prokaryotisch, euk.: eukaryotisch

3.1.13 *e.coli*-Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
M15[pREP4] <sup>TM</sup>	NaI <sup>S</sup> , Str <sup>S</sup> , Rif <sup>S</sup> , Lac <sup>-</sup> , Ara <sup>-</sup> , Gal <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , RecA <sup>+</sup> , Uvr <sup>+</sup> , Lon <sup>+</sup>	Qiagen, Hilden
BL21(DE3) <sup>TM</sup>	B F- dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ(DE3)	Stratagene, La Jolla/USA
BL21(DE3)pLysS <sup>TM</sup>	B F- dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ(DE3) [pLysS Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene, La Jolla/USA
DH5α <sup>TM</sup>	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) phoA supE44 λ <sup>-</sup> thi <sup>-</sup> 1 gyrA96 relA1	Invitrogen, Karlsruhe

## 3.1.14 Mauslinien

- C57BL/6J Die Inzuchtlinie C57BL wurde 1921 von C.C. Little generiert<sup>[169]</sup>. Die Nummer 57 bezieht sich auf die Nummer des Muttertiers, das von Little zur Herstellung der Linie eingesetzt wurde. BL steht für *black*, da aus der ersten Verpaarung nur die schwarzen Tiere zur Entwicklung der Linie verwendet wurden.
- MK5 L1-defiziente Mauslinie, bei der die Expression von L1 durch das Einfügen eines Tetracyclin-kontrollierten Transaktivators in Exon 2 des *L1*-Gens verhindert wird (M. Kutsche und M. Schachner, unveröffentlichte Daten). Die heterozygoten Weibchen (Inzuchtlinie 129/Sv) werden mit männlichen Cr:NMRI-Tieren (Auszuchtlinie) verpaart und die L1-negativen Nachkommen (L1<sup>-/y</sup>) für die Versuche eingesetzt. Als Kontrolle dienen die wildtypischen Geschwister (L1<sup>+/+</sup> (Weibchen) bzw. L1<sup>+/y</sup> (Männchen)).

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Kultivierung von Säugetierzellen

Zelllinie	Medium
N2a	Optimem 5,00 % FCS 100 U/ml Penicillin/0,10 mg/ml Streptomycin
CHO-K1	GMEM 10,0 % FCS 4,00 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/0,10 mg/ml Streptomycin
Hybridoma	RPMI 1640 10,0 % FCS 4,00 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin/0,10 mg/ml Streptomycin

Die Zellen wurden in entsprechendem Medium (siehe unten) in 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 37 °C kultiviert. Es wurden Zellkulturflaschen mit 75 und 175 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche verwendet (Sarstedt). Die Dichte der Zellsuspension wurde bei etwa 1·10<sup>6</sup> Zellen/mL gehalten.

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zugabe von DMSO verhindert eine Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zellen. Zum Einfrieren wurden die Zellen geerntet und in 800 µL vorgekühltem Einfriermedium (Wachstumsmedium, 10,0 % DMSO) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 2 min bei 200×g zentrifugiert und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurde das Cryoröhrchen

mit den Zellen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Unmittelbar nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in 8,00 mL auf 37 °C vorgewärmtes Medium überführt, zentrifugiert und mit ebenfalls auf 37 °C vorgewärmtem HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in eine Kulturflasche mit vorgewärmtem Medium gegeben und im Brutschrank kultiviert.

### 3.2.1.2 Transfektion von Säugerzellen

***Magnet-assisted Transfection*** Bei der *Magnet-assisted Transfection* wird die DNS mit Hilfe von magnetischen Partikeln in die Zelle eingeschleust. Die dabei verwendeten magnetischen Nanopartikel, deren Eisenoxidkern mit einem Polyelektrolyt beschichtet ist, binden die DNS zunächst über elektrostatische Wechselwirkungen und werden dann auf die Zellkultur gegeben. Mit Hilfe eines Magneten werden die DNS-behafteten Partikel auf die Zellmembran gezogen und endozytotisch aufgenommen. Nach der Transfektion tauchen die Nanopartikel sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma auf. Ihre Hülle wird in ein bis drei Tagen, der Eisenkern in zwei bis drei Wochen intrazellulär abgebaut.

Vor der Transfektion wurden die Zellen in 6fach-Vertiefungsplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 30-60 % kultiviert. Pro Vertiefung wurden 3,00 µg DNS in 200 µL Medium (ohne Zusätze) mit 3,00 µL MATra-Reagenz (IBA Biotagnology, Göttingen) versetzt und zur Komplexbildung 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Zellkulturüberstand durch 2,00 mL frisches Medium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die DNS-Lösung ins Medium gegeben und gemischt. Die Zellkulturplatte wurde auf einen Magneten platziert und 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet.

**Lipofektion** Alternativ zur *Magnet-assisted Transfection* wurden die Zellen mit Hilfe der Lipofektion transfiziert. Bei dieser Methode wird die DNS mit Hilfe von kationischen Lipidvesikeln in die Zelle geschleust.

Hier wurde FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet, welches im Gegensatz zu anderen Lipofektionsreagenzien eine Transfektion in Gegenwart von Serum ermöglicht. Dazu wurden die Zellen in 6fach-Vertiefungsplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 50-80 % kultiviert. Vor der Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Pro Ansatz wurden 1-2  $\mu\text{g}$  DNS und das FuGENE 6-Reagenz im Verhältnis 1:3, 2:3 und 1:6 eingesetzt. Das Transfektionsreagenz wurde in 100  $\mu\text{L}$  Medium (ohne Zusätze) gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNS zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde das DNS/FuGENE 6-Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben.

### 3.2.1.3 Beschichtung von Deckgläschen und Zellkulturplatten

Die Deckgläschen wurden für 30 min mit 12,0 %iger HCl gereinigt. Anschließend wurden sie zweimal 10 min mit sterilem ddH<sub>2</sub>O und zweimal 15 min mit Ethanol gewaschen. Die Deckgläschen wurden einzeln auf Alufolie ausgelegt und unter der Reinraumbank getrocknet. Nach dem Trocknen wurden sie über Nacht bei 4 °C mit einer 0,025 %igen Poly-L-Lysin-Lösung (PLL) inkubiert. Die Zellkulturplatten wurden direkt mit der PLL-Lösung inkubiert. Überschüssiges PLL wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit sterilem ddH<sub>2</sub>O entfernt. Die Deckgläschen/Zellkulturplatten wurden erneut auf Alufolie ausgelegt und unter der Reinraumbank getrocknet. Die Lagerung erfolgte steril bei 4 °C. Vor Gebrauch wurden die beschichteten Deckgläschen/Zellkulturplatten 15 min mit UV-Strahlung sterilisiert. Die Beschichtung mit L1-Fc (50,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in PBS) erfolgte über Nacht bei

4 °C.

### 3.2.1.4 Primärkultur von Hippocampusneuronen

#### Dissektionslösung

---

Neurobasal A mit	1x B27 <i>supplement</i>
	1x GlutaMAX
	5,00 µg/mL Gentamycin

#### Kulturmedium

---

Neurobasal A mit	1x B27 <i>supplement</i>
	1x GlutaMAX

Dissoziierte Neurone wurden durch eine Kombination enzymatischer (Papain/DNase) und mechanischer Dissoziation aus den Kleinhirnen von postnatalen Wildtyp-Mäusen gewonnen. Zunächst wurde der Kopf der Maus abgetrennt, der Schädel geöffnet und das Gehirn entnommen. Das Kleinhirn wurde entfernt und die Gehirnhälften getrennt. Unter einem Binokular wurden die Hippocampi herauspräpariert und in ca. 1 mm dicke Stücke geschnitten. Die Stücke wurden in ein 15 mL-Röhrchen mit Dissektionslösung überführt und einmal mit Dissektionslösung gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe einige Minuten bei 30 °C erwärmt. Zum enzymatischen Verdau wurden die Hippocampi in 12,0 mg Papain (Sigma-Aldrich, München, 10,0 U/mg, gelöst in 6,00 mL warmem Neurobasal A-Medium) 8-15 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit vorgewärmten HBSS gewaschen und das Gewebe in 2,00 mL HBSS mit 3,00 mg DNase I aufgenommen. Die Hippocampi wurden nun mit Hilfe dreier Pasteurpipetten unterschiedlicher Durchmesser zerkleinert und die Zellen schließlich vereinzelt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen 10 min bei 80×g und 4 °C abzentri-

fugiert. Das Zellpellet wurde vorsichtig in Kulturmedium oder Transfektionspuffer resuspendiert. Für Neuritenwachstumsexperimente wurden die Neurone auf beschichtete Deckgläschen oder Kulturplatten in einer Dichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/mL ausgesät. Für Transfektionen wurden  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Ansatz verwendet.

### 3.2.1.5 Transfektion von Hippocampusneuronen

Eine Methode zur Transfektion von Säugerzellen ist die Elektroporation. Die Zellmembran wird hierbei durch Anlegen eines elektrischen Feldes kurzzeitig durchlässig gemacht. Durch die so entstehenden Membranporen kann die DNS in die Zelle gelangen. Bei der Nukleofektion sorgt ein spezieller Nukleofektionspuffer dafür, dass die DNS vom Zytoplasma in den Zellkern gelangt. Dadurch können auch Zellen transfiziert werden, die sich nicht mehr teilen, wie z. B. primäre Neurone.

Hier wurde die Transfektion der Neurone mit dem *Small Cell Number* Nukleofektionskit von amaxa, Köln, durchgeführt. Es wurden pro Transfektionsansatz  $1 \cdot 10^5$  Zellen vorsichtig in Nukleofektionslösung resuspendiert. Anschließend wurden  $0,40 \mu\text{g}$  DNS zugegeben und der Ansatz in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde nach Herstellerangaben mit dem Nukleofektorgerät (amaxa, Köln) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in  $0,50 \text{ mL}$  im Brutschrank vorinkubiertem RPMI-Medium mit  $10,0 \%$  FCS aufgenommen und ausplattiert. Nach etwa vier Stunden wurde das RPMI vorsichtig durch Kulturmedium ersetzt. Nach  $24 \text{ h}$  wurden die Zellen mit  $4,00 \%$  PFA in PBS fixiert und die Zellen am Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, München) abfotografiert. Die Neuritenlängen bzw. die Zahl der Neurone mit Neuriten wurde mit Hilfe der ImageJ Software (NIH, USA) ermittelt. Dabei wurden nur eGFP-positive Zellen gemessen, die keinen Kontakt zu anderen Zellen hatten.



### 3.2.1.6 Primärkultur von Kleinhirnneuronen

#### X-1 Medium

---

BME mit	4,00 mM L-Glutamin
	100 U/ml Penicillin/0,10 mg/ml Streptomycin
	0,10 % BSA
	10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin
	4,00 nM L-Thyroxin
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Transferrin, holo
	0,027 TIU/mL Aprotinin
	30,0 nM Na-Selenit
	1x Na-Pyruvat

Dissoziierte Neurone wurden durch eine Kombination enzymatischer (Trypsin/DNase) und mechanischer Dissoziation aus den Kleinhirnen von sechs bis acht Tage alten Wildtyp-Mäusen gewonnen. Zu diesem Zweck wurde der Kopf der Maus abgetrennt, der Schädel geöffnet und das Gehirn entnommen. Die Kleinhirne wurden mit Hilfe einer gebogenen Pinzette vom Resthirn abgetrennt. Die präparierten Kleinhirne wurden zunächst von Blutgefäßen, Fremdgewebe und Membranen gesäubert und in kleine Stücke zerteilt. Diese wurden unter der Reinraumwerkbank mit HBSS gewaschen und 15 min bei RT mit einem Trypsin/DNase-Gemisch inkubiert. Anschließend wurden die Stücke erneut mit HBSS gewaschen und in DNase-haltigem HBSS aufgenommen. Das Gewebe wurde nun mit Hilfe dreier Pasteurpipetten unterschiedlicher Durchmesser zerkleinert und die Zellen schließlich vereinzelt. Nach 10minütigem Abzentrifugieren bei  $100\times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Zellen in warmem X-1 Medium resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Für Neuritenwachstumsexperimente wurden die Neurone auf beschichte-

te Deckgläschen oder Kulturplatten in einer Dichte von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/mL ausgesät, für Stimulationsexperimente wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL ausgesät. Nach 24 h in Kultur wurden die Zellen entweder fixiert, stimuliert, oder für biochemische Untersuchungen lysiert.

### 3.2.1.7 Stimulation von Kleinhirnneuronen mit Antikörpern

Zur Stimulation von Kleinhirnneuronen wurden diese zu je  $1 \cdot 10^6$  Zellen/mL in PLL-beschichteten Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Zur Stimulation wurde der L1-Antikörper (557) oder IgG aus Ratte auf  $50 \mu\text{g/mL}$  in vorgewärmtem X-1-Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 min im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen einmal mit kaltem X-1 gewaschen und mit Ripa-Puffer lysiert. Das Lysat wurde 12 min bei  $20.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration wurde per BCA-Test ermittelt (siehe 3.2.3.6) und Proben mit gleichem Proteingehalt für die SDS-PAGE präpariert (siehe 3.2.3.3). Das Lysat wurde bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.1.8 Neuritogenese- und Neuritenwachstumsexperimente mit Kleinhirnneuronen

Zur besseren Erkennung der Neuriten wurden die Zellen mit Toluidinblau (1,00 %) und Methylenblau (1,00 %) in 1,00 % Natriumborat angefärbt. Dazu wurden sie zunächst etwa 30 min mit 4,00 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 30 min in der Färbelösung inkubiert. Die gefärbten Neurone wurden weitere dreimal mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Analyse des Neuritenwachstums und der Neuritogenese der Zellen erfolgte an einem konfokalen Mikroskop (Kontron, Zeiss, München) mit Hilfe der Software des Herstellers. Es wurden nur Zellen gemessen, die keinen Kontakt zu anderen Zellen

hatten. Für die Auswertung der Neuritogenese wurden nur Neuriten berücksichtigt, die mindestens die Länge des Zelldurchmessers hatten.

### 3.2.1.9 Produktion von Fc-markierten Proteinen im eukaryotischen Expressionssystem

#### Produktionsmedium

---

GMEM mit	2,00 % FCS ( <i>Ultra low IgG</i> )
	4,00 mM L-Glutamin
	100 U/ml Penicillin/0,10 mg/ml Streptomycin

Zur Produktion von mL1-Fc und mChL1-Fc wurden stabil mit den entsprechenden Expressionvektoren transfizierte CHO-Zellen<sup>[44]</sup> aufgetaut und in entsprechendem Medium kultiviert (siehe 3.2.1.1). Bei Konfluenz wurde ein Teil der Zellen in Produktionsmedium überführt. Alle 4-5 Tage wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und durch frisches Produktionsmedium ersetzt. Der Überstand wurde per Westernblot (siehe 3.2.3.5) auf die Produktion des Fc-Fusionsproteins überprüft und vorübergehend bei -20 °C gelagert.

War ausreichend Überstand gesammelt (etwa 6 L), wurde dieser steril filtriert und auf ein Volumen von ca. 1 L eingengt (Amicon Ultra 100.000 MWCO, Millipore, Schwalbach/Ts.). Durch Zugabe von 0,01 % NaN<sub>3</sub> und Proteaseinhibitoren (*Complete*<sup>™</sup>, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde einem Bakterienbefall oder proteolytischem Abbau des Proteins vorgebeugt.

**Affinitätschromatographie**

Puffer:

Waschpuffer 1	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1,00 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer 2	25,0 mM Tris/HCl pH 6,8
Elutionspuffer	0,10 M Glycin pH 2,3
Neutralisierungspuffer	1,00 M Tris/HCl pH 8,0

Die Isolierung des Proteins erfolgte per Affinitätschromatographie. Zu diesem Zweck wurden 2-4 mL Protein A-Sepharose (*ImmunoPure Immobilized Protein A*, Pierce, Bonn) in eine Chromatographiesäule gegeben und mit PBS gewaschen. Der aufkonzentrierte Überstand wurde für 4-5 Tage zirkulierend über die Säule gegeben (0,15 mL/min). Anschließend wurde mit Waschpuffer 1 und 2 gewaschen (jeweils 25,0 mL, 0,30 mL/min). Die Elution erfolgte durch Zugabe von Elutionspuffer (5,00 mL, 0,15 mL/min). Die Eluate wurden umgehend mit 1,00 M Tris/HCl (pH 8,0) neutralisiert. Anschließend wurden die Eluate bei 4 °C in PBS umgepuffert und auf ein Volumen von 200-300  $\mu$ L eingengt (Amicon Ultra 100.000 MWCO, Millipore, Schwalbach/Ts.). Die Proteine wurden per SDS-Gelelektrophorese, Coomassie-Färbung und Westernblot (siehe 3.2.3.3, 3.2.3.4 und 3.2.3.5) auf ihre Reinheit überprüft und die Konzentration per BCA-Test (siehe 3.2.3.6) bestimmt. Die Lage-

rung erfolgte bei -80 °C.

### 3.2.1.10 Produktion von monoklonalen Antikörpern in Hybridomazellen

#### Produktionsmedium

---

Hybridomed mit	100 U/ml Penicillin/0,1 mg/ml Streptomycin
----------------	--

---

Die Produktion der monoklonalen L1-Antikörper 555 und 557 verläuft ähnlich der in Kapitel 3.2.1.9 beschriebenen Aufreinigung von Fc-Fusionsproteinen. Dazu wurden die entsprechenden Hybridomaklone<sup>[7]</sup> aufgetaut und in entsprechendem Medium kultiviert (siehe 3.2.1.1). Bei Konfluenz wurde ein Teil der Zellen in Produktionsmedium überführt. Alle 4-5 Tage wurde die Zellsuspension 2 min bei 950 rpm sedimentiert und der Zellkulturüberstand abgenommen. Die Zellen wurden in frischem Produktionsmedium resuspendiert und weiter kultiviert. Der Überstand wurde per Westernblot (siehe 3.2.3.5) auf die Produktion der Antikörper überprüft und vorübergehend bei -20 °C gelagert.

Schließlich wurde der Überstand steril filtriert und auf ein Volumen von ca. 1 L eingengt (Amicon Ultra 100.000 MWCO, Millipore, Schwalbach/Ts.). Die Isolierung der Antikörper erfolgte mit Hilfe von Protein G-Sepharose (*ImmunoPure Immobilized Protein G*, Pierce, Bonn). Der aufkonzentrierte Überstand wurde für 4-5 Tage zirkulierend über die Säule gegeben (0,15 mL/min). Anschließend wurde wie in 3.2.1.9 gewaschen und eluiert. Die Eluate wurden bei 4 °C in PBS umgepuffert und auf ein Volumen von 200-300 µL eingengt (Amicon Ultra 100.000 MWCO, Millipore, Schwalbach/Ts.). Die Antikörper wurden per SDS-Gelelektrophorese, Coomassie-Färbung und Western-Blot (siehe 3.2.3.3, 3.2.3.4 und 3.2.3.5) auf ihre Reinheit überprüft und die Konzentration per BCA-Test (siehe 3.2.3.6) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### 3.2.1.11 Oberflächenbiotinylierung

Puffer:

PBS <sup>2+</sup>	PBS mit
	0,50 mM CaCl <sub>2</sub>
	2,00 mM MgCl <sub>2</sub>

Die Oberflächenbiotinylierung ist eine Methode, mit der der Anteil eines Proteins, der sich in der Plasmamembran befindet, im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge bestimmt werden kann. Veränderungen der Oberflächenlokalisierung eines Proteins deuten auf Veränderungen der Endo- und Exozytose, des Proteinrecyclings und der Proteinprozessierung hin. Bei der Oberflächenbiotinylierung werden die Oberflächenproteine zunächst mit Biotin markiert. Nach der anschließenden Lyse der Zellen können die markierten Proteine mit Hilfe von immobilisiertem Streptavidin aus dem Proteingemisch isoliert werden.

Die Präparation von Kleinhirnneuronen erfolgte wie oben beschrieben. Für die Biotinylierung wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen/Vertiefung in 6fach-Vertiefungsplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit  $10,0 \mu\text{M}$  Y-27632 versetzt. Nach 1.5 h wurden die Zellen 1 h lang mit 557 stimuliert (vgl. 3.2.1.7). Nach Beendigung der Stimulation wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS<sup>2+</sup> gewaschen. Anschließend wurde EZ-Link<sup>®</sup> NHS-LC-Biotin (Pierce, Bonn; 0,50 mg/mL) in PBS<sup>2+</sup> auf die Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Zum Blockieren freier NHS-Gruppen wurden die Zellen nach der Biotinylierung 5 min mit 20,0 mM Glycin in PBS<sup>2+</sup> auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS<sup>2+</sup> wurden die Zellen 30 min auf Eis mit 150  $\mu\text{L}$  Ripa-Puffer lysiert, bei  $700 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Vom Überstand wurden 100  $\mu\text{L}$  mit 50,0  $\mu\text{L}$  Streptavidin-gekoppelten magnetischen Kügelchen (*BioMag Streptavidin Particles*,

Polysciences, Eppelheim) versetzt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen mit Hilfe eines Magneten dreimal mit Ripa-Puffer gewaschen und zur Elution mit 50,0  $\mu$ L 5x Probenpuffer aufgekocht. Zum Vergleich wurden vom Zelllysate jeweils 40,0  $\mu$ L mit 10,0  $\mu$ L 5x Probenpuffer aufgekocht. Die Proben wurden per SDS-PAGE und Western-Blot (siehe 3.2.3.3 und 3.2.3.5) auf ihren Gehalt an L1 analysiert.

### 3.2.1.12 Immunfluoreszenz

Puffer und Lösungen:

Normalserum (Ziege)	5,00 % (v/v) Normalserum (Ziege) 0,20 % Triton X-100 in PBS
Carrageenan	0,50 % $\lambda$ -Carrageenan in PBS

Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und mit 4 % PFA in PBS für 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurde zwei Mal mit kaltem PBS gewaschen. Zum Öffnen der Zellmembran wurden die Zellen 10 min bei RT mit 0,1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Daraufhin wurde mit Normalserum aus Ziege 30 min bei RT blockiert. Der Erstantikörper wurde in Carrageenan verdünnt und nach dem Blockieren auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde drei Mal mit kaltem PBS gewaschen und der Sekundärantikörper (1:200 in Carrageenan) für 1 h bei RT zugegeben. Es wurde erneut drei Mal mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen mit Fluoromount G auf Objektträgern eingebettet.

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Transformation von Bakterien<sup>[251]</sup>

Zur Transformation der *E.coli*-Stämme BL21(DE3)<sup>TM</sup>, M15<sup>TM</sup> und DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> wurden 100  $\mu$ L einer Suspension der chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNS (10-100 ng) versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min, 42 °C) und anschließender Abkühlung (2 min, Eisbad) wurden 800  $\mu$ L LB-Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert (1 min, 3.000 $\times$ g, RT), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100  $\mu$ L LB-Medium resuspendiert, auf LB-Platten (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

#### 3.2.2.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNS

Zur Isolierung großer Mengen DNS wurde das Plasmid Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei wurden 250 ml mit Antibiotika versetztes LB-Medium mit 4,00 ml einer Übernachtskultur angeimpft und über Nacht geschüttelt (220 rpm, 37 °C). Die Bakterien wurden abzentrifugiert (6.000 $\times$ g, 15 min, 4 °C) und alkalisch lysiert. Die DNS wurde mittels Anionenaustauschchromatographie aus dem Lysat isoliert und durch Waschen mit einem Puffer mittleren Salzgehaltes von RNA, Proteinen und anderen Verunreinigungen gereinigt. Die Elution der DNS erfolgte mit Hilfe eines Hochsalzpuffers. Durch nachfolgende Präzipitation mit Isopropanol wurde die DNS aufkonzentriert und entsalzt. Die Konzentration wurde per UV-Spektrometrie ermittelt.



### 3.2.2.3 Reinigung von Plasmid-DNS mit Phenol-Chloroform

Puffer:

TE-Puffer	10,0 mM Tris/HCl
	1,00 mM EDTA
	pH 8,0

Die aus der Plasmidpräparation gewonnene DNS wurde nach Sambrook (1989) gereinigt<sup>[251]</sup>. Die Methode basiert auf einer Extraktion der DNS mit einem Phenol-Chloroform Gemisch, wobei eventuelle Proteinverunreinigungen präzipitiert werden und so von der DNS abgetrennt werden können.

Zu diesem Zweck wurde die in TE-Puffer vorliegende DNS mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform Gemisches (1:1) versetzt, geschüttelt und 5 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Phenol und Chloroform denaturieren dabei die anwesenden Proteine, die ausfallen und sich in der Interphase zwischen oberer wässriger und unterer organischer Phase ansammeln. Die DNS bleibt in der wässrigen Phase. Die organische Phase wurde mit TE-Puffer versetzt und erneut mit Phenol-Chloroform extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen Chloroform versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min bei 14.000 rpm) wurde die wässrige Phase in ein frisches Probengefäß überführt. An die Extraktion fügt sich nun eine alkoholische Fällung der DNS an, um eventuell vorhandene Reste von Phenol und Chloroform zu entfernen und die DNS aufzukonzentrieren. Dafür wurden zur wässrigen Phase 1/10 Volumen 3,00 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen eiskalter Ethanol gegeben und das Gemisch 30 min auf Eis inkubiert. Die dabei präzipitierte DNS wurde anschließend 15 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die DNS in eiskaltem 70 %igen Ethanol aufgenommen. Die DNS wurde erneut abzentrifugiert

und noch zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Zum Schluss wurde die DNS bei RT getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

### 3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.3.1 Produktion von His-markierten Proteinen im prokaryotischen Expressionssystem

Puffer:

Lysispuffer	0,30 M NaCl 50,0 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10,0 mM Imidazol pH 8,0
Waschpuffer	0,30 M NaCl 50,0 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20,0 mM Imidazol pH 8,0
Elutionspuffer	0,30 M NaCl 50,0 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 250 mM Imidazol pH 8,0

Eine gängige Methode zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine ist die *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC). Zu diesem Zweck werden die Proteine C- oder N-terminal mit einer 6-fach His-Markierung versehen und mit Hilfe von immobilisierten Ni<sup>2+</sup>-Ionen aufgereinigt. Hier wurde Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qia-gen, Hilden) verwendet, wobei die Nickelionen vierfach durch Nitrilotriessigsäure

(NTA) chelatiert wurden, welche an Agarose gekoppelt vorliegt. Die zwei freien Bindestellen des sechsfach koordinierten Nickelions können durch die Histidine der His-Markierung am Protein besetzt werden. Zur Verringerung unspezifischer Bindungen und zur Elution wurde Imidazol eingesetzt, welches ebenfalls an  $\text{Ni}^{2+}$  bindet.

Zur Expression der His-markierten intrazellulären Domänen von L1 und NCAM140 wurden zunächst kompetente *E. coli* Bakterien (M15<sup>TM</sup> und BL21<sup>TM</sup>) mit den entsprechenden Vektoren transformiert und auf LB/Kan-Platten bzw. LB/Kan-Amp-Platten über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden mehrere 10,0 mL-Vorkulturen mit einzelnen Kolonien der transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in 200 mL LB/Kan-Medium bzw. LB/Kan-Amp-Medium verdünnt und etwa 2 h bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD(600) von 0,6 wurde die Proteinexpression mit 1,00 mM IPTG induziert und die Kulturen wurden weitere 4 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Beendigung der Induktion wurden die Bakterien 20 min bei 6.000×g abzentrifugiert und das Pellet in 20,0 mL Lysispuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden anschließend mechanisch in der sogenannten *French Press* aufgeschlossen (Spectronic Instruments/SLM Amico, 10.000 psi, drei Zyklen). Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden 20 min bei 14.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Zum Überstand wurden 5,00 mL  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) gegeben und etwa 2 h bei 4 °C geschüttelt. Die Agarose wurde für 1 min bei 900 rpm und 4 °C sedimentiert und viermal mit Waschpuffer gewaschen (je 30 min, 4 °C). Die Elution der Proteine erfolgt durch Zugabe von jeweils 5,00 mL Elutionspuffer (dreimal 15 min, 4 °C). Die Eluate wurden vereinigt, bei 4 °C in PBS umgepuffert und auf ein Volumen von 500  $\mu\text{L}$  eingengt (Amicon Ultra 5.000 MWCO, Millipore, Schwalbach/Ts.). Die Proteine wurden per SDS-Gelelektrophorese, Coomassie-Färbung und Western-Blot (siehe 3.2.3.3, 3.2.3.4 und 3.2.3.5) auf ihre Reinheit überprüft und die Konzentration per BCA-Test (siehe 3.2.3.6) bestimmt. Die Lage-

nung erfolgte bei -80 °C.

### 3.2.3.2 Produktion von GST-markierten Proteinen im prokaryotischen Expressionssystem

Puffer:

Lysispuffer	3,00 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 47,0 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,40 M NaCl 0,10 M KCl 10,0 mM Imidazol 10,0 % Glycerin 0,50 % Triton X-100 Proteaseinhibitor pH 7,8
Waschpuffer	PBS 1,00 % Triton X-100 1,00 mM DTT
Elutionspuffer	50,0 mM Tris/HCl 20,0 mM reduziertes Glutathion pH 8,0

Eine weitere Methode zur Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine beruht auf der Affinität des Enzyms Glutathion-S-Transferase (GST) zu Glutathion (GSH). Zu diesem Zweck werden die Proteine C- oder N-terminal als GST-Fusionsprotein exprimiert und mit Hilfe von immobilisiertem GSH aufgereinigt. Die Expression der GST-Fusionsproteine (GST-Cofilin-1, GST-PAK1-CRIB, GST-Rho-

tekin-RBD) erfolgte ähnlich wie in 3.2.3.1 zur Aufreinigung von His-markierten Proteinen beschrieben. Kompetente *E.coli* Bakterien (BL21<sup>TM</sup>) wurden transformiert und auf LB-Platten mit den Resistenzen der Vektoren entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden Vorkulturen angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien in 200 mL antibiotikahaltigem LB-Medium verdünnt und bei einer OD(600) von 0,6 mit IPTG versetzt (Endkonzentration 1,0 mM). Nach Beendigung der Induktion wurden die Bakterien abzentrifugiert und das Pellet in 10,0 mL Lysispuffer (GST) resuspendiert. Die Bakterien wurden anschließend mechanisch in der *French Press* aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert und der klare Überstand abgenommen. Zum Überstand wurden 3,00 mL GSH-Agarose (Sigma-Aldrich, München) gegeben und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Die Agarose wurde für 5 min bei 500×g und 4 °C sedimentiert und dreimal mit Waschpuffer (GST) gewaschen (je 30 min, 4 °C). Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von jeweils 10,0 mL Elutionspuffer (GST) (3x 15 min, 4 °C). Die Eluate wurden vereinigt, bei 4 °C in PBS umgepuffert und auf ein Volumen von 500 µL eingeeengt (Amicon Ultra 5.000 MWCO, Millipore, Schwalbach/Ts.). Das Protein wurde mittels SDS-Gelelektrophorese, Coomassie-Färbung und Western-Blot auf seine Reinheit überprüft (siehe 3.2.3.3, 3.2.3.4 und 3.2.3.5) und die Konzentration per BCA-Test (siehe 3.2.3.6) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 3.2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Puffer:

Probenpuffer	62,5 mM Tris/HCl 10,0 % (w/v) Glycerin 2,00 % (w/v) SDS 5,00 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau pH 6,8
Elektrophorese-Puffer	192 mM Glycin 25,0 mM Tris 0,10 % (w/v) SDS pH 8,3
Sammelgel-Puffer	1,00 M Tris/HCl pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,00 M Tris/HCl pH 8,8

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich Proteinmischungen nach Ladung und Größe trennen. Bei der SDS-Gelelektrophorese wird den Proben SDS zugesetzt, welches die Struktur der Proteine aufbricht. Es lagert sich an die Aminosäuren, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen negative Ladung der Masse des Proteins proportional ist. Bei der reduzierenden SDS-PAGE werden vorhandene Disulfidbrücken durch Zugabe von reduzierenden Substanzen, wie z. B. Mercaptoethanol, zerstört. Die Proteine werden somit nur noch anhand der Größe aufgetrennt. Als Träger wird ein Gel aus polymerisiertem Acrylamid (AA) eingesetzt.

Die Porengröße des Gels kann durch Zugabe von quervernetzenden Substanzen (z. B. *N,N'*-Methylenbisacrylamid, BIS) variiert werden. Eine verbesserte Trennung wird mit der sogenannten DISC-Gelelektrophorese erreicht. Hierbei wird ein diskontinuierliches System verwendet, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich in pH-Wert und Porengröße. Im (oberen) Sammelgel werden die Substanzen zunächst in dünnen Scheiben (*discs*) aufkonzentriert. Im darauffolgenden Trenngel erfolgt dann die eigentliche Trennung.

Es wurde das von U.K. Laemmli entwickelte System zur SDS-PAGE eingesetzt<sup>[156]</sup>. Hierbei wurde ein SDS-haltiges Tris-HCl/Tris-Glycin Puffersystem verwendet:

Trenngel	6 %	8 %	10 %	12 %	16 %
ddH <sub>2</sub> O	6,64 mL	5,58 mL	4,50 mL	3,44 mL	1,12 mL
30 % AA/BIS (29:1)	3,20 mL	4,28 mL	5,34 mL	6,40 mL	8,52 mL
Trenngelpuffer	6,00 mL	6,00 mL	6,00 mL	6,00 mL	6,00 mL
SDS (10 %)	0,16 mL	0,16 mL	0,16 mL	0,16 mL	0,16 mL
APS (10 %)	32,0 $\mu$ L	32,0 $\mu$ L	32,0 $\mu$ L	32,0 $\mu$ L	32,0 $\mu$ L
TEMED	16,0 $\mu$ L	16,0 $\mu$ L	16,0 $\mu$ L	16,0 $\mu$ L	16,0 $\mu$ L
Sammelgel	4 %				
ddH <sub>2</sub> O	4,20 mL				
30 % AA/BIS (29:1)	1,00 mL				
Sammelgelpuffer	0,76 mL				
SDS (10 %)	0,08 mL				
APS (10 %)	30,0 $\mu$ L				
TEMED	12,0 $\mu$ L				

Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten gegossen (etwa 4/5 des Volumens). Nach dessen Polymerisation wurde das Sammelgel darüber gegeben und zur Aufteilung der Taschen ein Kamm eingesteckt. Für die Elektrophorese wurde das Gel in die Gelkammer eingespannt und diese mit Elektrophorese-Puffer befüllt. Als

Molekulargewichtstandard diene ein Gemisch aus Proteinen bekannter Größe. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Elektrophorese wurde zunächst 15 min bei 60 V, dann 45-60 min bei 120-150 V durchgeführt.

### 3.2.3.4 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

#### Coomassie-Färbung

Lösungen:

Fixierer	1,00 mL <i>ortho</i> -Phosphorsäure
	20,0 mL Methanol
	auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O

Eine Methode zur Visualisierung der Protein im SDS-Gel ist die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue. Ihre Empfindlichkeit liegt bei etwa 100 ng Protein pro Bande<sup>[231]</sup>.

Bevor die Proteinbanden angefärbt werden, müssen sie im Gel fixiert werden. Dabei werden die Proteine im Gel ausgefällt. Zu diesem Zweck wurde das Gel 60 min in Fixierlösung geschüttelt und anschließend mehrmals mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für ca. 2 h (oder über Nacht) in der Coomassie-Färbelösung (Roti-Blue, Carl Roth, Karlsruhe) inkubiert und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O solange entfärbt, bis die Banden die gewünschte Intensität besitzen.

Eine Variante der Coomassie-Färbung ist die kolloidale Coomassie-Färbung nach Molloy *et al.*, die gegenüber der herkömmlichen Methode eine höhere Empfindlichkeit aufweist (25,0 ng Protein/Bande)<sup>[196]</sup>.



**Silberfärbung**

Lösungen:

Fixierer	1,00 mL <i>ortho</i> -Phosphorsäure 20,0 mL Methanol auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O
Entwickler	3,00 g K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 12,5 µL Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5 ddH <sub>2</sub> O (10 % Stammlösung) 30,0 µL Formaldehyd (37 %ig) auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O
Silbernitrat-Lösung	0,20 g AgNO <sub>3</sub> auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O
Sensibilisierungslösung	0,30 g K <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> 4,92 g Kaliumacetat 30,0 mL Ethanol auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O
Stop-Lösung	4,00 g Tris 2,00 mL Essigsäure auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O

Eine weitere Möglichkeit, die Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen, ist die Färbung durch Reduktion von Silberionen. Hierbei bilden Silber(I)-Ionen mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine Komplexe. Einige Ionen werden durch die Peptidbindungen und die funktionellen Gruppen der Aminosäuren zu Silberkeimen reduziert. Wird nun ein stärkeres Reduktionsmittel hinzugegeben, erfolgt überall im Gel die Reduktion der Ionen zu metallischem Silber, jedoch an den schon vorhandenen Sil-

berkeimen am schnellsten. Daher färben sich zunächst die Proteinbanden und erst nach längerer Reduktionszeit der Rest des Gels. Die Färbung kann durch eine starke Änderung des pH-Wertes gestoppt werden, meist mit Hilfe von verdünnter Essigsäure oder Glycinlösung. Die Silberfärbung ist sehr empfindlich. Nach einem Protokoll von Heukeshoven und Dernick können auch noch 50 bis 100 pg Protein pro Bande nachgewiesen werden<sup>[118]</sup>.

Zur Färbung wurde das fixierte Gel zunächst 45 min in Sensibilisierungslösung geschwenkt. Anschließend wurde es sechsmal je 10 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Daraufhin wurde das Gel 1 bis 2 h in der Silbernitratlösung inkubiert. Nach einem sehr kurzen Waschschrift mit ddH<sub>2</sub>O (max. 15 s) erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden durch Schwenken des Gels in der Entwicklungslösung. Es wurde solange entwickelt, bis die Banden eine ausreichende Farbintensität besaßen. Zum Beenden der Reaktion wurde das Gel in die Stop-Lösung überführt.

### 3.2.3.5 Western-Blotting

Puffer:

Blotting-Puffer	25,0 mM Tris/HCl
	192 mM Glycin
	20,0 % (v/v) Methanol

Die Western-Blotting-Methode dient dem Nachweis bestimmter Proteine in einem Gemisch<sup>[34,286]</sup>. Beim Western-Blotting werden die Proteine aus den Banden eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Sind die Proteine immobilisiert, können sie z. B. durch Reaktion mit einem entsprechenden, enzymgekoppelten Antikörper spezifisch nachgewiesen werden.

Zunächst wurden der Gelgröße entsprechende Stücke Nitrocellulose (NC) und Blottingpapier mit Blotting-Puffer getränkt. Das Gel wurde in einer Blottingkammer zwischen dem Blottingpapier auf die Cellulose gelegt. Durch Anlegen einer Spannung wandern die Proteine aus dem Gel an die entsprechenden Positionen auf der Nitrocellulose (40 min, 16 V). Zur Absättigung der Membran wurde diese anschließend 30 min in einer 5 %igen Milchpulver-Lösung in TBST geschüttelt. Nach dreimaligem, jeweils 5 minütigem Waschen mit TBST wurde der Erstantikörper auf den Blot gegeben und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Anschließend wurde wieder dreimal 5 min gewaschen und die Membran 1 h mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-markierten Zweitantikörper inkubiert. Daraufhin wurde wieder mit TBST gewaschen (dreimal 5 min). Die Visualisierung erfolgte durch Chemolumineszenz. Dazu wurden die im Verhältnis 1:1 gemischten Chemolumineszenzlösungen (*Super Signal West Dura Extended Duration Substrate*, Pierce, Bonn) auf die Membran gegeben und für ca. 1 min inkubiert. Die spezifischen Proteinbanden wurden in der Dunkelkammer mit Hilfe eines Röntgenfilms (Kodak BioMax Light Film, Sigma-Aldrich, München) detektiert.

### 3.2.3.6 Proteinkonzentrationsbestimmung per BCA-Test

Die Konzentration eines Proteins in Lösung lässt sich mit Hilfe von Kupfer-Ionen und 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure (BCA) bestimmen<sup>[266]</sup>. In alkalischer Lösung werden Cu(II)-Ionen durch die Proteine komplexiert (Biuret-Reaktion) und zu Cu(I) reduziert. Die Cu(I)-Ionen reagieren mit BCA zu einem violett gefärbten Komplex, wodurch eine spektrometrische Detektion ermöglicht wird. Der Test ist sehr empfindlich und resistent gegenüber Detergenzien wie Triton X-100.

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde das *MicroBC Assay: protein quantification kit* (Uptima, Montlucon/F) verwendet. In eine Microtiterplatte (Mi-

croWell, Nunc) wurden ein BSA-Standard (2.000-20,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und die in PBS verdünnten Proteinproben aufgetragen, 1 h bei 37 °C mit dem BCA-Reagenz inkubiert und die Absorption bei 560 nm gemessen ( $\mu\text{Quant}$ , BIO-TEK, Bad Friedrichshall).

### 3.2.3.7 Herstellung von Maushirnhomogenat

Zunächst wurde eine Maus entweder durch Scherenschlag (P0-P5) oder durch Vergasung mit  $\text{CO}_2$  (ab P6) getötet. Die Schädeldecke wurde geöffnet und das Gehirn entnommen. Je nach Größe wurde es in 1,00-2,00 ml Homogenisierungspuffer auf Eis in einem Glashomogenisator homogenisiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und Zellkerne 15 min bei 1.000 $\times$ g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die Proteinkonzentration per BCA-Test bestimmt und das Homogenat bei -80 °C gelagert.

### 3.2.3.8 Fraktionierung von Hirngewebe der Maus

**Herstellung der zytosolischen Fraktion und Gesamtmembranfraktion** Zunächst wurde eine Maus entweder durch Scherenschlag (P0-P5) oder durch Vergasung mit  $\text{CO}_2$  (ab P6) getötet. Die Schädeldecke wurde geöffnet und das Gehirn entnommen. Je nach Größe wurde es in 1,00-2,00 ml Homogenisierungspuffer auf Eis in einem Glashomogenisator homogenisiert. Anschließend wurden Zelltrümmer und Zellkerne 15 min bei 1.000  $\times$ g und 4 °C abzentrifugiert. Zur Abtrennung der zytosolischen Proteine wurde der Überstand 1 h bei 100.000 $\times$ g und 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand (zytosolische Fraktion) wurde abgenommen und bei -80 °C gelagert. Das Pellet, welches u.a. Mitochondrien, Plasmamembranen und Endosomen enthält, wurde in Homogenisierungspuffer mit 1 % Triton X-100 resuspendiert und zur Solubilisierung der Membranproteine über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächs-

ten Tag wurde erneut 1 h bei  $100.000\times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ultrazentrifugiert. Der Überstand (Gesamtmembranfraktion) wurde bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Anreicherung von Wachstumskegeln aus Maushirn

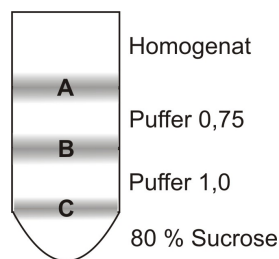
Puffer:

Homogenisierungspuffer	5,00 mM Tris/HCl 1,00 mM $\text{MgCl}_2$ 1,00 mM $\text{CaCl}_2$ 0,32 M Sucrose Proteaseinhibitoren pH 7,4
Puffer 1,0	2,50 mM Tris/HCl 1,00 mM $\text{MgCl}_2$ 1,00 mM $\text{CaCl}_2$ 1,00 M Sucrose pH 7,4
Puffer 0,75	2,50 mM Tris/HCl 1,00 mM $\text{MgCl}_2$ 1,00 mM $\text{CaCl}_2$ 0,75 M Sucrose pH 7,4

Durch Ultrazentrifugation über einen Sucrosegradienten lassen sich Wachstumskegel aus dem Hirnhomogenat von Mäusen anreichern<sup>[72,217]</sup>. Zu diesem Zweck wurden 15 Maushirne (P0-P2) zunächst in 10,0 mL kaltem Homogenisierungspuffer in einem Glaspotter homogenisiert und anschließend 15 min bei  $1.660\times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert. Im Überstand finden sich verschiedenen Zellorganellen, z. B. Mit-

ochondrien, zytosolische Proteine und Membranbestandteile. Das Pellet besteht zum Großteil aus Zellkörpern ohne Neuriten und Zellkernen. Der Überstand wurde nun auf einen Gradienten, bestehend aus 80 %iger Sucroselösung, Puffer 1 mit 1,00 M Sucrose und Puffer 0,75 mit 0,75 M Sucrose, aufgetragen (Abb. 3.1). Nach 40minütiger Ultrazentrifugation bei  $240.000\times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  können an den Phasenübergängen die unterschiedlichen Fraktionen abgenommen wurden.

Fraktion A enthält membrangebundene Fragmente von  $0,3\text{-}1,5\text{ }\mu\text{m}$  Durchmesser,



**Abbildung 3.1:** Sucrosegradient zur Anreicherung von Wachstumskegeln aus Maushirn.

Microfilamente, Mitochondrien, Vesikel, Lysosomen und lösliche Proteine. Fraktion B enthält Golgi-Apparat und Zellfragmente, Fraktion C Mitochondrien, Mikrotubuli und Vesikel. Fraktion A wurde gesammelt und bei  $39.800\times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 40 min ultrazentrifugiert. Das Pellet, welches aus Wachstumskegelpartikeln besteht, wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3.9 Stimulation von Wachstumskegeln aus Maushirn

Puffer:

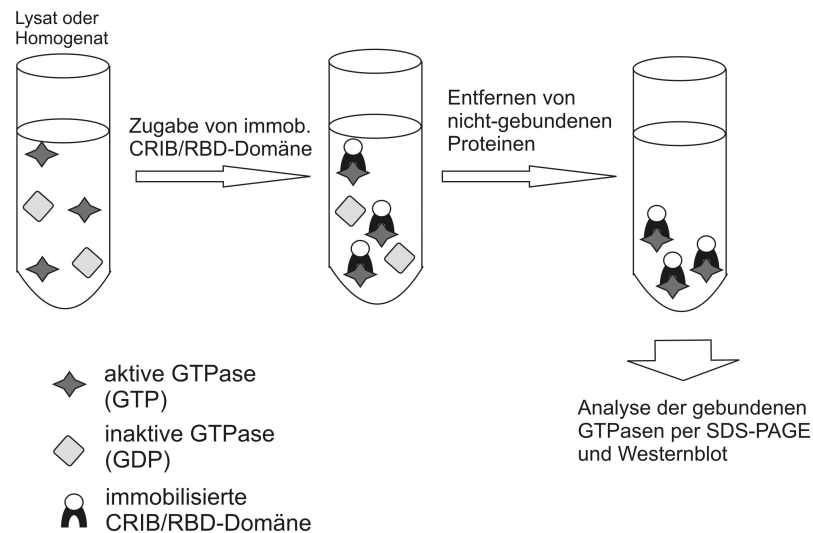
Stimulationspuffer	44,0 mM HEPES
	200 mM NaCl
	2,40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

10,0 mM KCl  
2,40 mM MgCl<sub>2</sub>  
20,0 mM Glucose  
100 mM Sucrose  
Proteaseinhibitoren  
pH 7,3

Die Wachstumskegel aus den Gehirnen von drei postnatalen Mäusen wurden wie oben beschrieben präpariert. Das Pellet des zweiten Ultrazentrifugationsschrittes wurde in Stimulationspuffer resuspendiert. Jeweils 60  $\mu$ L der Suspension wurden mit 4,00  $\mu$ g monoklonalem L1-Antikörper (557) oder der gleichen Menge IgG aus Ratte versetzt und für 2 min bei 37 °C stimuliert. Nach der Stimulation wurde die Suspension kurz auf Eis abgekühlt, mit Probenpuffer versetzt und aufgekocht.

### 3.2.3.10 Rho-GTPase Aktivitätstest

Zur Bestimmung der Aktivität der kleinen Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA wurden die *EZ-Detect<sup>TM</sup> Activation Kits* nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip der Aktivitätsbestimmung beruht auf einem *pull-down* der aktiven Form von Rac1, Cdc42 und RhoA mit Hilfe von PAK1 und Rhotekin, zweier Effektoren der Rho-GTPasen. PAK1 bindet mit seiner sogenannten CRIB-Domäne (*Cdc42/Rac-interactive binding*) nur aktives, GTP-gebundenes Rac1 und Cdc42 (Abb. 3.2). Rhotekin bindet mit der *Rho binding domain* (RBD) an aktives RhoA. Durch die Expression als GST-Fusionsprotein können die CRIB- und die RBD-Domäne die mit Hilfe von Glutathionagarose immobilisiert werden. Die immobilisierten Domänen wurden mit dem zu untersuchenden Maushirnomogenat (P7-P9) oder Zelllysat 1 h bei 4 °C inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Homogenate/Lysate mit 10,0 mM EDTA und 0,10 mM GTP $\gamma$ S bzw. 1,00 mM GDP versetzt und 30 min bei 30 °C geschüttelt. Erst



**Abbildung 3.2:** Bestimmung der relativen Aktivität von Rho-GTPasen im Zellysate oder Hirnhomogenat.

dann erfolgte die Zugabe der CRIB- bzw. RBD-Domäne. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Agarose gewaschen und die gebundenen Proteine durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95 °C eluiert. Die Proben wurden auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend per Western-Blot mit Antikörpern gegen RhoA, Rac1 und Cdc42 analysiert. Die Proteinbanden wurden densitometrisch ausgewertet (Tina-Software Version 2.09, Raytest, Straubenhardt), wobei das Signal der aktiven Rho-GTPase ins Verhältnis zur Gesamtmenge der Rho-GTPase im Homogenat gesetzt wurde.

### 3.2.3.11 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine sehr spezifische Methode der Proteinreinigung, die auf den hochselektiven Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ihren



Liganden basiert. Diese Liganden sind bei der Affinitätschromatographie z. B. monoklonale Antikörper oder Rezeptorproteine, die über einen Linker an die Matrix der Chromatographiesäule gebunden sind.

### Vorbereitung der Chromatographie-Säule

Puffer:

Kupplungspuffer (CNBr)	0,10 M NaHCO <sub>3</sub> 0,50 M NaCl pH 8,3
Blockierungspuffer	0,20 M Glycin 0,50 M NaCl pH 8,0
Puffer A	0,10 M Natriumacetat 0,50 M NaCl pH 4,0
Säulen-Lagerungspuffer	150 mM NaCl 8,00 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,70 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,10 % NaN <sub>3</sub> pH 7,5

Das verwendete Säulenmaterial (CNBr-activated Sepharose 4B, GE Healthcare, Freiburg) wurde dreimal je 15 min bei 4 °C mit 1,00 mM HCl gewaschen. Die zuvor in *E.coli* exprimierten und aufgereinigten Proteine wurden in je 20 mL Kupplungspuffer aufgenommen und bei 4 °C über Nacht mit der Sepharose inkubiert. Anschlie-

ßend wurde die Matrix luftblasenfrei in eine Chromatographiesäule gegeben und mit Kupplungspuffer gewaschen (10,0 mL, 0,30 mL/min). Im nächsten Schritt wurden eventuell verbliebene aktivierte Gruppen der Matrix blockiert. Zu diesem Zweck wurde Blockierungspuffer über Nacht über die Säule gegeben (0,30 mL/min). Anschließend wurde das Säulenmaterial dreimal abwechselnd mit Puffer A und Kupplungspuffer gewaschen. Falls die Säule nicht direkt im Anschluss verwendet wurde, wurde sie mit etwa 3 mL Säulen-Lagerungspuffer gespült und verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### Affinitätschromatographie

Puffer:

Elutionspuffer	0,10 M Glycin pH 2,3
Neutralisierungspuffer	1,00 M Tris/HCl pH 8,0

Die Säule wurde zunächst bei 4 °C mit etwa 10,0 mL Homogenisierungs-Puffer gewaschen (0,30 mL/min), Anschließend wurde eine 1:1-Verdünnung der Mausehirnfraktion auf die Säule aufgetragen (0,10 mL/min) und über Nacht zirkuliert. Anschließend wurde erneut mit Homogenisierungs-Puffer gewaschen (10,0 mL, 0,30 mL/min). Die Elution erfolgte durch Reduktion des pH-Wertes mit 0,10 M Glycin, pH 2,3, wobei die Eluate sofort mit 1,00 M Tris pH 8 neutralisiert wurden. Die Eluate wurden bei 4 °C in PBS umgepuffert und auf ein Volumen von 50,0 µL eingengt (Amicon Ultra 5.000 MWCO, Millipore, Schwalbach/Ts.). Anschließend wurden sie mit Probenpuffer versetzt und die enthaltenen Proteine mittels eines

8-16 %igem SDS-Polyacrylamid-Gradientengels aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mit kolloidalem Coomassie angefärbt, ausgeschnitten und mit Hilfe eines Electrospray-QTOF-Tandem-Massenspektrometers (QTOF II, Micromass; Analyse durch Dr. Friedrich Buck, UKE Hamburg) analysiert.

### 3.2.3.12 Co-Immunpräzipitation

Eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen ist die Co-Immunpräzipitation. Hierbei wird ein spezifischer Antikörper gegen das Protein von Interesse zu einem Zelllysat oder Gewebehomogenat gegeben. Der Antikörper, an den das Protein und dessen Bindungspartner binden, wird mit Hilfe von Protein A- oder G-Agarosekügelchen aus dem Gemisch isoliert.

Zur Reduktion von unspezifischen Bindungen wurde vor der Co-Immunpräzipitation ein sogenanntes *preclearing* durchgeführt. Dafür wurden dem Maushirnhomogenat oder der Maushirnfraction pro Ansatz 50,0  $\mu$ l Protein G- oder A-Agarose zugegeben und 1 h bei 4 °C inkubiert. Für die Immunpräzipitation wurde die Agarose abzentrifugiert und der Überstand mit den entsprechenden Antikörpern oder Kontrollseren bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden 40,0  $\mu$ l Protein G- oder A-Agarose zugegeben und weitere 60 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Homogenisierungspuffer und weitere dreimal mit PBS gewaschen. Die Proteine wurden durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95 °C eluiert und per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

### 3.2.3.13 *pull-down*

Der sogenannte *pull-down* ist eine weitere Methode zur *in vitro*-Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei wurden entweder His- oder GST-markierte

Proteine eingesetzt, die zuvor rekombinant exprimiert und aufgereinigt wurden. Für einen Ansatz wurden bis zu 2,00 mg Gesamtprotein eingesetzt (Maushirnhomogenat oder Hirnfraktionen). Der Ansatz wurde mit Homogenisierungspuffer auf 1.00 mL aufgefüllt und ein *preclearing*-Schritt durchgeführt (siehe Co-Immunpräzipitation). Anschließend wurde der Überstand in einem frischen Gefäß mit dem His- oder GST-markierten Protein versetzt (5-20 mg) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten entweder äquimolare Mengen an anderen His- oder GST-markierten Proteinen oder ein Ansatz ohne Proteinzugabe. Am nächsten Tag wurden 40,0 µL Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) oder GSH-Agarose (Sigma-Aldrich, München) zum Ansatz gegeben und weitere 4 h bei 4 °C inkubiert. Durch kurze Zentrifugation wurde die Agarose sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proteine durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95 °C eluiert und per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

#### 3.2.3.14 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Puffer:

TBS <sup>2+</sup>	TBS mit 0,50 mM CaCl <sub>2</sub> 2,00 mM MgCl <sub>2</sub>
TBST <sup>2+</sup>	TBST mit 0,50 mM CaCl <sub>2</sub> 2,00 mM MgCl <sub>2</sub>

Der *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ist ein immunologisches Nachweis-

verfahren für Protein-Protein-Wechselwirkungen<sup>[75]</sup>. Ein Protein von Interesse wird zunächst immobilisiert und anschließend ein zweites zugegeben. Bindet das zweite Protein an das immobilisierte, lässt es sich durch spezifische Antikörper nachweisen. Eine nachfolgende enzymatische Farbreaktion, die mit der Menge des gebundenen Antikörpers korreliert, erlaubt die Quantifizierung der beobachteten Proteininteraktion.

Die Beschichtung der 96-fach Vertiefungsplatten (Nunc-Immuno Module, VWR) mit GST-Cofilin erfolgte über Nacht bei 4 °C (5,00 µg/mL, 50,0 µL pro Vertiefung). Anschließend wurde 1 h bei RT mit 3,00 % BSA/TBS<sup>2+</sup> blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST<sup>2+</sup> für jeweils 2 min wurden 50,0 µL der L1izd oder NCAM140izd als Kontrolle, gelöst in 3,00 % BSA/TBS<sup>2+</sup> (50,0-200 µg/mL), hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei RT auf einem Schüttler. Im Anschluss daran wurde dreimal mit TBST<sup>2+</sup> gewaschen und jeweils 50,0 µL des primären Antikörpers (1:1.000 in 3,00 % BSA/TBS<sup>2+</sup>) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei RT wurde erneut gewaschen und 50 µL des sekundären Antikörpers (1:1.000 in 3 % BSA/TBS<sup>2+</sup>) hinzugefügt. Anschließend wurde dreimal 2 min mit TBST<sup>2+</sup> und einmal 2 min mit TBS<sup>2+</sup> gewaschen. Die Visualisierung der Bindung erfolgte mit Hilfe von ABTS, welches nach Reaktion mit HRP als stabiles, grün gefärbtes Radikalkation vorliegt. Nach 5-10 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 405 nm gemessen (µQuant, BIO-TEK, Bad Friedrichshall).

### 3.2.3.15 Proteinvernetzung mit Sulfo-SBED

Zum *in vitro* Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen lassen sich die Interaktionspartner mit Hilfe von *crosslinking*-Reagenzien kovalent verknüpfen und nachweisen. In diesem Fall wurde Sulfo-SBED verwendet. Dieser trifunktionale *crosslinker* verfügt über eine NHS-Aktivestergruppe, eine photoreaktive Gruppe und eine

Biotinmarkierung. Ein Köderprotein wird über den NHS-Ester kovalent mit dem *crosslinker* verknüpft und mit dem potentiellen Bindungspartner inkubiert. Durch UV-Strahlung wird die photoreaktive Phenylazidgruppe mit dem Bindungspartner verknüpft. Später kann durch Reduktion einer Disulfidbindung des Sulfo-SBEDs die Biotinmarkierung auf den Bindungspartner übertragen und das Köderprotein vom Komplex getrennt werden. So kann der Bindungspartner über immobilisiertes Streptavidin isoliert und per Western-Blot analysiert werden.

100  $\mu\text{g}$  der rekombinant exprimierten intrazellulären Domänen von L1 und NCAM140 wurden mit 2-fachem molarem Überschuss von Sulfo-SBED (gelöst in DMSO) für 30 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Zum Entfernen von überschüssigem Sulfo-SBED wurden ZebaSpin Columns<sup>TM</sup> (Pierce, Bonn) nach Herstellerangaben verwendet. Die L1- bzw. NCAM-Sulfo-SBED-Komplexe wurden mit unterschiedlichen Maushirnfractionen (1,00 mg Gesamtprotein) oder rekombinantem GST-Cofilin1 (100  $\mu\text{g}$ ) über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze für 15 min UV-Strahlung von 365 nm ausgesetzt (Eisbad). Durch Zugabe von 50,0 mM DTT wurde anschließend die Disulfidbindung gespalten. Es wurden 30  $\mu\text{L}$  magnetische Streptavidin-Kügelchen (*MagnaBind Streptavidin*, Thermo Fisher, Waltham) zugegeben und 30 min bei RT inkubiert. Die Kügelchen wurden mit Hilfe eines Magneten dreimal mit PBS gewaschen und die Proteine mit SDS-Probenpuffer eluiert. Die Eluate wurden per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 L1 und Lis1

#### 4.1.1 Einfluss von Lis1 auf die L1-vermittelte Neuritogenese

Die mRNA des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Lis1 ist im Hippocampus transgener Mäuse, die das Zelladhäsionsmolekül L1 ektopisch in Astrozyten exprimieren, in 7-fach größerer Menge vorhanden als in entsprechenden wildtypischen Tieren (siehe Abschnitt 1.2.3.1). In ihrer Doktorarbeit in der AG Schachner, ZMNH, untersuchte T. Schneegans daraufhin eine potentielle Wechselwirkung zwischen L1 und Lis1. Sie konnte eine signifikante Reduktion der L1-abhängigen Neuritogenese bei Hippocampusneuronen beobachten, die mit mutierten Lis1-Konstrukten transfiziert waren<sup>[260]</sup>. Diese dominant negativen Lis1-Konstrukte LIS H149R und LIS S169P („Lis1H“ und „Lis1S“) enthalten Punktmutationen in einer der für Protein-Protein-Interaktionen wichtigen WD40-Domänen von Lis1 und führen dort zu einem Aminosäureaustausch. Die Mutationen wurden ursprünglich im Genom von an Lissenzephalie erkrankten Patienten identifiziert.

Kholmanskikh *et al.* beobachteten in für Lis1 heterozygoten *knock-out*-Mäusen einen reduzierten Anteil an filamentösem Aktin in Neuronen und eine gestörte Zellmigration. In Kleinhirnneuronen der Lis1-defizienten Tiere wurde auch eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Aktivität der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA festgestellt. Die die Aktin-Polymerisation stimulierenden GTPasen Rac1 und Cdc42 zeigten in für Lis1 heterozygoten *knock-out*-Tieren eine geringere Aktivität, wohingegen die

Aktivität von RhoA erhöht war. Die Hemmung von RhoA mit Hilfe von Y-27632, einem Inhibitor der RhoA nachgeschalteten Kinase p160ROCK, führte zu einer Normalisierung der Aktin-Polymerisation und der Zellmigration<sup>[144]</sup>.

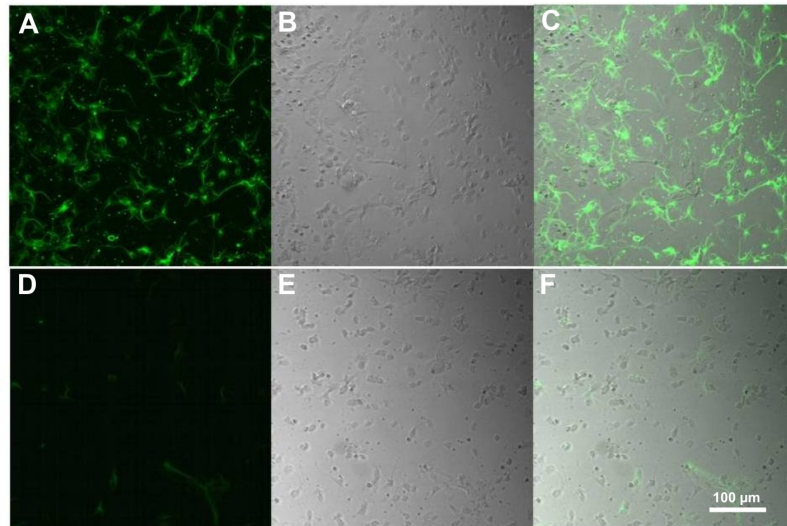
Ob Lis1 auch die L1-abhängige Neuritogenese über Rho-GTPasen beeinflusst, sollte in der vorliegenden Arbeit experimentell untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob die mutierten Lis1-Konstrukte durch RhoA-Aktivierung die L1-vermittelte Neuritogenese hemmen. In diesem Fall sollte sich der Effekt von Lis1H und Lis1S mit Hilfe eines RhoA-Inhibitors wieder aufheben lassen. Die hier eingesetzte Substanz Y-27632 ist ein selektiver Inhibitor von p160ROCK, eine Effektor kinase von RhoA<sup>[291]</sup>. Y-27632 wurde bereits häufig zur Untersuchung von RhoA-abhängigen Prozessen eingesetzt<sup>[12, 82, 104, 306]</sup>.

Die Hippocampusneurone neonataler Mäuse wurden mit Hilfe eines Trypsin/DNaseI-Verdau und mechanischer Vereinzelung präpariert und durch Elektroporation mit dominant-negativen LIS1-Konstrukten transfiziert<sup>[61]</sup>. Zur Transfektionskontrolle wurden die Zellen mit einem Expressionsplasmid für eGFP cotransfiziert. Die Neuronen wurden entweder auf Poly-L-Lysin (PLL) oder auf L1-Fc ausgesät und nach 24 h in Kultur mit dem Inhibitor Y-27632 (10  $\mu$ M) versetzt. Nach weiteren 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen fixiert und anschließend mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops analysiert. PLL dient der verbesserten Adhäsion der Zellen an der Zellkulturgefäßoberfläche. Zudem erhöht es die Adsorption von L1-Fc. Hier dient es auch als Negativkontrolle, da PLL keine biologischen Aktivitäten in den Zellen auslöst<sup>[163, 183, 309]</sup>. Ebenfalls als Negativkontrolle in Frage käme die Fc-Domäne. Sie zeigt jedoch einen ähnlichen Effekt auf die Zellen wie PLL<sup>[171]</sup>, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf ihren Einsatz verzichtet wurde.

Die Präparation der Hippocampusneurone verlief erfolgreich. Abb. 4.1 zeigt eine Immunfärbung der präparierten Neurone mit dem neuronenspezifischen Marker  $\beta$ -III-Tubulin und dem astrozytenspezifischen Marker GFAP. Es zeigte sich, dass die



Kultur weitgehend frei von Astrozyten war. Die Transfektion der präparierten Neu-



**Abbildung 4.1:** Immunfärbung der Hippocampusneuronenkultur: A-C:  $\beta$ -III-Tubulin-Färbung der Neurone; D-F: GFAP-Färbung der Astrozyten. A/D: Fluoreszenz; B/E: Phasenkontrastaufnahme; C/F: Überlagerung.

rone ergab jedoch keine befriedigenden Ergebnisse. Die Mehrzahl der Zellen überstand die Elektroporation mit dem amaxa-System nicht, so dass eine zu geringe Anzahl an Zellen für die Auswertung zur Verfügung stand. Das Transfektionsprotokoll wurde u. a. in Zusammenarbeit mit amaxa mehrfach optimiert, so dass eine gewisse Erhöhung der Transfektionseffizienz erreicht werden konnte. Die Vitalität der Zellen war jedoch nicht ausreichend, um das Neuritenwachstum zu untersuchen. Als Alternative zur Elektroporation wurde versucht, die Neurone durch Lipofektion oder *magnet-assisted transfection* zu transfizieren. Diese Methoden waren zwar schonender für die Neurone, wiesen aber eine zu geringe Effizienz auf.

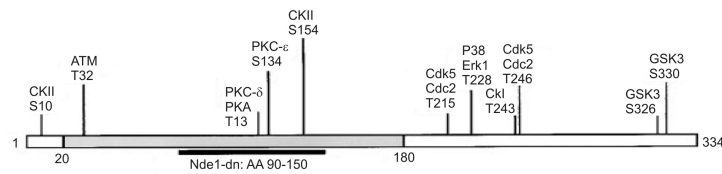
Da die primär kultivierten Neurone nur schlecht zu transfizieren waren, wurde ein analoger Versuch auch mit PC12- und N2a-Zellen durchgeführt. Diese Zelllinien

wurden bereits häufig für Neuritenwachstumsexperimente verwendet<sup>[76, 165, 177, 245, 249]</sup>. Die N2a-Zellen wurden zusätzlich mit einem Konstrukt für neuronales L1 transfiziert, da diese Zelllinie nur das nicht-neuronale L1 exprimiert<sup>[194]</sup>. Hier verlief die Transfektion erfolgreich, so dass die Zellen mikroskopisch auf ihre Neuritogenese untersucht werden konnten. Sowohl die PC12- als auch die N2a-Zellen reagierten jedoch nur sehr schwach auf eine Stimulation mit L1-Fc, so dass sie für die Untersuchung von L1-abhängigen Prozessen nicht geeignet waren. Aus diesem Grund konnte der Einfluss der Lis1-Mutationen auf die L1-vermittelte Neuritogenese leider nicht weiter untersucht werden.

#### 4.1.2 Einfluss von Nde1 auf die L1-vermittelte Neuritogenese

Neben Lis1 sind auch die Nud-Proteine (*nuclear distribution*), die die Kerntranslokation und die Organisation von Neurofilamenten in wandernden Neuronen regulieren, an der Migration von Neuronen beteiligt. Eine Interaktion von Lis1 mit dem Nud-Protein Nde1 konnte bereits nachgewiesen werden. Für die vorliegende Arbeit ist die Beobachtung von Feng *et al.* bedeutsam, dass die o. g. Punktmutationen Lis1H und Lis1S die Bindung an Nde1 unterbinden. Dies läßt zusammen mit den zuvor erwähnten Daten von T. Schneegans darauf schließen, dass die Nde1-Lis1-Bindung bei der L1-vermittelten Neuritogenese eine wichtige Rolle spielt. Daher sollte der potentielle Einfluss von Nde1 auf die L1-abhängige Neuritogenese durch Transfektion von Hippocampusneuronen neonataler Mäuse mit einem dominant-negativen Nde1-Konstrukt analysiert werden. Das Konstrukt besteht aus den Aminosäuren 90-150 des Nde1-Proteins (Abb. 4.2), die die Lis1-Bindestelle darstellen. Das Proteinfragment blockiert somit in der Zelle die Bindung des endogenen Nde1 an Lis1, wodurch ein ähnlicher Effekt wie durch die Mutationen Lis1H und Lis1S erreicht wird.

Bei der Transfektion der hippocampalen Neurone traten die oben bereits beschrie-

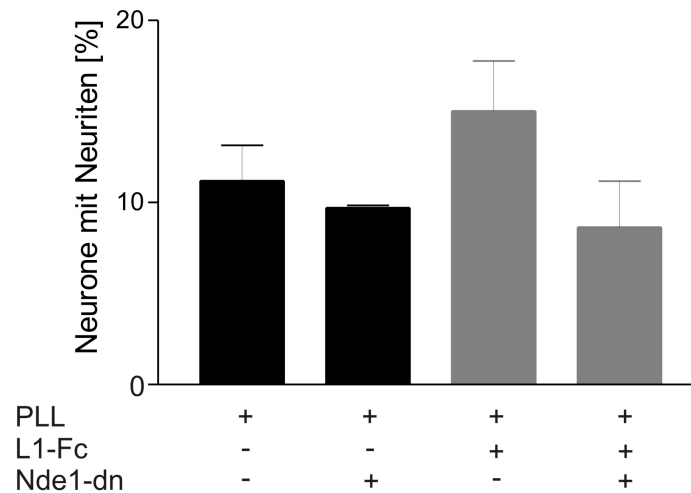


**Abbildung 4.2:** Struktur von Nde1 mit vorhergesagten Phosphorylierungsstellen. Grau dargestellt ist eine putative *coiled-coil*-Struktur, schwarz markiert ist die Lis1-Bindungsstelle und somit das dominant-negative Nde1-Konstrukt (Nde1-dn)<sup>[78]</sup>.

benen Schwierigkeiten auf. Ein Experiment konnte hier jedoch ausgewertet werden. Dabei wurden die mit dem dominant-negativen Nde1-Konstrukt transfizierten Neurone auf PLL und L1-Fc ausgesät. In Abb. 4.3 sind die Neurone, die innerhalb einer Kultivierungsdauer von 24 h Neuriten ausgebildet haben, relativ zur Gesamtzellzahl (=100 %) aufgetragen. Aus den vorliegenden Daten lässt sich die Tendenz erkennen, dass die L1-abhängige Neuritogenese durch das dominant-negative Nde1-Konstrukt stärker verringert ist als die Neuritogenese auf dem Kontrollsubstrat PLL. Dieses Ergebnis weist auf einen funktionellen Zusammenhang von L1, Lis1 und Nde1 bei der Bildung von Neuriten hin.

#### 4.1.3 Untersuchung einer potentiellen Interaktion von L1 mit DCX und Nde1

Der schwere Phänotyp, der bei Lissenzephalie-Patienten auftritt, findet sich auch bei Menschen mit Mutationen in einem Gen, das das Protein Doublecortin (DCX) codiert. Lis1 und DCX werden während der Gehirnentwicklung koexprimiert und interagieren direkt miteinander. Weiterhin konnte *in vivo* eine Bindung von DCX an Neurofascin, ein Zelladhäsionsmolekül der L1-Familie, nachgewiesen werden<sup>[146]</sup>. Das DCX-Bindungsmotiv in Neurofascin (phospho-FIGQY) findet sich auch in der



**Abbildung 4.3:** Untersuchung des Einflusses von Nde1-dn auf die L1-abhängige Neuritogenese hippocampaler Neurone. Unterhalb der x-Achse sind die Zellkultursubstrate (PLL, L1-Fc) bzw. die rekombinant in den Neuronen exprimierten Proteine (eGFP, Nde1-dn) angegeben. Dargestellt ist der Anteil der Zellen mit Neuriten an der Gesamtzahl der eGFP-positiven Zellen. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

intrazellulären Domäne von L1. Nde1 ist ebenfalls ein Bindungspartner von Lis1 und DCX. Die Bindung von Lis1 an Nde1 wird durch die oben genannten Lis1-Punktmutationen unterbunden.

Lis1 und L1 konnten bisher nicht co-immunpräzipitiert werden und interagieren möglicherweise über Adapterproteine<sup>[260]</sup>. Diese Funktion könnten DCX oder Nde1 besitzen, so dass in dieser Arbeit versucht wurde, eine Interaktion zwischen L1 und DCX bzw. Nde1 nachzuweisen.

**Co-Immunpräzipitation** Für Co-Immunpräzipitationen wurden ein monoklonaler L1-Antikörper (555), ein polyklonaler Antikörper gegen DCX und ein polyklonaler Antikörper gegen Nde1 verwendet. Die Antikörper wurden über Nacht mit den ver-

schiedenen Maushirnfractionen inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate mit Hilfe von Protein A- oder G-Agarose isoliert. Mit keinem der drei Antikörper konnten L1 und DCX oder Nde1 gemeinsam präzipitiert werden.

**Pull-down** Weiterhin wurden *pull-downs* mit zuvor in *E.coli* produzierter, rekombinanter intrazellulärer Domäne von L1 durchgeführt. Auch hier konnten DCX und Nde1 nicht als Bindungspartner identifiziert werden.

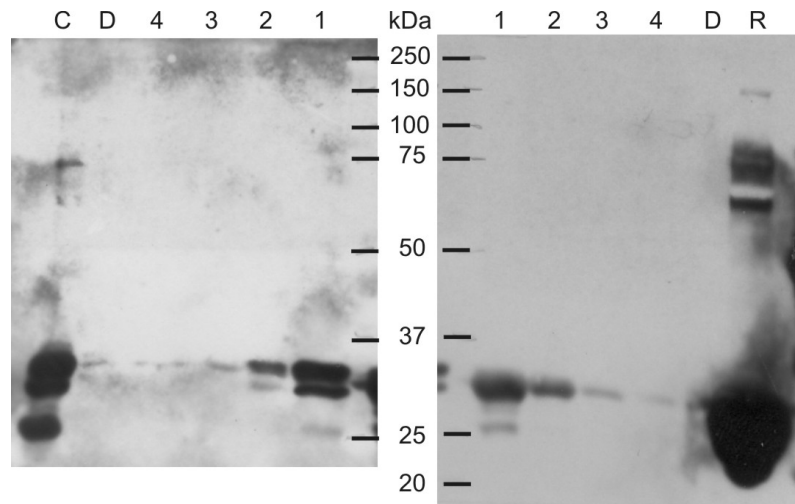
**Crosslinking** Um eine eventuell nur schwache oder kurzzeitige Interaktion von L1 mit DCX und Nde1 nachweisen zu können, wurde als dritter Interaktionstest ein *crosslinking* mit Sulfo-SBED durchgeführt. Dazu wurde die intrazelluläre Domäne von L1 mit dem trifunktionalen *crosslinker* Sulfo-SBED kovalent verknüpft und mit den verschiedenen Zellfraktionen aus Maushirn inkubiert. Durch Einwirkung von UV-Strahlung wurden Proteine, die sich in direkter Nachbarschaft zur intrazellulären Domäne von L1 befanden, kovalent an den *crosslinker* gebunden (vgl. 3.2.3.15). Nach Abspaltung der intrazellulären Domäne von L1 und Isolierung der Interaktionspartner aus dem Proteingemisch wurden diese per Western Blot auf die Anwesenheit von DCX und Nde1 untersucht. Auch auf diese Weise konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

## 4.2 L1 und Rho-GTPasen

### 4.2.1 Untersuchung der Aktivität der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA im Gehirn L1-defizienter Mäuse

Die bisherigen Ergebnisse einer Studie von S. Gensler und C. Dotti (Universität Leuven, pers. Mitteilung) weisen auf eine Interaktion von L1 und den Rho-GTPasen

Rac1 und Cdc42 hin. Um zu untersuchen, ob sich ein genetischer *knock-out* von L1 auf die Aktivität der Rho-GTPasen im Gehirn der Maus auswirkt, wurden Rho-GTPase-Aktivitätstests durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden zunächst die GTPase-bindenden Domänen von PAK1 und Rhotekin aufgereinigt. Die Konstrukte für die GTPase-bindenden Domänen von PAK1 und Rhotekin codieren das *Cdc42/Rac interactive binding motif* (CRIB), bestehend aus den Aminosäuren 56-141 des humanen PAK1B bzw. die *RhoA binding domain* (RBD), bestehend aus den Aminosäuren 7-89 des murinen Rhotekins, beides als GST-Fusionsprotein. Die Expression und Aufreinigung der Proteindomänen war erfolgreich. In Abb. 4.4 sind Western Blots der Aufreinigung dargestellt. Die mit einem anti-GST-Antikörper detektierten Proteinbanden entsprechen den Molekulargewichten von GST-PAK1-CRIB und GST-Rhotekin-RBD (jeweils 35 kDa). Um die Funktionalität von PAK1-CRIB bzw. Rhotekin-RBD zu überprüfen, wurden die Homogenate vor dem *pull-down* entweder mit GDP oder GTP $\gamma$ S, einem nicht zu GDP hydrolysisierbaren GTP-Derivat, vorinkubiert (vgl. 3.2.3.10). Dabei sollte bei GDP-vorinkubierten Proben kein Rho-GTPase-Signal im Eluat nachweisbar sein, bei der GTP $\gamma$ S-Kontrolle sollte hingegen eine starke Bande im Western Blot zu sehen sein. Mit den selbst produzierten GST-Fusionsproteinen blieb die Positivkontrolle jedoch ohne Signal und es konnten keine aktiven GTPasen aus dem Maushirnhomogenat isoliert werden. Daher wurde auf kommerziell erhältliche Kits zur Bestimmung der GTPase-Aktivität zurückgegriffen (EZ-Detect<sup>TM</sup> Rac1/Cdc42 Activation Kit, Pierce, Bonn). Mit Hilfe dieser Kits konnten die Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 im Gehirn von L1-defizienten Mäusen bestimmt und mit den Werten wildtypischer Tiere verglichen werden (Abb. 4.5). Die RhoA-Aktivität ließ sich auch durch Einsatz des entsprechenden Kits nicht zuverlässig bestimmen. Die im folgenden mit L1-*knock-out* bezeichneten Tiere entsprechen dem L1<sup>-/y</sup>-Genotyp, die wildtypischen Geschwister besitzen den Genotyp L1<sup>+/+</sup> (Weibchen) bzw. L1<sup>+/y</sup> (Männchen) (vgl. 3.1.14). In Abb. 4.5 sind die ermittelten Aktivitäten von Rac1 und Cdc42

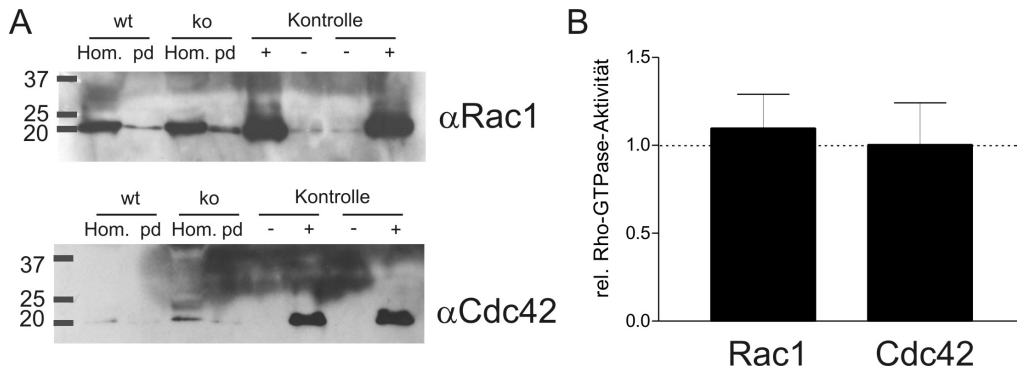


**Abbildung 4.4:** Western Blot zur Überprüfung der Produktion von GST-PAK1-CRIB und GST-Rhotekin-RBD: Die Glutathion-Agarose wurde vier Mal mit Elutionspuffer inkubiert (Euate 1-4), die Eluate vereinigt und umgepuffert. Der Durchlauf des Umpufferns wurde ebenfalls auf PAK-CRIB und Rhotekin-RBD untersucht. C: CRIB-Domäne, R: RBD-Domäne, D: Durchlauf. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines anti-GST-Antikörpers.

im L1-defizienten Maushirn relativ zur Aktivität im Gehirn wildtypischer Mäuse dargestellt. Die gemittelten Werte von 10 bzw. 9 Experimenten zeigen sowohl für Rac1 als auch für Cdc42 keine Aktivitätsunterschiede zwischen L1-*knock-out* und Wildtyp.

#### 4.2.2 Untersuchung der Rho-GTPase-Aktivität in anti-L1-stimulierten Kleinhirneuronen

Im Gesamthirnhomogenat von L1-defizienten Mäusen waren keine Unterschiede in der Rho-GTPase-Aktivität im Vergleich zu den wildtypischen Tieren zu beobachten. Aufgrund einer der relativ großen Streuung der Werte liegt die Vermutung nahe,

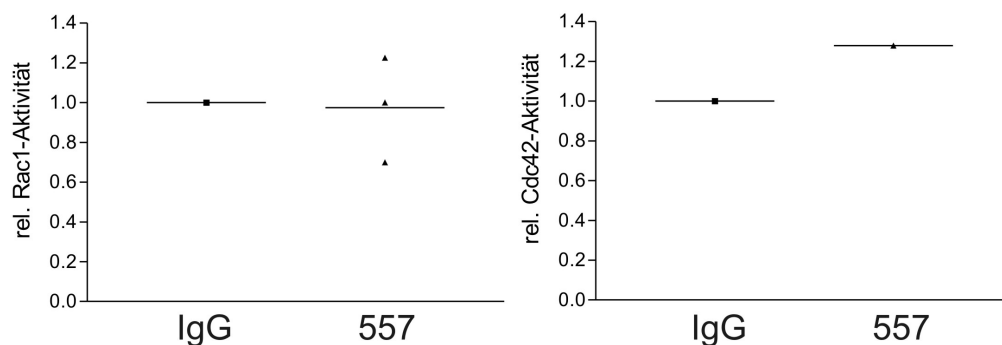


**Abbildung 4.5:** Aktivität von Rac1 und Cdc42 im Gehirn L1-defizienter Mäuse. In A sind repräsentative Western Blots für Rac1 und Cdc42 gezeigt. wt: Wildtyp; ko: L1-*knock-out*; Hom.: Maushirnhomogenat; pd: *pull-down* (aktive GTPase); -: Negativkontrolle (GDP-Vorinkubation); +: Positivkontrolle (GTP $\gamma$ S-Vorinkubation). In B ist die densitometrische Auswertung von 10 (Rac1) bzw. 9 (Cdc42) unabhängigen Experimenten gezeigt. Aufgetragen ist die relative Rho-GTPase-Aktivität in Gehirnhomogenaten von L1-defizienten Tieren, wobei die Aktivität in den Gehirnhomogenaten wildtypischer Tiere gleich 1 gesetzt wurde. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

dass Unterschiede in einzelnen Hirnregionen existieren, diese jedoch durch die Homogenisierung des gesamten Gehirns nicht mehr messbar sind. Eine Präparation von einzelnen Hirnteilen ist durch die schnelle Hydrolyse des von den GTPasen gebundenen GTPs ungünstig, so dass stattdessen kultivierte Kleinhirnneurone untersucht wurden. Dabei wurden die Kleinhirnneurone 15 min mit einem monoklonalen anti-L1-Antikörper („557“) stimuliert, der nachweislich das Neuritenwachstum fördert<sup>[7]</sup>. Mit Hilfe des Antikörpers kann L1 gezielt aktiviert werden. Als Negativkontrolle dienten IgGs aus der Spezies, in der dieser Antikörper produziert worden war (Ratte). Anschließend wurde die Rac1- und Cdc42-Aktivität mit Hilfe der entsprechenden Kits (EZ-Detect<sup>TM</sup> Rac1/Cdc42 Activation Kit, Pierce, Bonn) bestimmt. Dabei erwies sich der Nachweis der (aktiven) Rho-GTPasen als sehr schwierig, da



die Proteinmenge im Zelllysate gering war. Die Zahl der verwendeten Neurone wurde daraufhin erhöht, woraufhin für die Rac1-Aktivität drei, für die Cdc42-Aktivität jedoch nur ein Meßwert ermittelt werden konnte. Die Ergebnisse der auswertbaren Experimente sind in Abb. 4.6 zusammengefasst. Die Aktivität von Rac1 in L1-

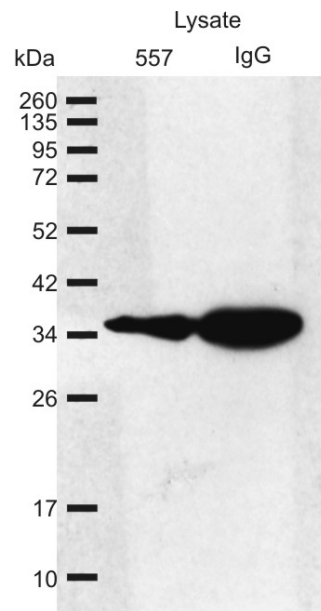


**Abbildung 4.6:** Relative Rac1- und Cdc42-Aktivität in Kleinhirnneuronen, die mit dem monoklonalen L1-Antikörper 557 stimuliert wurden („557“). Die Aktivität in IgG-stimulierten Neuronen („IgG“, Negativkontrolle) wurde gleich 1 gesetzt. Bei 557 entspricht jeder Datenpunkt einem Experiment.

Antikörper-stimulierten Kleinhirnneuronen unterscheidet sich nicht signifikant von der in IgG-behandelten Zellen. Die Aktivität von Cdc42 stieg nach der Stimulation von L1 um ca. 28 % an. Hierbei handelt es sich aber lediglich um das Ergebnis eines einzelnen Experiments (s. o.).

Um zu überprüfen, ob die Zellen durch die Stimulation erhöhtem Stress ausgesetzt waren, wurde die Aktivität von Caspase-3 im Zelllysate mit Hilfe eines Caspase-3-Antikörpers untersucht. Aktivierte Caspase-3 ist ein Indikator für Apoptose, die bei Zellstress zunimmt. Die Aktivität der Caspase lässt sich mittels Western Blot untersuchen, da das aktivierte Protein proteolytisch gespalten wird. Dabei entstehen aus dem inaktiven, 37 kDa großen Protein zwei kleinere Fragmente von 17 und 12 kDa

Größe. Abb. 4.7 zeigt den Western Blot von Zelllysate aus Kleinhirnneuronen, die ent-



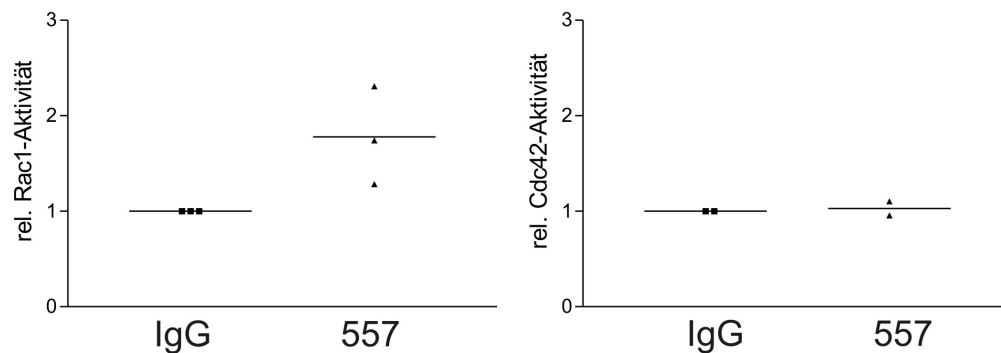
**Abbildung 4.7:** Vergleich der Caspase-3 Aktivität in L1-Antikörper-stimulierten („557“) Kleinhirnneuronen und der IgG-Kontrolle („IgG“). Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot der Zelllysate. Detektiert wurde mit einem Caspase-3-Antikörper, der sowohl die inaktive als auch die aktive Form der Caspase-3 erkennt.

weder mit dem 557-Antikörper oder IgG aus Ratte behandelt wurden. Man erkennt die Bande der Caspase-3 bei etwa 37 kDa, während keine Spaltprodukte von kleinerem Molekulargewicht auftreten. Auch bei längerer Exposition des Films waren keine Fragmente im Western Blot erkennbar.

### 4.2.3 Untersuchung der Rho-GTPase-Aktivität in L1-stimulierten Neuroblastom-Zellen

Aufgrund der geringen Proteinausbeute aus Kleinhirnneuronen und der damit verbundenen Detektionsprobleme beim Western Blot wurde die Aktivität der Rho-

GTPasen Rac1 und Cdc42 auch in Neuroblastom-Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden N2a-Zellen zunächst mit dem neuronalen L1 transfiziert (vgl. 4.1.1). Anschließend wurde 15 min mit dem 557-Antikörper stimuliert und die Aktivität der Rho-GTPasen mit Hilfe der entsprechenden Kits (EZ-Detect<sup>TM</sup> Rac1/Cdc42 Activation Kit, Pierce, Bonn) bestimmt. Die ermittelten Aktivitäten sind in Abb 4.8 dargestellt. Die Stimulation der Neuroblastom-Zellen bewirkte einen Anstieg der

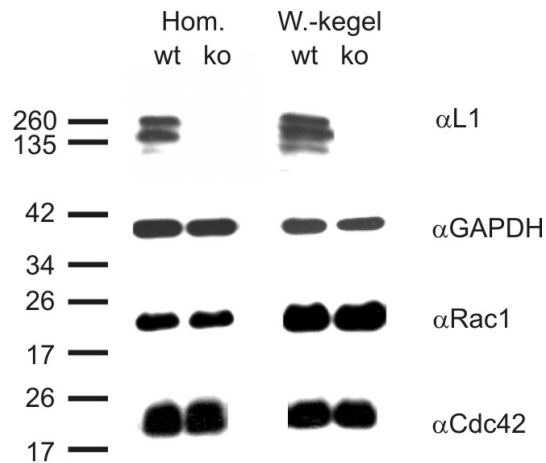


**Abbildung 4.8:** Relative Rac1- und Cdc42-Aktivität in N2a-Zellen, die mit der neuronalen Form von L1 transfiziert und anschließend mit dem monoklonalen L1-Antikörper 557 stimuliert wurden („557“). Die Aktivität in IgG-stimulierten Zellen („IgG“, Negativkontrolle) wurde gleich 1 gesetzt. Jeder Datenpunkt entspricht einem Experiment.

Rac1-Aktivität um ca. 75 %, wobei die Werte der einzelnen Experimente relativ weit auseinander liegen. Bei Cdc42 konnten nur zwei Experimente ausgewertet werden, da auch hier die Proteinmenge des aktiven Cdc42 an der Detektionsgrenze lag. Die ermittelten Werte zeigen keinen Einfluss der L1-Antikörper-Stimulation auf die Aktivität von Cdc42.

#### 4.2.4 Untersuchung der Expression von Rac1 und Cdc42 in L1-defizientem Maushirn

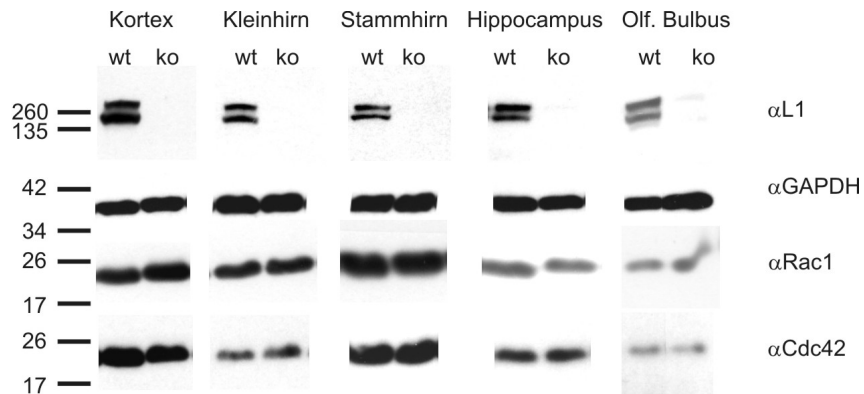
Der Vergleich der Expression von Rac1 und Cdc42 in Hirnhomogenaten von fünf L1-defizienten Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistern (P0-P2) zeigte keinen Unterschied (Abb. 4.9). Zudem wurden Wachstumskegel-angereicherte Zellfraktionen aus den Gehirnen von L1 *knock-out*- und Wildtyp-Tieren untersucht, da es in Wachstumskegeln besonders häufig zu einer Reorganisation des Zytoskeletts kommt. Auch konnten S. Gensler und C. Dotti eine Interaktion von L1 mit Rac1 und Cdc42 in Wachstumskegel-angereicherten Fraktionen aus den Hippocampi von Ratten nachweisen (Universität Leuven, pers. Mitteilung). Die Expression von Rac1 und Cdc42 unterscheidet sich auch in den Wachstumskegelfraktionen von L1-defizienten Mäusen nicht signifikant von der der wildtypischen Mäuse. Als Ladungskontrolle dienten entweder GAPDH oder  $\alpha$ -Tubulin, beides abundante Proteine im Gehirn. Um auszuschließen, dass eventuelle Unterschiede der Rac1- und Cdc42-Expression in einzelnen Hirnregionen im Gesamthirnhomogenat verloren gehen, wurden auch einige Bestandteile des Maushirns präpariert und untersucht. Dabei wurden der Kortex, das Kleinhirn, der Hippocampus, das Stammhirn und der olfaktorische Bulbus von L1-*knock-out*-Mäusen und wildtypischen Tieren entnommen und mittels Western Blot die Menge von Rac1 und Cdc42 bestimmt. Es wurden die Hirnregionen von jeweils 4 wildtypischen Tieren und 5 L1-*knock-out*-Mäusen verglichen. Die gemittelten densitometrischen Auswertungen der Western Blot Signale lieferten dabei keinen signifikanten Unterschied der Expression der Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 zwischen Wildtyp und L1-*knock-out* in den untersuchten Hirnregionen.



**Abbildung 4.9:** Vergleich der Rac1 und Cdc42-Expression in Gesamthirnhomogenaten („Hom.“) und Wachstumskegel-angereicherten Fraktionen („W-kegel“) L1-defizienter Mäuse („ko“) und ihrer Wildtypgeschwister („wt“). Dargestellt sind exemplarische Western Blots, detektiert wurde mit Antikörpern gegen L1, Rac1 und Cdc42. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

#### 4.2.5 Einfluss von RhoA auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum

Die Rho-GTPase RhoA ist eine Art Antagonist zu den Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42. Während letztere das Neuritenwachstum fördern, bewirkt RhoA einen Rückzug der Neuriten, wie in PC12- und N1E115-Zellen gezeigt wurde<sup>[120,282]</sup>. Ob RhoA auch die L1-abhängige Neuritogenese bzw. das Neuritenwachstum beeinflusst, wurde hier anhand von Kleinhirnneuronen untersucht. Diese wurden auf L1-Fc ausgesät und mit dem in 4.1.1 bereits erwähnten RhoA-Inhibitor Y-27632 behandelt. In Abb. 4.11 sind die ermittelten Werte für die Neuritenlänge dargestellt. Die *two-way analysis of variance* (ANOVA) zeigte einen signifikanten Effekt des Substrates auf das Neuritenwachstum ( $p < 0,001$ ). Der Inhibitor hatte jedoch keinen Einfluss auf die durchschnittliche Neuritenlänge. In Abb. 4.12 ist die relative Neuritogenese nach RhoA-

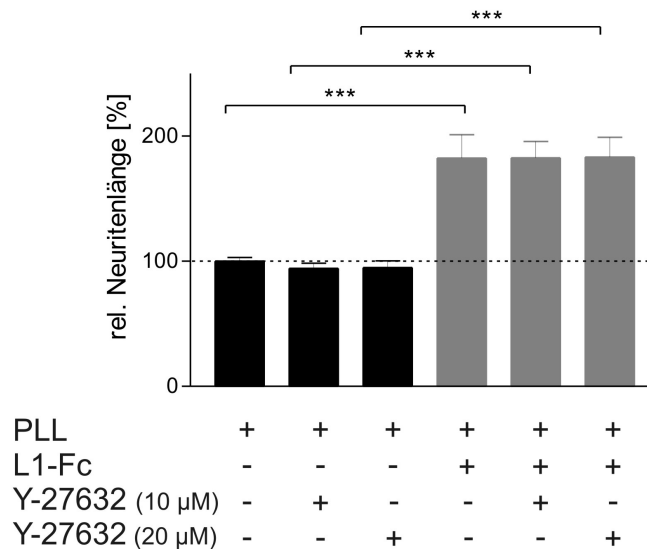


**Abbildung 4.10:** Vergleich der Rac1 und Cdc42-Expression in verschiedenen Hirnregionen L1-defizienter Mäuse („ko“) und ihrer Wildtypgeschwister („wt“). Dargestellt sind exemplarische Western Blots der Homogenate aus Kortex, Kleinhirn, Stammhirn, Hippocampus und olfaktorischem Bulbus. Detektiert wurde mit Antikörpern gegen L1, Rac1 und Cdc42. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

Inhibitorbehandlung dargestellt. Die *two-way* ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt des Substrates ( $p < 0,001$ ) und des Inhibitors ( $p < 0,001$ ) auf die Neuritogenese, die Interaktion von Substrat und Inhibitor ergab jedoch keinen signifikanten Effekt. Abb. 4.12 A zeigt den signifikanten Unterschied der Neuritogenese zwischen PLL und L1-Fc. In Abb. 4.12 B ist der Einfluss des RhoA-Inhibitors dargestellt. Es wird deutlich, dass der Neuritogenese-fördernde Effekt von Y-27632 nicht substratabhängig ist. Sowohl auf PLL als auch auf L1-Fc zeigten die mit dem Inhibitor behandelten Zellen eine signifikant erhöhte Neuritogenese.

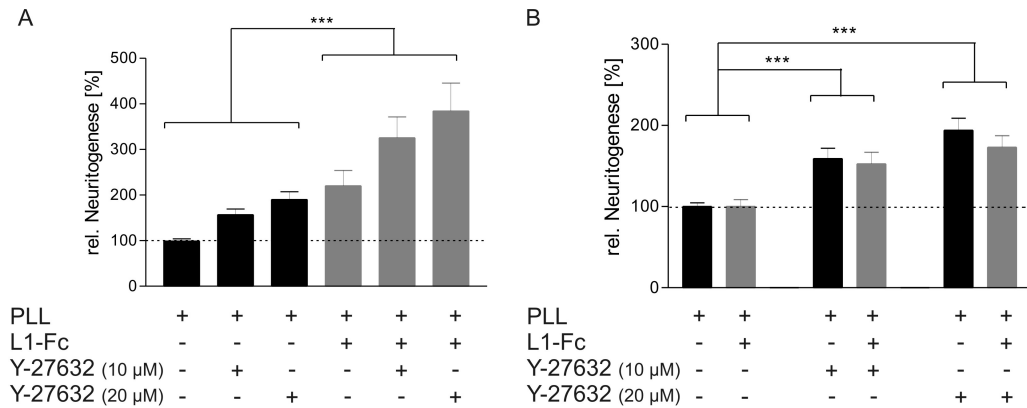
#### 4.2.6 Einfluss von RhoA auf die Oberflächenlokalisierung von L1

Die Oberflächenlokalisierung von L1 unterliegt einer fortwährenden Dynamik, die dafür sorgt, dass das Protein bedarfsgerecht in der Plasmamembran verteilt wird.



**Abbildung 4.11:** Relative Neuritenlängen der mit dem RhoA-Inhibitor Y-27632 behandelten Kleinhirnneurone. Unterhalb der x-Achse sind die Zellkultursubstrate (PLL, L1-Fc) bzw. der zugegebene Inhibitor und seine Konzentrationen angegeben. Die durchschnittliche Neuritenlänge der Neurone auf PLL ohne Zusatz von Y-27632 wurde gleich 100 % gesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Statistik: \*\*\*  $p < 0,001$ ; ausgewertet mit *Duncan's multiple range test* nach *two-way ANOVA* mit Substrat und Inhibitor als *between group* Faktoren.

Dieser Prozess wird durch das sogenannte Recycling gesteuert, einen regulierten Zyklus aus Endo- und Exozytose. Auf diese Weise kann die Zelle bzw. ihr Wachstumskegel auf äußere Stimuli reagieren. Für den Netrin-1-Rezeptor DCC wurde gezeigt, dass durch die Bindung von Netrin-1 die GTPase RhoA gehemmt wird, welche ihrerseits die Menge an DCC in der Plasmamembran reguliert. Durch Inhibition von RhoA wurde mehr DCC an die Zelloberfläche rekrutiert<sup>[197]</sup>. Möglicherweise spielt ein ähnlicher Mechanismus auch beim L1-Recycling eine Rolle. Daher wurde mit



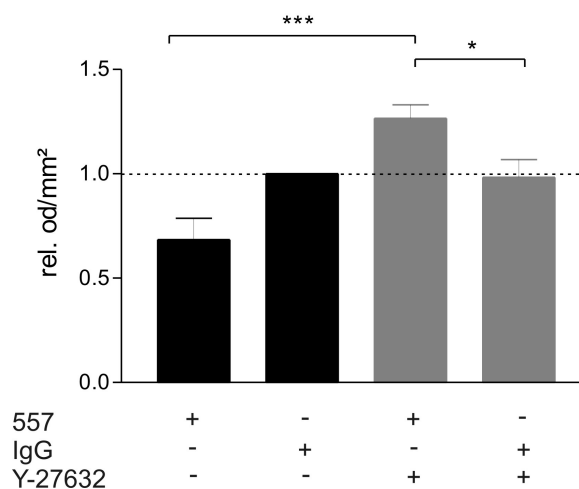
**Abbildung 4.12:** A: Relative Neuritogenese der mit dem RhoA-Inhibitor Y-27632 behandelten Kleinhirnneurone. Unterhalb der x-Achse sind die Zellkultursubstrate (PLL, L1-Fc) bzw. der zugegebene Inhibitor und seine Konzentrationen angegeben. Der Anteil der Neurone mit Neuriten an der Gesamtzahl der Neurone auf PLL ohne Inhibitor wurde gleich 100 % gesetzt. Angezeigt ist der Standardfehler. B: Relative Neuritogenese der mit Y-27632 behandelten Kleinhirnneurone. Der Anteil der Neurone mit Neuriten an der Gesamtzahl der Neurone auf PLL (schwarz) bzw. L1 (grau) ohne Inhibitor wurde gleich 100 % gesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Anzahl der Meßwerte: PLL: n = 8; L1-Fc: n = 9; Statistik: \*\*\* p < 0,001; ausgewertet mit *Duncan's multiple range test* nach *two-way ANOVA* mit Substrat und Inhibitor als *between group* Faktoren.

Hilfe der Oberflächenbiotinylierung die Menge an L1 in der Plasmamembran mit und ohne RhoA-Inhibition bestimmt.

Dazu wurden Kleinhirnneurone für 1,5 h mit dem RhoA-Inhibitor Y-27632 kultiviert und anschließend 1 h lang mit dem L1-Antikörper 557 stimuliert, um L1-abhängige Signalkaskaden zu aktivieren. Um die Stimulation sowie Endo- bzw. Exozytosevorgänge zu stoppen, wurden die Zellen anschließend auf Eis gestellt. Daraufhin wurden die Oberflächenproteine mit Biotin markiert (vgl. 3.2.1.11). Mittels Wes-



tern Blot wurden die Zellen auf ihren L1-Gehalt untersucht und die Menge des an der Zelloberfläche lokalisierten L1-Proteins ins Verhältnis zum Gesamt-L1-Gehalt gesetzt. Abb. 4.13 zeigt die Menge von L1 in der Plasmamembran nach Behandlung mit dem RhoA-Inhibitor Y-27632. Abb. 4.13 zeigt, dass die Stimulation mit dem 557-



**Abbildung 4.13:** Oberflächenlokalisierung von L1 in L1-Antikörper-stimulierten und mit dem RhoA-Inhibitor Y-27632 behandelten Kleinhirnneuronen. Dargestellt sind die densitometrischen Auswertungen dreier Experimente. Alle Western Blot-Signale des Oberflächen-L1 wurden zunächst ins Verhältnis zum Gesamt-L1-Gehalt gesetzt. Die Western Blot-Signale wurden auf das Signal der IgG-Kontrolle ohne Inhibitor-Zugabe normalisiert. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Anzahl der Messwerte:  $n = 3$ ; Statistik: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; ausgewertet mit *Duncan's multiple range test* nach *two-way ANOVA* mit Substrat und Inhibitor als *between group* Faktoren.

Antikörper zu einer Reduktion der L1-Menge an der Zelloberfläche führt. Durch Zugabe des RhoA-Inhibitors Y-27632 vor der Stimulation wird diese Reduktion verhindert. Es kommt hingegen zu einer signifikanten Erhöhung der L1-Menge in der Plasmamembran. Durch den Inhibitor Y-27632 hat sich die Menge an Oberflächen-

L1 nach L1-Antikörper-Stimulation in etwa verdoppelt. Die Zugabe des Inhibitors hatte keinen Effekt auf die IgG-Kontrollgruppe.

### 4.3 L1 und Cofilin

#### 4.3.1 Untersuchung einer möglichen Interaktion von L1 und Cofilin

Die Bedeutung des Aktin-depolymerisierenden Proteins Cofilin für das Neuritenwachstum wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt<sup>[2, 74, 124, 161, 184, 241, 289, 307]</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob L1 das Zytoskelett durch die Aktivierung oder Inaktivierung von Cofilin beeinflusst.

Sollte L1 die Aktivität von Cofilin beeinflussen, geschieht dies möglicherweise über eine direkte Interaktion der beiden Proteine, oder durch Komplexbildung mit weiteren Molekülen, die eine Interaktion vermitteln. Zum Nachweis einer solchen Interaktion von L1 und (phospho-)Cofilin im Gehirn der Maus wurden unterschiedliche Strategien verfolgt. Dabei wurden Maushirnhomogenat, zytosolische Fraktion, Membranfraktion, Zytoskelettfraktion und Wachstumskegel-angereicherte Fraktion verwendet.

**Co-Immunpräzipitation** Für Co-Immunpräzipitationen wurden ein monoklonaler L1-Antikörper (555) und zwei monoklonale Antikörper gegen Cofilin bzw. phospho-Cofilin verwendet. Die Antikörper wurden über Nacht mit den verschiedenen Maus-hirnfraktionen inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate mit Hilfe von Protein A- oder G-Agarose isoliert. Mit keinem der drei Antikörper konnten L1 und (phospho-)Cofilin gemeinsam präzipitiert werden.

**Pull-down** Weiterhin wurden *pull-downs* mit rekombinant exprimierter intrazellulärer Domäne von L1 durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Maushirnfraktionen

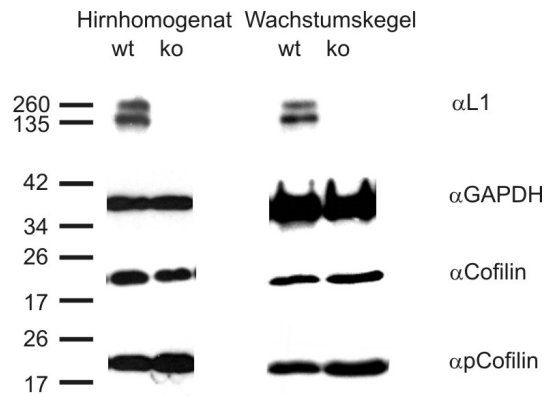
eingesetzt. Auch hier konnten Cofilin und phospho-Cofilin nicht als Bindungspartner identifiziert werden.

**ELISA** Neben den Interaktionstests in Maushirnfractionen wurde mit Hilfe des ELISAs getestet, ob die rekombinant exprimierte intrazelluläre Domäne von L1 (L1izd) *in vitro* an rekombinant exprimiertes Cofilin bindet. Dabei wurde die 96-fach Vertiefungsplatte mit Cofilin beschichtet und die His-L1izd in verschiedenen Verdünnungen zugegeben. Die Detektion erfolgte mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von L1. Als Negativkontrolle dienten die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180, zwei Isoformen von NCAM, einem anderen Zelladhäsionsmolekül. Auch im ELISA zeigte sich keine Interaktion der intrazellulären Domäne von L1 mit Cofilin.

**Crosslinking** Um eine eventuell nur schwache oder kurzzeitige Interaktion von L1 mit (phospho-)Cofilin nachweisen zu können, wurde als dritter Interaktionstest ein *crosslinking* mit Sulfo-SBED durchgeführt. Dazu wurde, wie in Abschnitt 3.2.3.15 beschrieben, die intrazelluläre Domäne von L1 mit dem trifunktionalen *crosslinker* Sulfo-SBED kovalent verknüpft und mit den zuvor erwähnten Maushirnfractionen inkubiert. Durch Einwirkung von UV-Strahlung wurden Proteine, die sich in direkter Nachbarschaft zur intrazellulären Domäne von L1 befanden, kovalent an den *crosslinker* gebunden. Nach Abspaltung der intrazellulären Domäne von L1 und Isolierung der Interaktionspartner aus dem Proteingemisch wurden diese mittels Western Blot auf die Anwesenheit von (phospho-)Cofilin untersucht. Auch auf diese Weise konnte keine Interaktion der beiden Proteine nachgewiesen werden.

### 4.3.2 Untersuchung der Expression und Phosphorylierung von Cofilin in L1-defizientem Maushirn

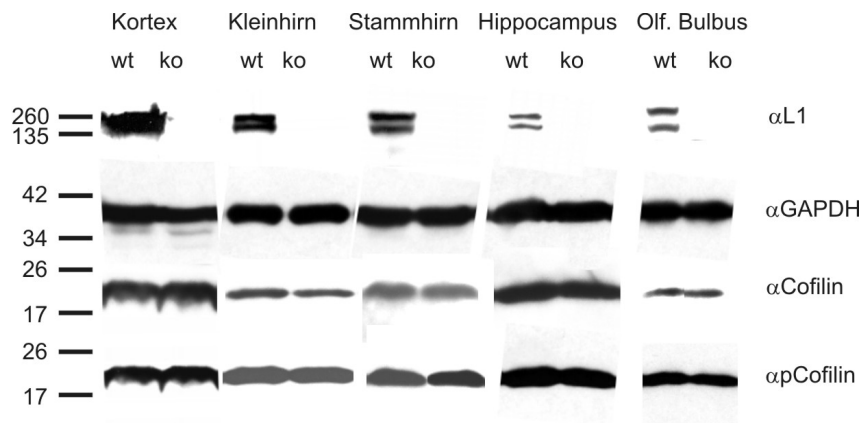
Eine direkte Interaktion von Cofilin und L1 konnte nicht ermittelt werden. Möglicherweise fungiert Cofilin als *downstream*-Vermittler zwischen L1 und dem Zytoskelett. Ob sich ein Fehlen von L1 auf die Aktivität oder Expression von Cofilin auswirkt, wurde anhand von L1-defizienten Mäusen untersucht. Dabei wurden zunächst die Expression und der Phosphorylierungszustand von Cofilin in Hirnhomogenaten von fünf L1-defizienten Mäusen und ihren Wildtyp-Geschwistern (P0-P2) mittels Western Blot ermittelt. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen. Zudem wurden Wachstumskegel-angereicherte Fraktionen untersucht, da Cofilin dort besonders angereichert ist<sup>[13,74,95,241]</sup>. Die densitometrische Auswertung der Western Blots zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der Cofilin-Expression und -Phosphorylierung zwischen den Genotypen. Zur Normierung diente das Expressionsniveau von GAPDH oder  $\alpha$ -Tubulin, zweier abundanter Proteine im Gehirn. Zudem wurden einzelne Hirnregionen der L1-defizienten Tiere auf die Expression bzw. Phosphorylierung von Cofilin untersucht. Dabei wurden der Kortex, das Kleinhirn, der Hippocampus, das Stammhirn und der olfaktorische Bulbus von L1-*knock-out*-Mäusen und wildtypischen Tieren entnommen und mittels Western Blot die Menge von (phospho-)Cofilin bestimmt. Es wurden die Hirnregionen von jeweils 4 wildtypischen Tieren und 5 L1-*knock-out*-Mäusen verglichen. Die gemittelten densitometrischen Auswertungen der Western Blot Signale lieferten dabei keinen signifikanten Unterschied der Expression und Phosphorylierung von Cofilin zwischen Wildtyp und L1-*knock-out* in den untersuchten Hirnregionen.



**Abbildung 4.14:** Vergleich der Cofilin-Expression und -Phosphorylierung in Gesamthirnhomogenaten („Hom.“) und Wachstumskegel-angereicherten Fraktionen („W-kegel“) L1-defizienter Mäuse („ko“) und ihrer Wildtypgeschwister („wt“). Dargestellt sind exemplarische Western Blots, detektiert wurde mit Antikörpern gegen L1, phospho-Cofilin („pCofilin“) und Cofilin. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

#### 4.3.3 Untersuchung der Cofilin-Aktivität in L1-Antikörper-stimulierten Kleinhirnneuronen

Die Aktivität von Cofilin wird durch viele extrazelluläre Stimuli reguliert<sup>[185,311]</sup>. Da L1 ebenfalls als Mediator extrazellulärer Signale in das Zellinnere fungiert, führt die Aktivität von L1 möglicherweise zu einer Änderung der Cofilin-Aktivität. Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs wurden Kleinhirnneurone mit dem oben beschriebenen, monoklonalen L1-Antikörper 557 inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit unspezifischen IgGs aus der Ratte. Die Stimulationszeit betrug 2 Minuten, danach wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. In Abb. 4.16 sind die densitometrischen Auswertungen der Western Blots dreier Experimente dargestellt. Das phospho-Cofilin-Signal wurde auf den Gesamtcofilingehalt normalisiert. Der Gesamtcofilingehalt wurde zuvor auf das Expressionsniveau von

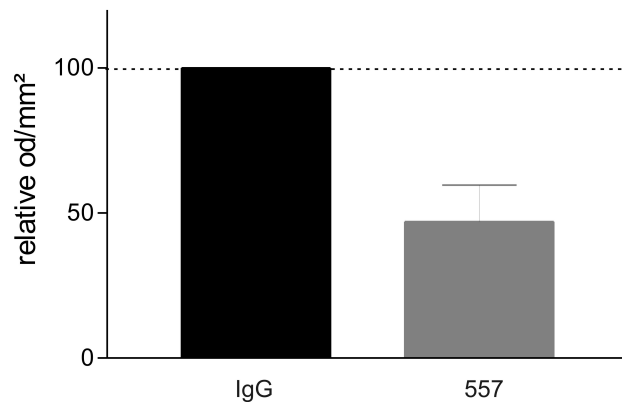


**Abbildung 4.15:** Vergleich der Cofilin-Expression und -Phosphorylierung in verschiedenen Hirnregionen L1-defizienter Mäuse („ko“) und ihrer Wildtypgeschwister („wt“). Dargestellt sind exemplarische Western Blots der Homogenate aus Kortex, Kleinhirn, Stammhirn, Hippocampus und olfaktorischem Bulbus. Detektiert wurde mit Antikörpern gegen L1, phospho-Cofilin („pCofilin“) und Cofilin. GAPDH diente als Beladungskontrolle.

GAPDH normalisiert. Es zeigte sich, dass Cofilin nach der L1-Stimulation dephosphoryliert (aktiviert) wird. Der Rückgang der Phosphorylierung nach zweiminütiger 557-Stimulation beträgt etwa 50 % im Vergleich zur IgG-Kontrolle.

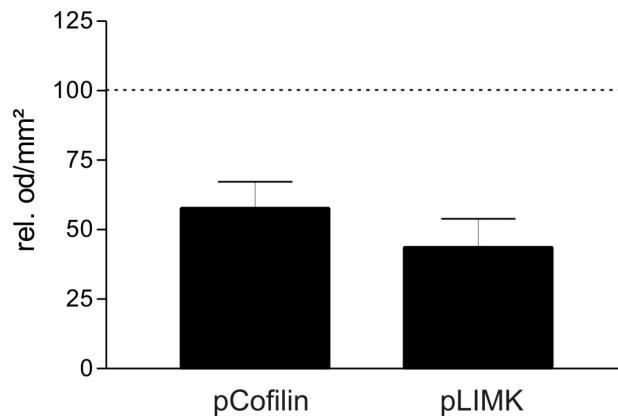
#### 4.3.4 Untersuchung der Cofilin-Aktivität in L1-Antikörper-stimulierten Wachstumskegeln

Cofilin ist besonders in den Wachstumskegeln von Zellen angereichert, wo es seine wichtige Rolle beim Neuritenwachstum und der axonalen Wegfindung ausübt<sup>[13,74,95,241]</sup>. Daher wurden zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von L1 auf die Cofilin-Aktivität auch Wachstumskegel aus Maushirnhomogenat mit dem L1-Antikörper stimuliert. Dazu wurden die angereicherten Wachstumskegel 2 min



**Abbildung 4.16:** Phosphorylierung von Cofilin in Kleinhirnneuronen nach Stimulation mit dem anti-L1-Antikörper 557 („557“). Es ist die densitometrische Auswertungen des phospho-Cofilin-Signals in Western Blots dreier unabhängiger Experimente gezeigt, wobei zur Normierung das Expressionsniveau des zuvor auf GAPDH normalisierten Gesamtcofilins diente. Das Signal der IgG-stimulierten Kontrollprobe wurde gleich 100 % gesetzt („IgG“). Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

mit dem 557-Antikörper bei 37 °C inkubiert, als Kontrolle dienten Ratten-IgGs (vgl. 3.2.3.9). Es zeigte sich auch hier eine Reduktion der Cofilin-Phosphorylierung nach 2 min Stimulation in drei unabhängigen Experimenten (Abb. 4.17). Als einer der Hauptregulatoren der Cofilin-Phosphorylierung (siehe Abb. 1.5) wurde auch die Aktivität der LIM-Kinase untersucht. Auch die LIM-Kinase war nach L1-Antikörper-Stimulation weniger stark phosphoryliert und somit weniger aktiv. Die LIM-Kinase-Phosphorylierung konnte aufgrund von Detektionsproblemen mit dem phospho-LIM-Kinase-Antikörper jedoch nur zweimal bestimmt werden.



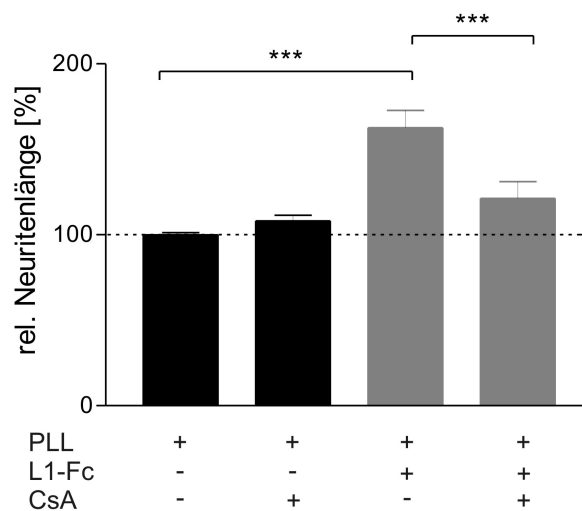
**Abbildung 4.17:** Phosphorylierung von Cofilin („pCofilin“) und LIM-Kinase („pLIMK“) in Wachstumskegeln nach Stimulation mit dem anti-L1-Antikörper 557. Es sind die densitometrischen Auswertungen der phospho-Cofilin- und phospho-LIM-Kinase Signale im Western Blot gezeigt, wobei zur Normierung das Expressionsniveau des zuvor auf GAPDH normalisierten Gesamtcofilins bzw. der Gesamt-LIM-Kinase diente. Das Signal der IgG-stimulierten Kontrollproben wurde gleich 100 % gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei (pCofilin) bzw. zwei (pLIMK) unabhängigen Experimenten. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

#### 4.3.5 Einfluss von Cofilin auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum

Cofilin spielt eine wichtige Rolle beim Neuritenwachstum, indem es den Pool von Aktinmonomeren, die zur Verlängerung der Aktinfilamente benötigt werden, ständig auffüllt. Zudem sorgt es für die Entstehung neuer Filamentenden, die entweder durch Aktinpolymerisation verlängert werden oder mit anderen Filamenten verknüpft werden können<sup>[126]</sup>. Da eine Stimulation von L1 mit dem 557-Antikörper zu einer vermehrten Aktivität von Cofilin führt, sollte im folgenden der Einfluss von Cofilin auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum untersucht werden.



Zu diesem Zweck wurden Kleinhirnneurone auf PLL oder L1-Fc ausgesät und wenige Stunden später mit Cyclosporin A behandelt. Cyclosporin A ist ein spezifischer Inhibitor von Calcineurin, welches die Aktivität der SSH-Phosphatase und somit auch die Aktivität von Cofilin reguliert (siehe Abb. 1.5)<sup>[110,170]</sup>. Nach 24 h in Kultur wurden die Neurone fixiert, mit Toluidinblau/Methylenblau gefärbt und die Neuritenlängen gemessen. In Abb. 4.18 sind die relativen Neuritenlängen dargestellt. Die statistische Analyse der relativen Neuritenlängen durch *two-way* ANOVA zeigt

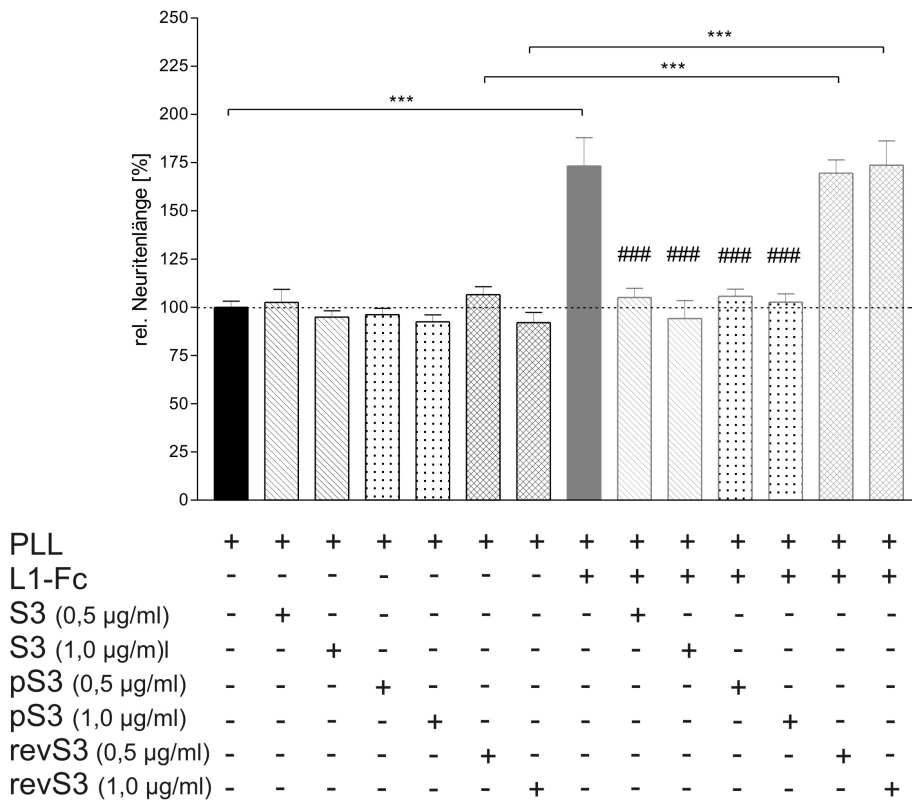


**Abbildung 4.18:** Relative Neuritenlängen der mit Cyclosporin A (CsA) behandelten Kleinhirnneurone. Unterhalb der x-Achse sind die Zellkultursubstrate (PLL, L1-Fc) bzw. der zugegebene Inhibitor angegeben. Die durchschnittliche Neuritenlänge der Neurone auf PLL ohne Zusatz von CsA wurde gleich 100 % gesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Anzahl der Messwerte: PLL n = 8; PLL/CsA n = 9; L1-Fc n = 9; L1-Fc/CsA n = 8; Statistik: \*\*\* p < 0,001; ausgewertet mit *Duncan's multiple range test* nach *two-way* ANOVA mit Substrat und Inhibitor als *between group* Faktoren.

einen signifikanten Effekt des Substrates ( $p < 0,001$ ) und des Inhibitors ( $p < 0,05$ ) auf das Neuritenwachstum. Auch die Kombination von Substrat- und Inhibitoreffekt ist signifikant ( $p < 0,01$ ). Der *Duncan post hoc* Test zeigt, dass die relative Neuritenlänge der Neurone, die auf L1-Fc ausgesät wurden, signifikant größer ist als die der PLL-Kontrollgruppe. Zudem ist ein signifikanter Effekt von Cyclosporin A auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum sichtbar. Die relative Länge der Neuriten ist hier auf das PLL-Niveau reduziert.

Um nicht nur den Einfluss von SSH, sondern auch den der LIM-Kinase auf das L1-abhängige Neuritenwachstum zu untersuchen, wurden nach Aizawa *et al.* inhibitorische Peptide synthetisiert. Die Peptide bestehen aus 16 Aminosäuren, die dem N-terminalen Ende der Cofilin-Aminosäuresequenz entsprechen und das für die Cofilin-Aktivität wichtige Serin 3 enthalten (vgl. **3.1.4**)<sup>[3]</sup>. Zusätzlich verfügen die Peptide über die sogenannte Tat-Sequenz (*transactivator of transcription*), welche der Translokationsdomäne des Proteins Tat im HIV-1 entspricht. Sie ermöglicht es den Peptiden, die Zellmembran zu passieren<sup>[293]</sup>. Durch Zugabe der Peptide im Überschuss werden LIM-Kinase und SSH-Phosphatase mit ihren Substraten gesättigt und in ihrer Funktion blockiert.

Die Peptide wurden etwa 6 h nach der Aussaat der Kleinhirnneurone in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Bei der in der Literatur beschriebenen Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  hatte auch das Kontrollpeptid revS3, welches über die reverse Sequenz des S3-Peptids verfügt, einen negativen Effekt auf das Neuritenwachstum. Daher wurde die eingesetzte Konzentration auf 0,5 bzw. 1,0  $\mu\text{g/ml}$  reduziert. Abb. **4.19** zeigt den Einfluss der LIM-Kinase und SSH-Phosphatase inhibierenden Peptide auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum. Dabei zeigte die *two-way* ANOVA einen signifikanten Effekt nicht nur des Substrates, sondern auch des Inhibitors und der Interaktion von Substrat und Inhibitor (jeweils  $p < 0,001$ ) auf das Neuritenwachstum. Die Peptide zeigen auf dem Kontrollsubstrat PLL keinen Effekt.



**Abbildung 4.19:** Untersuchung des Einflusses der inhibitorischen Peptide S3 (LIMK-Inhibitor) und pS3 (SSH-Inhibitor) auf das L1-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirneuronen. Als Kontrolle diente ein Peptid mit reverser Sequenz (revS3). Unterhalb der x-Achse sind die Zellkultursubstrate (PLL, L1-Fc) bzw. die Peptide mit ihren entsprechenden Konzentrationen angegeben. Die durchschnittliche Neuritenlänge der Neurone auf PLL wurde gleich 100 % gesetzt. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Anzahl der Messwerte:  $n = 12$  pro Gruppe; Statistik:  $^{***}/\#\#\#$   $p < 0,001$ ; Rauten beziehen sich auf L1-Fc; ausgewertet mit *Duncan's multiple range test* nach *two-way ANOVA* mit Substrat und Inhibitor als *between group* Faktoren.

Bei den Neuronen, die auf L1 ausgesät wurden, ist hingegen sowohl bei S3 als auch

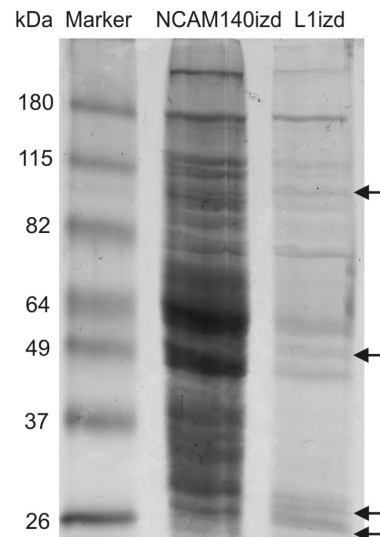
bei pS3 eine signifikante Reduktion der Neuritenlänge zu beobachten. Dabei hatte die Peptidkonzentration von 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  einen geringfügig stärkeren Effekt als die von 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Das Kontrollpeptid hatte keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum.

## 4.4 Neue L1-Interaktionspartner

### 4.4.1 Suche nach neuen intrazellulären L1-Bindungspartnern mittels

#### Affinitätschromatographie

Es sind bereits einige Proteine bekannt, die eine Verbindung von L1 zum Zytoskelett herstellen. Darunter sind z. B. Ankyrin oder Ezrin (vgl. 1.1.4). Um weitere Proteine zu identifizieren, die an der L1-vermittelten Neuritogenese bzw. dem Neuritenwachstum beteiligt sind, wurde eine Affinitätschromatographie mit der intrazellulären Domäne von L1 durchgeführt. Dazu wurde die rekombinant exprimierte L1izid kovalent an eine Säulenmatrix aus CNBr-aktivierter Sepharose gekoppelt und mit zytosolischer Fraktion sowie Membranfraktion aus Maushirn (postnatal, P0-P2) inkubiert. Als Kontrolle diente eine zweite Säule mit der immobilisierten intrazellulären Domäne von NCAM140. Die Eluate wurden elektrophoretisch getrennt, die Coomassie-gefärbten Proteinbanden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurden vier Banden ausgewählt, die nach Inkubation mit der zytosolischen Fraktion im Eluat nachgewiesen werden konnten und nicht in der NCAM-Kontrolle auftraten. Aus dem Eluat der Membranfraktion wurden zwei Banden zur Analyse gegeben, die wegen ihres geringen Proteingehaltes jedoch nicht ausgewertet werden konnten. Aus der Liste der gefundenen Proteine (siehe Tab. 4.2) wurden der *eukaryotic elongation factor 2* (eEF2) und Dynamin als interessanteste Kandidaten ausgewählt. eEF2 ist wichtig für die Proteinbiosynthese und wurde bereits in den Wachstumskegeln von Neuriten nachgewiesen. Die lokale Synthese von Proteinen in den Wachstumskegeln spielt eine wichtige Rolle bei Wachstums- und



**Abbildung 4.20:** Eluate der Affinitätschromatographie von zytosolischer Maushirnfraction und den intrazellulären Domänen von NCAM140 und L1 im Coomassie-gefärbten SDS-Gel. Die später ausgeschnittenen Banden sind mit Pfeilen markiert.

Migrationsprozessen, wie sie z. B. durch L1 vermittelt werden. Daher sollte der potentielle Zusammenhang zwischen eEF2 und L1 näher untersucht werden. Dynamin spielt eine wichtige Rolle bei der Clathrin-abhängigen Endozytose, indem es für die Abschnürung der Vesikel aus der Membran sorgt. Da diese Form der Endozytose auch wichtig für die Funktion von L1 ist, wurde eine potentielle Interaktion von L1 mit Dynamin weiter analysiert.

Die potentielle Bindung beider Proteine an die intrazelluläre Domäne von L1 wurde auf verschiedene Weise untersucht. In Co-Immunpräzipitations-, *crosslinking*- und *pull-down*-Experimenten aus der zytosolischen Fraktion konnte eine spezifische Interaktion jedoch nicht nachgewiesen werden.

Um weitere mögliche Bindungspartner von L1 zu finden, wurde die Affinitätschro-

**Tabelle 4.1:** Durch Massenspektrometrie identifizierte Proteine aus dem Eluat der L1zid-Affinitätschromatographie

kDa	Protein	Gewebespezifität/subzelluläre Lokalisation	Funktion
26	Hämoglobinuntereinheit beta1/beta2-epsilonY2 <i>Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 5</i>	rote Blutkörperchen Zellkern	Sauerstofftransport Komponente des <i>cleavage factor Im</i> -Komplexes, der an der prä-mRNA-Prozessierung beteiligt ist
28	<i>Proline Synthetase co-transcribed bacterial homolog protein</i> 14-3-3 zeta/delta/gamma	Zytoplasma Zytoplasma	nicht bekannt Adapterprotein
50	Kreatinkinase B	Zytoplasma	wichtiges Enzym im Energiestoffwechsel
95	<i>eukaryotic elongation factor 2</i> Dynamin1/3	Zytoplasma Zytoplasma, Zytoskelett	Translation Vesikeltransport, Endozytose

matographie mit den intrazellulären Domänen von L1 und NCAM140 mit einer Fraktion aus angereicherten Wachstumskegeln aus postnatalem Maushirn (P0-P2) durchgeführt. Dazu wurden die in der Wachstumskegel-angereicherten Fraktion befindlichen Proteine zunächst mit 1,0 % CHAPS solubilisiert. Anschließend wurde der Detergenzgehalt auf 0,5 % reduziert und die Fraktion auf die Säulen gegeben. Die Fraktionen wurden 24 h zirkulierend auf der Säule inkubiert. Anschließend wurde mit einem Puffer mit saurem pH eluiert. Die Eluate enthielten jedoch nach dem Einengen keine Proteine, die mit Coomassie- oder Silberfärbung detektierbar waren.

#### 4.4.2 Suche nach neuen intrazellulären L1-Bindungspartnern mittels *crosslinking*

Nachdem mit Hilfe der Affinitätschromatographie keine Proteine aus den Wachstumskegeln als mögliche L1-Bindungspartner isoliert werden konnten, wurde ein *crosslinking*-Versuch mit Sulfo-SBED durchgeführt. Dabei wurde die intrazelluläre Domäne von L1 mit dem *crosslinker* kovalent verknüpft und zur solubilisierten Wachstumskegelfraktion und zu Hirnhomogenat gegeben. Mit Hilfe von magnetischen Streptavidin-Kügelchen wurden die Bindungspartner isoliert. Als Negativkontrolle wurde die Fraktion nur mit Streptavidin-Kügelchen inkubiert. Die Eluate wurden auf ein SDS-Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen und die Proteine mit Silberfärbung visualisiert. Hier konnten jedoch keine Unterschiede zwischen der intrazellulären Domäne von L1 und der Negativkontrolle ausgemacht werden. Die Eluate zeigten ein identisches Bandenmuster, so dass keine spezifischen Banden ausgeschnitten und analysiert werden konnten.

## 5 Diskussion

Das Zelladhäsionsmolekül L1 spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung und bei Lern- und Gedächtnisprozessen. Dabei wirkt es zum einen als Vermittler von Zell-Zell-Kontakten, zum anderen als Signalmolekül. In der letztgenannten Funktion interagiert L1 mit vielen intrazellulären Proteinen, die die Dynamik des Zytoskeletts der Zelle beeinflussen. Darunter sind die Rho-GTPasen sowie verschiedene Mikrotubuli- und Aktin-assoziierte Proteine. In dieser Arbeit wurden einige dieser Proteine auf ihre Interaktion mit L1 hin untersucht, wobei die L1-vermittelten Prozesse Neuritogenese und Neuritenwachstum im Vordergrund standen.

### 5.1 L1 und Lis1

Die GFAP/L1-Maus exprimiert L1 ektopisch in Astrozyten. Eine Analyse der mRNA in den Hippocampi dieser Mäuse zeigte, dass die Menge der für das Protein Lis1 codierenden mRNA im Vergleich zum Wildtyp 7fach erhöht war. Lis1 ist ein wichtiges Protein bei der Zellmigration. Fehlt es oder ist es durch Mutationen in seiner Funktion eingeschränkt, kommt es zu einer Fehlentwicklung des Kortex, der sogenannten Lissenzephalie. Diese Fehlentwicklung beruht zum einen auf einer gestörten Migration der Neurone, aus der eine desorganisierte Laminierung des Kortex folgt. Zum anderen ist die Zahl der Neurone verringert, was zum Fehlen der Faltungen des Kortex (Agyrie oder Pachygyrie) führt<sup>[62, 64, 234, 252]</sup>.

T. Schneegans untersuchte im Rahmen ihrer Doktorarbeit den möglichen Zusam-



menhang zwischen L1 und Lis1. Eine direkte Interaktion der beiden Proteine konnte durch Co-Immunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die L1-abhängige Neuritogenese durch Punktmutationen in Lis1 reduziert wurde<sup>[260]</sup>. Diese Punktmutationen unterbinden die Bindung von Lis1 an Nde1, einem Protein, das für die Translokation des Zellkerns während der Zellmigration wichtig ist<sup>[78,203,252]</sup>. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Nde1 als Adapterprotein die Verbindung zwischen L1 und Lis1 herstellt, und ob diese Interaktion ebenfalls die L1-abhängige Neuritogenese beeinflusst. Neben Nde1 könnte auch DCX eine Verbindung zwischen L1 und Lis1 darstellen. DCX bindet an Lis1 und besitzt ähnliche Funktionen<sup>[97,219,277]</sup>. Zudem konnte bereits eine Interaktion von DCX mit Neurofascin, ein Mitglied der L1-Familie, nachgewiesen werden. Die Bindung erfolgt über ein Motiv, welches sich auch in der intrazellulären Domäne von L1 findet (phospho-FIGQY)<sup>[146]</sup>. Dies spricht dafür, dass auch L1 an DCX bindet.

Mit Hilfe verschiedener Tests wurde versucht, eine direkte Interaktion zwischen L1 und Nde1 bzw. DCX nachzuweisen. Dabei wurden unterschiedliche Maushirnfraktionen verwendet, um zu berücksichtigen, dass L1-Nde1- bzw. L1-DCX-Komplexe möglicherweise nur in bestimmten subzellulären Kompartimenten existieren. In keinem der Tests konnte jedoch eine direkte Interaktion der Proteine beobachtet werden.

Neben einer Interaktion wurde auch der Einfluss von Nde1 auf die L1-abhängige Neuritogenese untersucht. Um den Versuch mit den Ergebnissen aus der Arbeit von T. Schneegans zu vergleichen, sollten auch hier hippocampale Neurone aus der Maus transfiziert werden. Ein dominant-negatives Nde1-Konstrukt wurde von Y. Feng, Boston/USA, zur Verfügung gestellt. Die Transfektion der Neurone erwies sich jedoch als schwierig. Die DNS wurde mit Hilfe des Nukleofektionssystems der Firma amaxa, Köln, in die Zellen transferiert. Die Neurone schienen durch die Elektroporation zu einem großen Teil so gestresst, dass sie die Prozedur entweder nicht überlebten, oder nach dem Ausplattieren keine Neuriten ausbildeten. Auch die Effizienz

der Transfektion, die durch die Co-Transfektion eines eGFP-Konstruktes kontrolliert wurde, war zunächst mangelhaft (< 1 %). Zur Verbesserung der Vitalität der Zellen und der Transfektionseffizienz wurden verschiedene Protokolle getestet. Dabei wurde u. a. das zur Dissoziation der Neurone eingesetzte Enzym gewechselt, die Wasch- und Inkubationszeiten während der Primärkultur verkürzt, unterschiedliche Medienzusätze getestet und verschiedene Transfektionsprogramme angewandt. Zudem wurde die Zahl der transfizierten und ausplattierten Zellen variiert und Zellkulturgefäße mit unterschiedlichen Oberflächen verwendet. Weiterhin wurde besonderer Wert auf die Reinheit der eingesetzten Plasmide gelegt, wobei durch Fällungen und Extraktionen Proteinverunreinigungen und Endotoxine entfernt wurden. Alle diese Maßnahmen führten jedoch nicht zum gewünschten Ergebnis. Zwar konnte die Zahl der überlebenden und transfizierten Zellen erheblich gesteigert werden, diese zeigten aber zumeist kein für die Auswertung des Versuches ausreichendes Neuritenwachstum. In einem einzigen Fall konnte die Neuritogenese nach Transfektion der Neurone mit dem dominant-negativen Nde1-Konstrukt untersucht werden. Auch bei diesem Versuch war jedoch die Qualität der Zellkultur nicht optimal und die Anzahl der Zellen mit Neuriten sowohl auf L1-Fc als auch auf PLL sehr gering. Zu beobachten war eine reduzierte Neuritogenese auf L1 nach Hemmung der Lis1-Nde1-Bindung durch das dominant-negative Nde1-Konstrukt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Daten von T. Schneegans, die zeigen konnte, dass Mutationen in Lis1, die die Bindung an Nde1 verhindern, ebenfalls zu einer Reduktion der Neuritogenese auf L1 führen. Jedoch muss gesagt werden, dass die mit dem dominant-negativen Nde1-Konstrukt erhaltenen Daten aus den oben genannten Gründen nur als vorläufig bezeichnet werden können. Dennoch lassen die beiden Neuritogenese-Versuche den Schluss zu, dass die L1-vermittelte Neuritogenese u. a. auch über Lis1- und Nde1-abhängige Prozesse ausgelöst wird.

Da in dieser Arbeit keine direkte Interaktion zwischen L1 und Lis1 bzw. Nde1 nach-

gewiesen werden konnte, sich aber dennoch Effekte bei der Neuritogenese zeigen, scheinen andere Proteine die Interaktion zu vermitteln. DCX scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit diese Funktion nicht auszuüben. Ein möglicher molekularer Vermittler ist hingegen *Ran-binding protein M* (RanBPM), ein Adapterprotein, welches Membranproteine mit intrazellulären Signalwegen verknüpft. RanBPM interagiert mit der GTPase Ran und dem GEF Sos<sup>[202,295]</sup>. Durch letztgenannte Interaktion wird der Ras/ERK Signalweg stimuliert<sup>[295]</sup>. Cheng *et al.* wiesen durch *yeast two-hybrid screens* und *pull-downs* eine direkte Bindung der intrazellulären Domäne von L1 an RanBPM nach. Sie untersuchten ferner den Einfluss von RanBPM auf das L1-abhängige Neuritenwachstum und zeigten, dass dominant-negatives RanBPM eine leichte Reduktion der Neuritenlänge hervorruft. Weiterhin wird durch dominant-negatives RanBPM die L1-vermittelte Aktivierung von ERK um etwa die Hälfte reduziert<sup>[46]</sup>.

Neben L1 bindet RanBPM auch *disrupted in schizophrenia 1* (DISC1), ein bei vielen Schizophreniepatienten defektes Protein<sup>[25]</sup>. DISC1 beeinflusst das Neuritenwachstum und ist an der Entwicklung des cerebralen Kortex beteiligt<sup>[138,213]</sup>. Es bindet an verschiedene Zytoskelett-assoziierte Proteine, u. a. auch Lis1, Ndel1 und Nde1<sup>[27,28,200]</sup>. Lis1 und Nde1 werden mit Hilfe von DISC1 in axonale Bereiche und zum MTOC rekrutiert, wo sie das Auswachsen von Axonen bzw. die Kerntranslokation beeinflussen<sup>[279]</sup>. Die subzelluläre Lokalisation von DISC1 scheint diese Funktion zu unterstützen. Immunfärbungen zeigten eine punktuelle Verteilung am MTOC und in den Neuriten, die durch die bei Schizophrenie auftretende Mutation des Proteins aufgelöst wird. Diese Mutation verhindert auch die Bindung von DISC1 an Ndel1<sup>[200]</sup>.

Eine Interaktion von L1 und RanBPM könnte also neben der Aktivierung des bereits beschriebenen ERK-Signalweges auch über den DISC1-Lis1-Nde1-Komplex das Neuritenwachstum regulieren. Die Ergebnisse von T. Schneegans und die vorläufi-

gen Daten dieser Arbeit zur L1-abhängigen Neuritogenese nach Inhibition der Lis1-Nde1-Bindung weisen in diese Richtung. Um dem weiter nachzugehen, wären weitere Untersuchungen zur Auswirkung von DISC1 auf die L1-vermittelte Neuritogenese notwendig.

Hinweise auf eine weitere Möglichkeit, wie L1 und Lis1 funktionell zusammenhängen, ergeben sich aus einer Studie von Kholmanskikh *et al.*<sup>[143]</sup>. Bei der Untersuchung von Lis1-heterozygoten *knock-out*-Mäusen (Lis1<sup>+/-</sup>) wurde ein reduzierter Anteil an filamentösem Aktin (F-Aktin) in Neuronen und eine gestörte Zellmigration beobachtet. In diesem Zusammenhang wurde auch eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Aktivität der Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA festgestellt. Rac1 und Cdc42 zeigten in *knock-out*-Tieren eine geringere Aktivität, wohingegen die Aktivität von RhoA erhöht war. Die Hemmung von RhoA mit Hilfe von Y-27632, einem Inhibitor der RhoA nachgeschalteten Kinase p160ROCK, führte zu einer Normalisierung der Aktin-Polymerisation und der Zellmigration<sup>[143]</sup>. Ob diese Effekte auch die L1-abhängige Neuritogenese beeinflussen, sollte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Neuritenwachstumsexperimenten an hippocampalen Neuronen untersucht werden. Dabei sollten die Neurone mit den mutierten Lis1-Konstrukten transfiziert werden. Die auf L1 ausgesäten Zellen sollten dann mit dem RhoA-Inhibitor behandelt und anschließend auf ihre Neuritogenese hin untersucht werden. Aus den oben genannten Gründen konnte das Experiment jedoch nicht durchgeführt werden. Somit lässt sich über den Einfluss von RhoA auf die durch L1 und Lis1 vermittelte Neuritogenese keine Angabe machen. In weiteren Studien konnten Kholmanskikh *et al.* zeigen, dass Lis1 über IQGAP1 an einen Komplex aus Mikrotubuli-Plus-Ende-Proteinen (CLIP-170, Dynactin, Dynein) und an aktives Rac1 und Cdc42 bindet. IQGAP1 liegt bei geringen Calciumkonzentrationen an Calmodulin gebunden vor, erst nach Einstrom von Calciumionen wird es freigesetzt und kann an der Komplexbildung teilnehmen. Durch den Proteinkomplex wird das wachsende Plus-Ende der

Mikrotubuli mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Das Fehlen von Lis1, IQGAP1 oder CLIP-170 führt zu einer Destabilisierung des Komplexes, wodurch die lokale Aktivität von Rac1 und Cdc42 in der Vorderkante des Wachstumskegels oder der wandernden Zelle reduziert wird<sup>[144]</sup>. Das L1-vermittelte Neuritenwachstum geht mit einem Calciumeinstrom in die Zelle einher<sup>[301]</sup>. Auf diesem Wege könnte es auch zur Bildung des oben genannten Komplexes kommen, durch den die Neuritenwachstum und Migration gefördert wird.

## 5.2 L1 und Rho-GTPasen

Rho-GTPasen sind wichtige Regulatoren des Aktinzytoskeletts. Da viele Funktionen von L1 auf einer Reorganisation des Zytoskeletts beruhen, ist ein funktioneller Zusammenhang zwischen L1 und den Rho-GTPasen wahrscheinlich. Daher untersuchte S. Gensler im Labor von C. Dotti (Universität Leuven) eine mögliche Interaktion. Er konnte zeigen, dass L1 mit Rac1 und Cdc42 in den Wachstumskegeln hippocampaler Neurone der Ratte co-lokalisiert ist, RhoA hingegen nicht. Ebenfalls konnten Rac1 und Cdc42 mit Hilfe eines Antikörpers gegen L1 aus einer Wachstumskegelfraktion aus hippocampalen Neuronen der Ratte mit L1 co-immunpräzipitiert werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss von L1 auf die Aktivität der Rho-GTPasen untersucht. Zunächst wurden Maushirnhomogenate von L1-defizienten Tieren auf die Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 hin untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Es ist denkbar, dass sich das Fehlen von L1 und damit eines Neuritenwachstum-stimulierenden Faktors negativ auf die Aktivität der genannten Rho-GTPasen auswirkt. Es zeigte sich jedoch, dass sich die Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 im *knock-out*-Gehirnhomogenat nicht vom Hirnhomogenat aus Wildtypen unterscheiden. Die Werte streuen sehr stark, woraus sich im Durchschnitt ähnliche Aktivitäten in beiden Genotypen ergeben. Auch die Ge-

samtmenge von Rac1 und Cdc42 im L1-*knock-out*-Gehirnhomogenat entspricht der des Wildtypen. Es ist möglich, dass durch den Einsatz eines Gesamthirnhomogenates eventuelle Unterschiede der Rho-GTPase-Aktivität in einzelnen Hirnregionen verdeckt werden. Je nach Hirnregion befinden sich die entsprechenden Zellen in unterschiedlichen Phasen, z. B. Migration oder Synapsenbildung, und zeigen somit auch unterschiedliche Aktivitätsmuster der Rho-GTPasen. Die Bestimmung der Aktivitäten in den einzelnen Hirnregionen könnte Aufschluss darüber geben. Praktisch ist dieser Ansatz jedoch schlecht umzusetzen, da während der Präparation der Hirnteile bereits die Hydrolyse des Rho-GTPase-gebundenen GTPs zu GDP beginnt und die tatsächliche Aktivität somit verfälscht wird.

Als weiterer Versuch zur Untersuchung des Einflusses von L1 auf die Funktion von Rac1 und Cdc42 wurden Kleinhirneurone mit einem L1-Antikörper (557) stimuliert. Der Antikörper bewirkt ein vermehrtes Neuritenwachstum<sup>[7]</sup>. Die Bestimmung der Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 erwies sich in diesem Modell jedoch als schwierig, da die Mengen der aktiven Rho-GTPasen im Zellysate relativ gering und dadurch im Western-Blot am Rande der Detektionsgrenze waren. Im Falle der ermittelten Rac1-Aktivität zeigt sich im Durchschnitt keine Änderung der Aktivität nach L1-Stimulation im Vergleich zur unspezifischen IgG-Kontrolle. Bei Cdc42 ergab das einzige auswertbare Experiment eine höhere Aktivität nach L1-Stimulation.

Schmid *et al.* konnten in einem ähnlichen Experiment mit B35-Neuroblastom-Zellen einen Anstieg der Rac1-Aktivität nach Stimulation mit einem L1-spezifischen Antikörper beobachten<sup>[257]</sup>. Zudem zeigten sie, dass der für das L1-stimulierte Neuritenwachstum wichtige MAP-Kinase-Signalweg durch dominant-negatives Rac1 gestört wird, nicht jedoch durch dominant-negatives Cdc42 oder RhoA. Eine Aktivierung von Rac1 ist in B35-Neuroblastom-Zellen also wichtig für das L1-vermittelte Neuritenwachstum. Eine weitere in diesem Kontext interessante Studie wurde von Payne *et al.* durchgeführt. Sie untersuchten die Morphologien von retinalen

Ganglienzellen des Huhns, die sie u. a. auf L1 aussäten. Die Wachstumskegel der Zellen auf L1-Substrat zeigten eine fächerartige Struktur mit weiten Lamellipodien und eine insgesamt größere Fläche als die Zellen, die auf Laminin wuchsen<sup>[214]</sup>. Die lamellenartigen Strukturen weisen auf eine vermehrte Aktivität von Rac1 hin. Zudem zeigten Schmid *et al.* einen Anstieg der PI3-Kinase-Aktivität nach L1-Stimulation. PI3-Kinase ist ein Aktivator von Rac1 und Cdc42. Das PI3-Kinase-Produkt Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) bindet an die PH-Domäne der GEFs Tiam1, Sos und Vav<sup>[109,225]</sup> und bewirkt so die Aktivierung der Rho-GTPasen. Dass Vav-2 durch L1-Stimulation aktiviert wird, konnte in B35-Neuroblastom-Zellen bereits gezeigt werden<sup>[256]</sup>. In Kleinhirnneuronen wurde ein ähnlicher Mechanismus des L1-Signalweges beobachtet.<sup>[171]</sup> Durch Inhibition von Src-Kinase, PI3-Kinase und MAP-Kinase (ERK) wurde die L1-abhängige Neuritogenese gehemmt. Zudem zeigten Kleinhirnneurone, die auf L1 ausgesät wurden, eine erhöhte ERK-Aktivität im Vergleich zu Zellen auf PLL als Kontrolle. Möglicherweise wird auch in Kleinhirnneuronen eine erhöhte Rac1-Aktivierung durch L1-Stimulation ausgelöst. Dies konnte in dieser Arbeit aus den oben genannten Gründen leider nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die in einem Fall verringerte Rac1-Aktivität nach L1-Stimulation der Kleinhirnneurone lässt sich eventuell auf Zellstress zurückführen, der meist zu einer Verringerung der Expression verschiedener Proteine führt und Apoptose auslösen kann. Ein Kontrollversuch zur Caspase-3-Aktivität lieferte jedoch keine Hinweise auf Apoptose.

Obwohl dominant-negatives Cdc42 sich nicht auf die Aktivierung des MAP-Kinase Weges auswirkt<sup>[257]</sup>, weisen die Daten von S. Gensler und C. Dotti dennoch auf einen Zusammenhang von Cdc42 und L1 hin. Die Aktivität von Cdc42 führt zur Ausbildung von Filopodien. Dies wurde in auf L1 wachsenden Wachstumskegeln nicht verstärkt beobachtet<sup>[214]</sup>. Cdc42 spielt jedoch eine Rolle bei der Exozytose, die durch *tetanus neurotoxin-insensitive vesicle associated membrane protein* (TI-

VAMP) vermittelt wird. TI-VAMP ist ein in Wachstumskegeln angereichertes Protein, welches für Exozytose und Vesikeltransport wichtig ist<sup>[89]</sup>. Alberts *et al.* konnten zeigen, dass TI-VAMP für das Neuritenwachstum in PC12-Zellen und in hippocampalen Neuronen benötigt wird. TI-VAMP ist mit L1 in hippocampalen Neuronen und in PC12-Zellen co-lokalisiert und beeinflusst zudem die L1-Lokalisation in der Plasmamembran sowie die L1-vermittelte Adhäsion<sup>[4]</sup>. Cdc42 reguliert den Transport von TI-VAMP in die peripheren Bereiche des Wachstumskegels. Es scheint möglich, dass Cdc42 durch die Stimulation von L1 aktiviert wird und dadurch die Bewegungsrichtung des Wachstumskegels gesteuert wird.

Um das Problem der geringen Proteinkonzentration im Kleinhirnneuronenlysat zu umgehen, wurde die Analyse der Rho-GTPase-Aktivität nach L1-Antikörper-Stimulation auch mit N2a-Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Rac1-Aktivität nach L1-Antikörper-Stimulation erhöht war. Dies entspricht den Beobachtungen von Schmid *et al.* bei B35-Neuroblastom-Zellen<sup>[257]</sup>. Bei Cdc42 konnte hingegen keine Änderung der Aktivität durch den L1-Antikörper detektiert werden. Hier konnten jedoch nur zwei Experimente ausgewertet werden. Bei Experimenten mit Krebszellen muss beachtet werden, dass sie über ein anormales Wachstumsverhalten verfügen, in das auch die Rho-GTPasen involviert sind<sup>[71,248]</sup>. Eine verstärkte Expression der Rho-GTPasen erleichtert einerseits die Detektion, wovon die vorliegende Arbeit profitierte, andererseits könnten die Effekte der L1-Stimulation dadurch auch verdeckt werden. Dies könnte bei der hier ermittelten Cdc42-Aktivität der Fall sein. Der Einsatz von primär kultivierten Neuronen ist daher in jedem Falle vorzuziehen.

Wie bereits erwähnt, spielt Cdc42 keine Rolle bei der durch L1 hervorgerufenen Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges<sup>[257]</sup>. Eine mögliche Rolle von Cdc42 beim L1-Recycling, die wie oben beschrieben durch TI-VAMP vermittelt werden könnte, ließe sich durch Oberflächenbiotinylierungen oder Immunfluoreszenzfärbungen von



L1 in Zellen, die mit dominant-negativem Cdc42 transfiziert wurden, untersuchen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Cdc42-Aktivität nach L1-Antikörper-Stimulation weisen jedoch nicht eindeutig darauf hin, dass Cdc42 durch L1 aktiviert wird. Um dies eindeutig bestimmen zu können, müssten zunächst weitere Stimulations-Experimente durchgeführt werden.

Neben Rac1 und Cdc42 wurde auch der Einfluss von RhoA auf L1 und seine Funktionen untersucht. RhoA ist u. a. in endo- und exozytotische Vorgänge involviert<sup>[73, 93, 220]</sup>. Moore *et al.* konnten zeigen, dass durch die Hemmung von RhoA der Rezeptor DCC vermehrt an die Zelloberfläche von Neuronen transportiert wird<sup>[197]</sup>. Zusätzlich führt die Bindung des DCC-Liganden Netrin-1, einem für das Axonwachstum wichtigen chemotaktischen Protein, zu einer Hemmung von RhoA. L1 fungiert ebenfalls als Rezeptor. Die Bindung von Semaphorin3A, einem chemorepulsiven Molekül, an L1 und die weiteren Rezeptorkomponenten Neuropilin-1 und Plexin führt zu einem Rückzug des Wachstumskegels<sup>[39]</sup>. Nach Fournier *et al.* spielt Endozytose dabei eine wichtige Rolle. Sie konnten zeigen, dass die Aufnahme von fluoreszenzmarkiertem Dextran in Hinterwurzelganglien nach Semaphorin3A-Zugabe stark erhöht war<sup>[84]</sup>.

Um zu untersuchen, ob die Oberflächenlokalisierung von L1 ähnlich wie die von DCC RhoA-abhängig ist, wurde die Menge an L1 in der Plasmamembran von Kleinhirneuronen nach Y-27632-Behandlung bestimmt. Zur Aktivierung von L1-abhängigen Prozessen wurden die Zellen zudem mit dem L1-Antikörper 557 stimuliert. Dabei zeigte sich zunächst, dass sich nach der Stimulation mit dem L1-Antikörper weniger L1 an der Zelloberfläche befand. Die Behandlung mit dem RhoA-Inhibitor bewirkte hingegen eine vermehrte Rekrutierung von L1 in die Zellmembran, ähnlich den Beobachtungen von Moore *et al.* in Bezug auf DCC.

Der 557-Antikörper bewirkt die Aktivierung von L1-Signalkaskaden, die zum Auswachsen von Neuriten führen. Schmid *et al.* und Schaefer *et al.* untersuchten diesen

Signalweg, der dem L1-vermittelten Neuritenwachstum zugrunde liegt, genauer. Die Aktivierung von L1 durch spezifische Antikörper oder durch homophile Interaktion mit weiteren L1-Molekülen führt demnach zur Dynamin-vermittelten, Clathrin-abhängigen Endozytose von L1<sup>[254,257]</sup>. Dabei spielt die Aktivität der Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup> eine wichtige Rolle. Die Hemmung von pp60<sup>c-src</sup> führt zu einer verminderten Endozytose von L1 und reduziertem Neuritenwachstum<sup>[127,257]</sup>. Schaefer *et al.* zeigten ferner, dass pp60<sup>c-src</sup> die intrazelluläre Domäne von L1 phosphoryliert und damit eine Bindung von L1 an den Clathrinadapter AP-2 unterbunden wird<sup>[253]</sup>. Die durch Dynamin und pp60<sup>c-src</sup> regulierte Endozytose von L1 resultiert in einer Signalkaskade, in die ausserdem die PI3-Kinase, MEK und ERK involviert sind und die schließlich zum Neuritenwachstum führt<sup>[171,254,257]</sup>. Durch die Endozytose wird die Adhäsion von L1 vermindert und somit ein Fortbewegen des Wachstumskegels bzw. des Neuriten erleichtert.

Die Vorbehandlung mit dem RhoA-Inhibitor Y-27632 bewirkte nach der L1-Antikörper-Stimulation eine Zunahme der L1-Menge in der Plasmamembran von Kleinhirneuronen. Diese Daten belegen einen Einfluss von RhoA auf das L1-Recycling. Die Rolle von RhoA könnte dabei in der Reorganisation des Aktinnetzwerkes unterhalb der Zellmembran liegen. Bei der Clathrin-unabhängigen Endozytose ist die Funktion von RhoA bereits untersucht worden. RhoA ist für die Phagozytose des Typs II essentiell, indem es über die Aktivierung von ROCK den Arp2/3 Komplex an den Ort der Phagozytose lenkt. Arp2/3 katalysiert dort die Bildung von Aktinfilamenten und ist wichtig für die Aufnahme der Partikel<sup>[182]</sup>. Bei der Clathrin-abhängigen Endozytose, über die auch L1 internalisiert wird<sup>[137]</sup>, ist die Funktion von RhoA noch nicht genau geklärt. Lamaze *et al.* zeigten, dass konstitutiv-aktives RhoA die Endozytose des Transferrinrezeptors hemmt<sup>[158]</sup>. Die RhoA-Hemmung in chromaffinen Zellen führte zu einer Auflösung der Aktinfasern und erhöhter Exozytose<sup>[94]</sup>. Aus weiteren Studien geht hervor, dass nicht der reine Abbau des Aktinnetzwerkes

für die Exozytose wichtig ist, sondern eher eine Umorganisation der Aktinfilamente stattfindet<sup>[159,206]</sup>. Neben der Umorganisation des Zytoskeletts reguliert RhoA auch durch Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen die Endozytose. Bei der Internalisierung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) verhindert durch RhoA aktivierte ROCK die Bildung eines Proteinkomplexes, der für die EGFR-Endozytose wichtig ist. Dies führt zu einer verminderten Aufnahme des EGFR in die Zelle<sup>[139]</sup>. Über welchen Mechanismus RhoA die L1-Endozytose reguliert, bleibt noch zu klären. Dabei könnten beide Wege, die Reorganisation des Aktinnetzwerkes einerseits und die (In-)Aktivierung weiterer Proteine andererseits, eine Rolle spielen.

Zusätzlich zur Oberflächenlokalisierung von L1 wurde auch der Einfluss von RhoA auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum bzw. die Neuritogenese von Kleinhirnneuronen untersucht. Dabei zeigte sich, dass RhoA das L1-abhängige Neuritenwachstum nicht beeinflusst. Allerdings ist die Neuritogenese nach Zugabe des Inhibitors Y-27632 deutlich erhöht, wobei dieser Effekt sowohl auf PLL als auch auf L1-Fc als Kultursubstrat zu beobachten ist. Eine Erklärung für diesen Effekt beschreibt die Arbeit von Bito *et al.*<sup>[24]</sup>. Sie charakterisierten den Einfluss von RhoA auf das Wachstum von Kleinhirnneuronen, die auf Matrigel ausgesät wurden. Matrigel ist eine aus einem Maustumor extrahierte, die extrazelluläre Matrix nachbildende Proteinmischung, deren Hauptbestandteile Laminin, Collagen IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykane sind. Zusätzlich sind einige Wachstumsfaktoren enthalten. Bei den auf Matrigel ausgesäten Neuronen führte konstitutiv-aktives RhoA zu einer reduzierten Anzahl von Neuriten, welche durch Zugabe von Y-27632 wieder normalisiert werden konnte. Die Länge der Neuriten wurde weder durch das überaktive RhoA noch durch den RhoA-Inhibitor beeinflusst. Eine genauere Beobachtung der Anfangsphase des Neuritenwachstums ergab, dass die Behandlung mit Y-27632 die Umwandlung eines Filopodiums in ein Axon förderte. Dies legt den Schluss nahe, dass RhoA ein Regulator der Initiation des Neuritenwachstums ist. In dieser Arbeit

wurde gezeigt, dass dies auch bei der L1-vermittelten Neuritogenese der Fall ist, der Effekt jedoch nicht L1-spezifisch ist. Bito *et al.* zeigten ferner, dass die LIM-Kinase durch ROCK aktiviert wird. Eine Inhibition der LIM-Kinase-Aktivität führte ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl von Neuriten<sup>[24]</sup>. Somit könnte RhoA über ROCK und LIM-Kinase die Aktivität von Cofilin (vgl. 5.3 und 1.2.2) regulieren, was zu einer Polarisierung der Zelle und schließlich zum Ausbilden von Neuriten führen könnte<sup>[91,129]</sup>.

### 5.3 L1 und Cofilin

Cofilin wurde bereits in mehreren Studien als wichtiger Faktor für das Neuritenwachstum identifiziert<sup>[16,152,184]</sup>. Als Modulator des Zytoskeletts könnte Cofilin auch das L1-vermittelte Neuritenwachstum und die Neuritogenese regulieren. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine potentielle Interaktion der beiden Proteine untersucht.

Zu diesem Zweck wurden zunächst verschiedene Experimente zur Untersuchung einer direkten Interaktion durchgeführt. Dabei konnte weder *in vivo* noch *in vitro* eine Bindung von L1 an Cofilin nachgewiesen werden. Dies wurde durch Co-Immunpräzipitationen, *pull-downs*, *crosslinking*-Experimente und ELISA-Tests gezeigt.

Unabhängig von einer direkten Interaktion könnte Cofilin die Funktionen von L1 indirekt als *downstream*-Vermittler beeinflussen. Daher wurde die Expression und die Phosphorylierung von Cofilin in L1-defizientem Maushirn untersucht. In Gesamthirnhomogenat zeigte sich weder bei der Expression noch bei der Phosphorylierung von Cofilin ein Unterschied zwischen L1-*knock-out* und Wildtyp. Auch in den Wachstumskegeln, einem besonders wichtigen Ort für die L1 und die Cofilin-Funktion, wurden keine Unterschiede in Expression und Phosphorylierung von Co-

filin zwischen den Genotypen beobachtet. Zusätzlich wurden verschiedene Hirnbe-  
reiche präpariert und untersucht, wobei sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied  
in Expression und Phosphorylierung von Cofilin zwischen L1-*knock-out* und Wildtyp  
beobachten ließ. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten weisen darauf hin,  
dass die Abwesenheit von L1 keine Auswirkungen auf die Expression oder Aktivität  
von Cofilin im Mausgehirn hat.

Um zu untersuchen, ob eine durch L1 ausgelöste Signalkaskade einen Einfluss auf  
die Aktivität von Cofilin ausübt, wurden Kleinhirnneurone mit dem monoklonalen  
L1-Antikörper 557 stimuliert und die Phosphorylierung von Cofilin bestimmt. Es  
zeigte sich, dass nach zweiminütiger Stimulation eine deutliche Abnahme der Phos-  
phorylierung vorlag, Cofilin also aktiviert wurde. Das gleiche Ergebnis ergab sich  
nach einer Stimulation von Wachstumskegeln mit dem 557-Antikörper.

Der Wechsel zwischen phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Cofilin wird  
durch verschiedene Stimuli beeinflusst. Dadurch kann die Aktivität von Cofilin  
innerhalb der Zelle räumlich und zeitlich kontrolliert werden. Auch spielt der  
Zell- und Gewebetyp bei der Antwort auf extrazelluläre Signale eine Rolle. Für  
verschiedene neuronale Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Faktoren, die das  
Neuritenwachstum fördern, wie z. B. Wachstumsfaktoren, hohe cAMP- oder Calci-  
umkonzentrationen, zu einer Dephosphorylierung von Cofilin führen<sup>[185,311]</sup>. Das  
Neuritenwachstum hemmende Substanzen bewirken hingegen eine Phosphorylie-  
rung/Inaktivierung des Proteins<sup>[185]</sup>. Die Dephosphorylierung von Cofilin kann auf  
unterschiedlichen Wegen ausgelöst werden. Die durch Wachstumsfaktoren hervor-  
gerufene Dephosphorylierung von Cofilin wird durch die Aktivierung des MAP-  
Kinase-Signalweges und der LIM-Kinase hervorgerufen. Zum anderen führt der  
Anstieg des lokalen Ca<sup>2+</sup>-Spiegels zur Aktivierung von Calcineurin und der SSH-  
Phosphatase, welche Cofilin dephosphoryliert. Beide Prozesse, die Aktivierung des  
MAP-Kinase-Signalweges und eine erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, wurden auch nach

L1-Aktivierung beobachtet und könnten somit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekt erklären. Dafür spricht auch, dass die LIM-Kinase-Aktivität nach zweiminütiger Stimulation mit dem L1-Antikörper ebenfalls reduziert war. Dieses Ergebnis konnte aufgrund von Detektionsproblemen mit den entsprechenden Antikörpern jedoch nur zwei Mal gezeigt werden. Durch die Zugabe weiterer Inhibitoren, wie z. B. des Calcineurin-Inhibitors Cyclosporin A oder des Calciumchelators BAPTA, könnte auch der Einfluss des Calciumeinstroms nach L1-Aktivierung auf die Cofilin-Phosphorylierung überprüft werden. Zu erwarten wäre ein Ausbleiben der Dephosphorylierung nach L1-Antikörper-Stimulation, dies konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr eingehend untersucht werden.

Weitere Regulatoren der Cofilin-Aktivität sind die Rho-GTPasen. Rac1 und Cdc42 können die LIM-Kinase über PAK aktivieren, Rho erreicht dies über die Aktivierung von ROCK<sup>[5,70,208,272]</sup>. L1 könnte auch hier involviert sein, da es mit Rac1 und Cdc42 interagiert. In Kleinhirnneuronen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch keine Aktivierung von Rac1 durch L1-Stimulation beobachtet werden, für Cdc42 liegen keine ausreichenden Ergebnisse vor. In Neuroblastom-Zellen wurde Rac1 durch die L1-Stimulation aktiviert. Ob sich dies in diesem Zellsystem auf die Cofilin-Aktivität auswirkt, müsste noch untersucht werden.

L1 beeinflusst die Aktivität von Cofilin in Kleinhirnneuronen. Da Cofilin beim Neuritenwachstum eine wichtige Rolle spielt, wurde der Einfluss der Cofilinregulation auf das L1-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen ermittelt. Die Inhibition von Calcineurin durch Cyclosporin A führte zu einer Reduktion des L1-abhängigen Neuritenwachstums. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Lyons *et al.* und Chang *et al.*, die einen negativen Einfluss von Calcineurin-Inhibitoren auf das Neuritenwachstum zeigten<sup>[40,174]</sup>. Zusätzlich zu Cyclosporin A wurden Peptide eingesetzt, die die Cofilin-regulierenden Enzyme hemmen. Dabei wurden nach Aizawa *et al.* Peptide synthetisiert, die dem N-Terminus von Cofilin entsprechen, in-

klusive des für die Aktivität wichtigen Serin 3. Dieses Serin liegt in den Peptiden entweder unphosphoryliert (Peptid „S3“) oder phosphoryliert vor (Peptid „pS3“). Die beiden Peptide wirken als Kompetitoren für die LIM-Kinase (S3) bzw. SSH-Phosphatase (pS3), da sie, im Überschuss eingesetzt, die Enzyme blockieren und somit in ihrer Funktion hemmen. Als Kontrolle wurde ein Peptid mit der reversen S3-Sequenz eingesetzt, welches keinen Effekt auf die Cofilin-Aktivität besaß (Peptid „revS3“)<sup>[3]</sup>. Die Peptide zeigten keinen Einfluss auf die durchschnittliche Neuritenlänge auf PLL ausgesäeter Kleinhirnneurone. Auf L1-Fc bewirkten sowohl das S3- als auch das pS3-Peptid eine Reduktion der Neuritenlänge auf PLL-Niveau. Das Kontrollpeptid hatte keinen Effekt. Dies lässt den Schluss zu, dass die Regulation von Cofilin für das L1-abhängige Neuritenwachstum essentiell ist, und zwar sowohl die Inaktivierung durch die LIM-Kinase, als auch die Aktivierung durch die SSH-Phosphatase. Eine Studie von Meberg und Bamberg unterstützt diese Vermutung<sup>[184]</sup>. Sie untersuchten das Neuritenwachstum von kortikalen Neuronen, die XAC, die Cofilin-Form in *Xenopus*, überexprimierten. Sie konnten ein erhöhtes Neuritenwachstum feststellen. Eine konstitutiv-aktive Variante von XAC führte jedoch nicht zu einer weiteren Erhöhung des Neuritenwachstums, sondern die Neuritenlänge lag etwas unterhalb der mit dem wildtypischen XAC transfizierten Neurone. Zudem konnten Meberg und Bamberg feststellen, dass etwa 75 % des rekombinant exprimierten XAC in den Neuronen in phosphorylierter Form vorlag. Somit ist das erhöhte Neuritenwachstum nicht unbedingt auf eine vermehrte Aktivität von Cofilin zurückzuführen. Vielmehr ist das sogenannte *Phosphocycling* von Cofilin, also der Wechsel zwischen phosphorylierter und nichtphosphorylierter Form, für seinen Einfluss auf das Neuritenwachstum verantwortlich. Dies steht im Einklang mit den Erkenntnissen über die ständige Aktinpolymerisation und -Depolymerisation, die im auswachsenden Neuriten stattfindet<sup>[167]</sup> (vgl. 1.1.4). Eine strenge Regulation der (De-)Phosphorylierung von Cofilin wird dadurch erforderlich, die, wie in der vor-

liegenden Arbeit gezeigt, bei einem Ausfall das Neuritenwachstum erheblich stören kann.

#### 5.4 Neue L1-Interaktionspartner

Neben den bereits untersuchten L1-Interaktionspartnern Rac1, Cdc42 und Cofilin sollten in dieser Arbeit weitere potentielle Bindungspartner von L1, die die Regulation des Zytoskeletts beeinflussen, identifiziert werden. Als Methode wurde die Affinitätschromatographie gewählt, wobei die intrazelluläre Domäne von L1 als Köderprotein diente. Die mit der Säulenmatrix kovalent verknüpfte L1<sub>izd</sub> wurde mit verschiedenen Maushirnfractionen inkubiert und die gebundenen Proteine anschließend per *pH-shift* eluiert.

Aus der zytosolischen Maushirnfraction wurden einige Proteine, die an die L1<sub>izd</sub> gebunden hatten, isoliert und mit Hilfe der Massenspektrometrie identifiziert. Die Anwesenheit von 14-3-3-Proteinen im Eluat zeigt an, dass die Chromatographie erfolgreich verlief. 14-3-3 wurde bereits als spezifischer Bindungspartner der L1<sub>izd</sub> identifiziert<sup>[226]</sup>. Neben 14-3-3 fanden sich u. a. auch eEF2 und Dynamin im Eluat. eEF2 ist ein Elongationsfaktor, der für die Translokation der sich bildenden Proteinkette innerhalb des Ribosoms verantwortlich ist. Die Proteinsynthese der Zelle findet nicht nur im Soma, sondern auch in Axonen und Dendriten statt, wo Bestandteile der Translationsmaschinerie nachgewiesen wurden<sup>[56, 147, 218]</sup>. Dies ermöglicht den Neuriten, schnell auf veränderte äußere Bedingungen zu reagieren. Die lokale Proteinsynthese kann durch extrazelluläre Signalmoleküle aktiviert und somit z. B. die Menge von Rezeptoren in der Plasmamembran reguliert werden, wie es für den EphA2-Rezeptor in Kommissuralneuronen des Huhns nachgewiesen wurde<sup>[30]</sup>. Aus diesem Grund wurde eEF2 als potentieller L1-Interaktionspartner näher untersucht, da L1 als Zelladhäsionsmolekül und Rezeptor u. a. in die Axonwegfindung involviert



ist.

Es wurden verschiedene Interaktionstests durchgeführt, um die in der Affinitätschromatographie nachgewiesene Bindung zu verifizieren. Co-Immunpräzipitationen, *pull-downs* und *crosslinking*-Versuche zeigten jedoch keine spezifische Interaktion der L1izd mit eEF2. In vielen Fällen wurde eEF2 auch in den Negativkontrollansätzen gefunden, so dass die beobachtete Bindung an L1 eventuell unspezifisch sein könnte.

Das zweite hinsichtlich der biologischen Funktionen von L1 interessante Protein, welches im Eluat der Affinitätschromatographie identifiziert wurde, ist Dynamin. Dynamin ist eine Mikrotubuli-assoziierte GTPase, welche durch die Hydrolyse von GTP mechanische Kräfte erzeugen kann. Dynamin ist besonders wichtig bei endozytotischen Vorgängen, da es die Abschnürung von Vesikeln aus der Membran bewirkt<sup>[117,119]</sup>. Dynamin ist auch an der Clathrin-abhängigen Endozytose von L1 beteiligt. Somit ist eine direkte Interaktion der intrazellulären Domäne von L1 und Dynamin denkbar. Um dies weiter zu untersuchen, wurden auch hier Co-Immunpräzipitationen, *pull-downs* und *crosslinking*-Versuche durchgeführt. Leider konnte die bei der Affinitätschromatographie beobachtete Interaktion nicht bestätigt werden.

Neben der zytosolischen Maushirnfraction wurden auch eine solubilisierete Membranfraction und eine solubilisierete Wachstumskegel-angereicherte Maushirnfraction mit der immobilisierten L1izd auf der Säule inkubiert. In beiden Fällen war die Proteinkonzentration im Eluat so gering, dass entweder keine massenspektrometrische Analyse möglich war, oder keine Proteine im gefärbten SDS-Gel sichtbar waren. Der Einsatz von mehr Ausgangsmaterial brachte dabei keinen Erfolg.

Aus diesem Grund wurde auf einen anderen experimentellen Ansatz zurückgegriffen. Mit Hilfe des *crosslinkings* mit Sulfo-SBED sollten auch transiente oder weniger stabile Interaktionen der L1izd und ihren Bindungspartnern in einer solubilisierten,

Wachstumskegel-angereicherten Fraktion untersucht werden. Als Kontrolle diente hier ein Ansatz, der keine L1zd als Köder enthielt. Die Produkte des *crosslinking*-Ansatzes wurden per SDS-PAGE untersucht. Die Silberfärbung zeigte jedoch keinen Unterschied der Bandenmuster zwischen dem L1zd-Ansatz und der Kontrolle. Auch harschere Waschbedingungen und höhere Detergenzkonzentrationen änderten nichts an diesem Ergebnis. Daher wurden hier keine Banden per Massenspektrometrie untersucht.

Affinitätschromatographie und *crosslinking* sind zwei etablierte Methoden, um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen<sup>[83, 191, 230, 264, 287]</sup>. In dieser Arbeit wurde für diese Versuche die bakteriell exprimierte intrazelluläre Domäne von L1 verwendet. Dies ermöglichte die Produktion größerer Mengen Protein in konstanter Reinheit. Der Nachteil ist jedoch, dass posttranslationale Modifikationen, die möglicherweise für eine Bindung der intrazellulären Domäne an andere Proteine nötig sind, nicht durchgeführt werden. Eine Expression des Köderproteins in einem eukaryotischen Expressionssystem wäre in diesem Fall eventuell günstiger. Strukturelle Ursachen können ebenfalls dazu führen, dass keine spezifische Bindung an das Köderprotein stattfindet. Im Falle der intrazellulären Domäne von L1 ist dies jedoch eher unwahrscheinlich, da sie rein rechnerisch keine besonderen Sekundärstrukturelemente aufweist (Strukturvorhersage<sup>[47]</sup> nach <http://fasta.bioch.virginia.edu>, <http://bioserv.rpbs.jussieu.fr>, <http://www.imtech.res.in/cgibin/betatpred2>). Zudem spielt die Konzentration der eingesetzten Proteine eine wichtige Rolle. Um auch schwächere Bindungen zu detektieren, ist eine ausreichende Menge an Köderprotein sowie Hirnfraktion notwendig. In dieser Arbeit wurden 8 mg L1zd verwendet. Die vollständige Kopplung an die Säulenmatrix wurde mit Hilfe des BCA-Testes überprüft. Im Falle der zytosolischen Fraktion, die in der Regel einen relativ hohen Proteingehalt aufweist, könnte das Verhältnis Köder- zu Beuteprotein nicht hoch genug gewesen sein, um weitere spezifische Bindungen nachzuweisen. Bei Membran-

und Wachstumskegelfraktion hingegen könnte der umgekehrte Effekt eingetreten sein. Hier war der Proteingehalt der Hirnfraktionen eventuell zu gering, obwohl der Versuch auch mit größeren Mengen an Hirnfraktion durchgeführt wurde.

Alternative Methoden zur Detektion von bisher unbekanntem Protein-Protein-Wechselwirkungen sind beispielsweise der *yeast two-hybrid screen*<sup>[79]</sup>, *in vivo cross-linking*<sup>[271]</sup> oder die *tandem affinity purification* (TAP)<sup>[107]</sup>. Der *yeast two-hybrid screen* wurde bereits mit der intrazellulären Domäne von L1 durchgeführt und u. a. Ezrin als L1-Bindungspartner identifiziert<sup>[60]</sup>. Bei dieser Methode werden die Expressionsvektoren zweier Fusionsproteine in Hefezellen transformiert. Bei einer Interaktion der Proteine erfolgt die Expression eines Reporterproteins, was durch den Einsatz von Selektionsmedien oder durch einen Farbumschlag detektierbar ist. Beim *in vivo crosslinking* werden Säugerzellen mit dem Expressionsvektor des Köderproteins transfiziert und das Kulturmedium mit photoreaktiven Aminosäuren versetzt. Diese werden bei der Expression in das Köderprotein eingebaut. Werden die Zellen UV-Strahlung ausgesetzt, erfolgt eine kovalente Verknüpfung des Köderproteins mit seinen Bindungspartnern. Die *tandem affinity purification* ist eine weitere Methode zur Detektion von Interaktionen, die *in vivo* stattfinden. Dabei wird das Köderprotein als TAP-Fusionsprotein in die Zellen transfiziert. Mit Hilfe der TAP-Markierung lassen sich das Köderprotein und seine Bindungspartner aus dem Zelllysate isolieren. Der TAP-Marker kann daraufhin enzymatisch gespalten werden und die interagierenden Proteine werden mit hoher Spezifität gewonnen. Der Nachteil dieser Methode ist, dass transiente oder schwache Bindungen aufgrund der häufigen Waschschriffe nicht nachgewiesen werden können.

Das *in vivo crosslinking* oder die *tandem affinity purification* stellen gute Alternativen zum herkömmlichen *crosslinking* oder zur Affinitätschromatographie dar, die in dieser Arbeit angewandt wurden. Der Vorteil besteht darin, dass die Köderproteine in ihrem natürlichen Zustand, also inklusive posttranslationalen Modifikationen und

korrekter Faltung und Lokalisierung, vorkommen, und somit eine wesentlich höhere Spezifität gegeben ist als beim Einsatz prokaryotisch exprimierter Proteine. Es wäre daher sinnvoll, mit Hilfe dieser Methoden nach weiteren, bislang unbekanntem L1-Interaktionspartnern zu suchen.

### **Zusammenfassende Überlegungen**

Die Übermittlung von extrazellulären Signalen an das Zytoskelett ist eine wichtige Funktion des Zelladhäsionsmoleküls L1. Zusätzlich zu einigen in diesem Zusammenhang bereits bekannten Proteinen konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Moleküle identifiziert werden, die an diesem Prozess beteiligt sind. L1 beeinflusst mit Hilfe der Rho-GTPasen und des Aktin-polymerisierenden Proteins Cofilin die Morphologie von Neuronen. Durch die differenzierte Regulierbarkeit der Rho-GTPasen und von Cofilin ermöglicht dies eine Feinabstimmung der verschiedenen intrazellulären Antworten auf die Aktivierung von L1. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden einige dieser „Antworten“ - Neuritogenese, Neuritenwachstum und Endozytose - näher untersucht und die Beteiligung der Rho-GTPasen und von Cofilin an diesen Prozessen analysiert. Die hier erlangten Daten liefern einen Beitrag zum Verständnis der Funktion von L1 und somit auch zu seiner wichtigen Rolle in der Entwicklung des Nervensystems.

## 6 Zusammenfassung

Das Protein L1 gehört zur Familie der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle, die neben ihrer Funktion als Adhäsionsmoleküle auch als Signaltransduktoren wirken. Es spielt eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung, Migration, Neuritogenese, dem Neuritenwachstum und der axonalen Wegfindung. Im Rahmen dieser Dissertation sollten die zellulären Prozesse, die die L1-vermittelte Neuritogenese und das Neuritenwachstum steuern, untersucht werden. Ziel der Arbeit war es, zu klären, wie L1 die Dynamik des Zytoskeletts steuert und somit Einfluss auf Form und Funktion des Neurons nimmt. In diesem Zusammenhang wurden Lis1, die Rho-GTPasen Rac1, Cdc42 und RhoA sowie Cofilin näher untersucht.

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Lis1 ist an der L1-vermittelten Neuritogenese beteiligt<sup>[260]</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte der zu Grunde liegende Mechanismus weiter aufgeklärt werden. Aufgrund experimenteller Probleme war dies jedoch nicht möglich. Es ergaben sich allerdings Hinweise, dass das Protein Nde1, ein Interaktionspartner von Lis1, ebenfalls an der L1-vermittelten Neuritogenese beteiligt ist. Zudem wurde gezeigt, dass sowohl Lis1 als auch Nde1 und das potentielle Adapterprotein DCX nicht direkt mit L1 interagieren. Der Einfluss von Lis1 und Nde1 auf die Neuritogenese muss also durch andere, bisher unbekannte Proteine vermittelt werden.

Rho-GTPasen sind wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts. Durch Co-Immünpräzipitationen und Immunfärbungen konnte gezeigt werden, dass die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 mit L1 interagieren (S. Gensler/C. Dotti, Universität Leuven, pers.

Mitteilung). Nach den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten wirkt sich ein Fehlen von L1 im Mausgehirn nicht auf die Aktivität von Rac1 und Cdc42 aus. Auch die Expression von Rac1 und Cdc42 in L1-defizientem Mausgehirn unterscheidet sich nicht von der im Gehirn wildtypischer Mäuse.

Die Untersuchung der Rac1- und Cdc42-Aktivität in mit einem L1-Antikörper stimulierten Kleinhirnneuronen und Neuroblastom-Zellen zeigte hingegen, dass Rac1 in die L1-Signaltransduktion von Neuroblastom-Zellen, nicht aber in die von Kleinhirnneuronen involviert ist. Für Cdc42 kann aufgrund der geringen Anzahl an Messwerten diesbezüglich keine Aussage getroffen werden.

Ferner konnte gezeigt werden, dass RhoA an der Regulation der Oberflächenlokalisierung von L1 beteiligt ist. Durch Inhibition von RhoA wurde der Anteil von L1 an der Zelloberfläche am Gesamt-L1-Gehalt erhöht. Zudem wirkte sich der Einsatz des Inhibitors positiv, jedoch nicht spezifisch, auf die L1-abhängige Neuritogenese aus. Diese Daten bestätigen eine Beteiligung der Rho-GTPasen RhoA und Rac1 an von L1 ausgelösten Signalwegen, die zu Neuritenwachstum und Neuritogenese führen.

Cofilin ist ein Aktin-depolymerisierendes Protein, welches essentiell für die Organisation des Zytoskeletts ist. Da es wie L1 eine wichtige Rolle beim Neuritenwachstum spielt, wurde eine potentielle Interaktion der beiden Proteine untersucht.

Eine Bindung von L1 an Cofilin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden. Eine Stimulation von L1 durch Zugabe eines monoklonalen L1-Antikörpers, der das Neuritenwachstum fördert, bewirkte jedoch eine Aktivierung von Cofilin. Zusätzlich führte die Hemmung der Cofilin-Regulatoren LIM-Kinase und SSH-Phosphatase durch Inhibitoren zu einem verringerten L1-abhängigen Neuritenwachstum. Daraus lässt sich schließen, dass für das L1-vermittelte Neuritenwachstum ein streng regulierter Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Cofilin essentiell ist.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, neben den oben ge-

nannten Proteinen weitere Moleküle zu finden, die in die L1-abhängige Neuritogenese und das Neuritenwachstum involviert sind. Dabei wurden Affinitätschromatographien und *Crosslinking*-Experimente durchgeführt, über die jedoch keine spezifischen Interaktionen bisher unbekannter Bindungspartner der intrazellulären Domäne von L1 nachzuweisen waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung der Rho-GTPasen Rac1 und RhoA sowie des Aktin-assoziierten Proteins Cofilin an der zum Neuritenwachstum führenden L1-Signaltransduktion gezeigt werden konnte.

## 7 Summary

L1 belongs to the family of neural cell adhesion molecules, which, in addition to their adhesive function, are engaged in signal transduction pathways. L1 plays an important role in neuronal development, cell migration, neuritogenesis, neurite outgrowth and axon guidance. The aim of this study was to investigate cellular processes that regulate L1-mediated neuritogenesis and neurite outgrowth. This should lead to a better understanding of how L1 induces morphological changes of neurons. In this context, Lis1, the Rho GTPases Rac1, Cdc42 and RhoA as well as Cofilin were further examined.

The protein Lis1 is involved in L1-mediated neuritogenesis<sup>[260]</sup> and the present study aimed at clarifying the underlying mechanisms. Due to experimental problems, this unfortunately could not be accomplished. Preliminary data implicate a role of Nde1, a binding partner of Lis1, in L1-mediated neuritogenesis. Nde1, as well as Lis1 and the potential adaptor DCX do not bind to L1. Thus, the involvement of Lis1 and Nde1 in L1 signaling must be mediated by different, so far unknown proteins.

Rho GTPases are important regulators of the actin cytoskeleton. Co-immunoprecipitations and immunofluorescence studies revealed an interaction of L1 and the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 (S. Gensler/C. Dotti, University of Leuven, personal communication). As shown in this thesis, loss of L1 does not affect Rac1 and Cdc42 activity in mouse brain homogenates. Additionally, the expression levels of Rac1 and Cdc42 in mouse brains of L1-deficient mice are not altered in comparison to wildtype brains.



Analysis of Rac1 and Cdc42 activity in L1-antibody-treated cerebellar neurons and neuroblastoma cells revealed an involvement of Rac1 in L1 signaling in neuroblastoma cells but not in cerebellar neurons. Due to the limited number of data referring to Cdc42 activity, no conclusions can be made regarding the participation of Cdc42 in L1 signal transduction.

Investigation of the localization of L1 at the cell surface revealed that RhoA is involved in L1 endocytosis. Inhibition of RhoA resulted in an increase of surface L1 compared to untreated cells. In addition, the RhoA inhibitor enhanced L1-mediated neuritogenesis, but in an unspecific manner.

Taken together, the presented data implicate participation of Rho GTPases RhoA and Rac1 in L1 signal transduction that leads to neuritogenesis and neurite outgrowth.

Cofilin is an actin-depolymerizing protein which is essential for cytoskeletal reorganization. Because it plays an important role in neurite outgrowth as L1, a potential interaction of the two proteins should be investigated in this study.

A direct interaction of L1 and Cofilin could be excluded by various binding assays. However, stimulation with a monoclonal L1-antibody known to trigger neurite outgrowth lead to Cofilin activation. Additionally, interference with LIMK kinase and SSH phosphatase function resulted in an impairment of L1-mediated neurite outgrowth. This implies that tight regulation of Cofilin activity is essential for L1-mediated neurite outgrowth.

Furthermore, in the present study I searched for further L1-binding partners as potential mediators between L1 and the cytoskeleton. For this purpose, affinity chromatography and crosslinking experiments were performed, but no specific interactions with the L1 intracellular domain could be detected.

In conclusion, this study showed a participation of the Rho GTPases Rac1 and RhoA as well as the actin-associated protein Cofilin in L1 signaltransduction that leads to

neurite outgrowth.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] AGNEW, B. J., L. S. MINAMIDE und J. R. BAMBURG: *Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site.* J Biol Chem, 270(29):17582–17587, Jul 1995.
- [2] AIZAWA, H., S. WAKATSUKI, A. ISHII, K. MORIYAMA, Y. SASAKI, K. OHASHI, Y. SEKINE-AIZAWA, A. SEHARA-FUJISAWA, K. MIZUNO, Y. GOSHIMA und I. YAHARA: *Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse.* Nat Neurosci, 4(4):367–373, Apr 2001.
- [3] AIZAWA, H., S. WAKATSUKI, A. ISHII, K. MORIYAMA, Y. SASAKI, K. OHASHI, Y. SEKINE-AIZAWA, A. SEHARA-FUJISAWA, K. MIZUNO, Y. GOSHIMA und I. YAHARA: *Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse.* Nat Neurosci, 4(4):367–373, Apr 2001.
- [4] ALBERTS, P., R. RUDGE, I. HINNERS, A. MUZERELLE, S. MARTINEZ-ARCA, T. IRINOPOULOU, V. MARTHIENS, S. TOOZE, F. RATHJEN, P. GASPAR und T. GALLI: *Cross talk between tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein-mediated transport and L1-mediated adhesion.* Mol Biol Cell, 14(10):4207–4220, Oct 2003.
- [5] AMANO, T., K. TANABE, T. ETO, S. NARUMIYA und K. MIZUNO: *LIM-kinase 2 induces formation of stress fibres, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505.* Biochem J, 354(Pt 1):149–159, Feb 2001.

- [6] ANTHONY, T. E., C. KLEIN, G. FISHELL und N. HEINTZ: *Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system.* Neuron, 41(6):881–890, Mar 2004.
- [7] APPEL, F., J. HOLM, J. F. CONSCIENCE, F. VON BOHLEN und HALBACH, A. FAISSNER, P. JAMES und M. SCHACHNER: *Identification of the border between fibronectin type III homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain.* J Neurobiol, 28(3):297–312, Nov 1995.
- [8] ARAMI, S., M. JUCKER, M. SCHACHNER und H. WELZL: *The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats.* Behav Brain Res, 81(1-2):81–87, Nov 1996.
- [9] ARBER, S., F. A. BARBAYANNIS, H. HANSER, C. SCHNEIDER, C. A. STANYON, O. BERNARD und P. CARONI: *Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase.* Nature, 393(6687):805–809, Jun 1998.
- [10] ASOU, H., M. MIURA, M. KOBAYASHI und K. UYEMURA: *The cell adhesion molecule L1 has a specific role in neural cell migration.* Neuroreport, 3(6):481–484, Jun 1992.
- [11] ASPENSTRÖM, P., A. FRANSSON und J. SARAS: *Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system.* Biochem J, 377(Pt 2):327–337, Jan 2004.
- [12] AVALOS, A. M., W. T. ARTHUR, P. SCHNEIDER, A. F. G. QUEST, K. BURRIDGE und L. LEYTON: *Aggregation of integrins and RhoA activation are required for Thy-1-induced morphological changes in astrocytes.* J Biol Chem, 279(37):39139–39145, Sep 2004.
- [13] BAMBURG, J. R. und D. BRAY: *Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor.* J Cell Biol, 105(6 Pt 1):2817–2825, Dec 1987.

- [14] BAMBURG, J. R., H. E. HARRIS und A. G. WEEDS: *Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain*. FEBS Lett, 121(1):178–182, Nov 1980.
- [15] BARTSCH, U., F. KIRCHHOFF und M. SCHACHNER: *Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice*. J Comp Neurol, 284(3):451–462, Jun 1989.
- [16] BELLENCHI, G. C., C. B. GURNIAK, E. PERLAS, S. MIDDEI, M. AMMASSARI-TEULE und W. WITKE: *N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex*. Genes Dev, 21(18):2347–2357, Sep 2007.
- [17] BENNINGER, Y., T. THURNHERR, J. A. PEREIRA, S. KRAUSE, X. WU, A. CHROSTEK-GRASHOFF, D. HERZOG, K.-A. NAVE, R. J. M. FRANKLIN, D. MEIJER, C. BRAKEBUSCH, U. SUTER und J. B. RELVAS: *Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development*. J Cell Biol, 177(6):1051–1061, Jun 2007.
- [18] BERNARDS, A.: *GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila*. Biochim Biophys Acta, 1603(2):47–82, Mar 2003.
- [19] BERNSTEIN, B. W. und J. R. BAMBURG: *Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF)*. Cell Motil, 2(1):1–8, 1982.
- [20] BIANCHINE, J. W. und R. C. LEWIS: *The MASA syndrome: a new heritable mental retardation syndrome*. Clin Genet, 5(4):298–306, 1974.
- [21] BICKERS, D. S. und R. D. ADAMS: *Hereditary stenosis of the aqueduct of Sylvius as a cause of congenital hydrocephalus*. Brain, 72(Pt. 2):246–262, Jun 1949.

- [22] BIEBER, F. R., E. P. HOFFMAN und J. A. AMOS: *Dystrophin analysis in duchenne muscular dystrophy: use in fetal diagnosis and in genetic counseling*. Am J Hum Genet, 45(3):362–367, Sep 1989.
- [23] BISHOP, A. L. und A. HALL: *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 348 Pt 2:241–255, Jun 2000.
- [24] BITO, H., T. FURUYASHIKI, H. ISHIHARA, Y. SHIBASAKI, K. OHASHI, K. MIZUNO, M. MAEKAWA, T. ISHIZAKI und S. NARUMIYA: *A critical role for a Rho-associated kinase, p160ROCK, in determining axon outgrowth in mammalian CNS neurons*. Neuron, 26(2):431–441, May 2000.
- [25] BLACKWOOD, D. H., A. FORDYCE, M. T. WALKER, D. M. S. CLAIR, D. J. PORTEOUS und W. J. MUIR: *Schizophrenia and affective disorders—cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family*. Am J Hum Genet, 69(2):428–433, Aug 2001.
- [26] BRACKENBURY, R., J. P. THIERY, U. RUTISHAUSER und G. M. EDELMAN: *Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding*. J Biol Chem, 252(19):6835–6840, Oct 1977.
- [27] BRADSHAW, N. J., S. CHRISTIE, D. C. SOARES, B. C. CARLYLE, D. J. PORTEOUS und J. K. MILLAR: *NDE1 and NDEL1: Multimerisation, alternate splicing and DISC1 interaction*. Neurosci Lett, 449(3):228–233, Jan 2009.
- [28] BRANDON, N. J., E. J. HANDFORD, I. SCHUROV, J.-C. RAIN, M. PELLING, B. DURAN-JIMENIZ, L. M. CAMARGO, K. R. OLIVER, D. BEHER, M. S. SHEARMAN und P. J. WHITING: *Disrupted in Schizophrenia 1 and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophre-*

- nia and other major neurological disorders.* Mol Cell Neurosci, 25(1):42–55, Jan 2004.
- [29] BRITTIS, SILVER, WALSH und DOHERTY: *Fibroblast Growth Factor Receptor Function Is Required for the Orderly Projection of Ganglion Cell Axons in the Developing Mammalian Retina.* Mol Cell Neurosci, 8(2/3):120–128, Aug 1996.
- [30] BRITTIS, P. A., Q. LU und J. G. FLANAGAN: *Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target.* Cell, 110(2):223–235, Jul 2002.
- [31] BRÜMMENDORF, T., M. HUBERT, U. TREUBERT, R. LEUSCHNER, A. TÁRNOK und F. G. RATHJEN: *The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin.* Neuron, 10(4):711–727, Apr 1993.
- [32] BRÜMMENDORF, T., S. KENWRICK und F. G. RATHJEN: *Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations.* Curr Opin Neurobiol, 8(1):87–97, Feb 1998.
- [33] BRÜMMENDORF, T. und F. G. RATHJEN: *Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily.* Protein Profile, 2(9):963–1108, 1995.
- [34] BURNETTE, W. N.: *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.* Anal Biochem, 112(2):195–203, Apr 1981.
- [35] BUSSON, S., D. DUJARDIN, A. MOREAU, J. DOMPIERRE und J. R. D. MEY: *Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells.* Curr Biol, 8(9):541–544, Apr 1998.

- [36] CASSIMERIS, L.: *The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers*. *Curr Opin Cell Biol*, 14(1):18–24, Feb 2002.
- [37] CASTELLANI, V., E. D. ANGELIS, S. KENWRICK und G. ROUGON: *Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A*. *EMBO J*, 21(23):6348–6357, Dec 2002.
- [38] CASTELLANI, V., E. D. ANGELIS, S. KENWRICK und G. ROUGON: *Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A*. *EMBO J*, 21(23):6348–6357, Dec 2002.
- [39] CASTELLANI, V., A. CHÉDOTAL, M. SCHACHNER, C. FAIVRE-SARRAILH und G. ROUGON: *Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance*. *Neuron*, 27(2):237–249, Aug 2000.
- [40] CHANG, H. Y., K. TAKEI, A. M. SYDOR, T. BORN, F. RUSNAK und D. G. JAY: *Asymmetric retraction of growth cone filopodia following focal inactivation of calcineurin*. *Nature*, 376(6542):686–690, Aug 1995.
- [41] CHANG, S., F. G. RATHJEN und J. A. RAPER: *Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins*. *J Cell Biol*, 104(2):355–362, Feb 1987.
- [42] CHEN, L., G. LIAO, R. R. WACLAW, K. A. BURNS, D. LINQUIST, K. CAMPBELL, Y. ZHENG und C.-Y. KUAN: *Rac1 controls the formation of midline commissures and the competency of tangential migration in ventral telencephalic neurons*. *J Neurosci*, 27(14):3884–3893, Apr 2007.
- [43] CHEN, S., N. MANTEI, L. DONG und M. SCHACHNER: *Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1*. *J Neurobiol*, 38(3):428–439, Feb 1999.



- [44] CHEN, S., N. MANTEI, L. DONG und M. SCHACHNER: *Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1*. J Neurobiol, 38(3):428–439, Feb 1999.
- [45] CHENG, L., K. ITOH und V. LEMMON: *L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region*. J Neurosci, 25(2):395–403, Jan 2005.
- [46] CHENG, L., S. LEMMON und V. LEMMON: *RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation*. J Neurochem, 94(4):1102–1110, Aug 2005.
- [47] CHOU, P. Y. und G. D. FASMAN: *Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins*. Biochemistry, 13(2):211–222, Jan 1974.
- [48] COHEN, N. R., J. S. TAYLOR, L. B. SCOTT, R. W. GUILLERY, P. SORIANO und A. J. FURLEY: *Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1*. Curr Biol, 8(1):26–33, Jan 1998.
- [49] COHEN, N. R., J. S. TAYLOR, L. B. SCOTT, R. W. GUILLERY, P. SORIANO und A. J. FURLEY: *Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1*. Curr Biol, 8(1):26–33, Jan 1998.
- [50] CUNNINGHAM, B. A.: *Cell adhesion molecules as morphoregulators*. Curr Opin Cell Biol, 7(5):628–633, Oct 1995.
- [51] DAHLIN-HUPPE, K., E. O. BERGLUND, B. RANSCHT und W. B. STALLCUP: *Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage*. Mol Cell Neurosci, 9(2):144–156, 1997.

- [52] DAHME, M., U. BARTSCH, R. MARTINI, B. ANLIKER, M. SCHACHNER und N. MANTEI: *Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system*. Nat Genet, 17(3):346–349, Nov 1997.
- [53] DAUB, H., K. GEVAERT, J. VANDEKERCKHOVE, A. SOBEL und A. HALL: *Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16*. J Biol Chem, 276(3):1677–1680, Jan 2001.
- [54] DAVIS, J. Q. und V. BENNETT: *Ankyrin-binding activity of nervous system cell adhesion molecules expressed in adult brain*. J Cell Sci Suppl, 17:109–117, 1993.
- [55] DAVIS, J. Q. und V. BENNETT: *Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules*. J Biol Chem, 269(44):27163–27166, Nov 1994.
- [56] DAVIS, L., P. DOU, M. DEWIT und S. B. KATER: *Protein synthesis within neuronal growth cones*. J Neurosci, 12(12):4867–4877, Dec 1992.
- [57] DEBERNARDO, A. P. und S. CHANG: *Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension*. J Cell Biol, 133(3):657–666, May 1996.
- [58] DEBIEC, H., E. I. CHRISTENSEN und P. M. RONCO: *The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis*. J Cell Biol, 143(7):2067–2079, Dec 1998.
- [59] DEMYANENKO, G. P., A. Y. TSAI und P. F. MANESS: *Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice*. J Neurosci, 19(12):4907–4920, Jun 1999.

- [60] DICKSON, T. C., C. D. MINTZ, D. L. BENSON und S. R. J. SALTON: *Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family*. J Cell Biol, 157(7):1105–1112, Jun 2002.
- [61] DITYATEVA, G., M. HAMMOND, C. THIEL, M. O. RUONALA, M. DEL-LING, G. SIEBENKOTTEN, M. NIX und A. DITYATEV: *Rapid and efficient electroporation-based gene transfer into primary dissociated neurons*. J Neurosci Methods, 130(1):65–73, Nov 2003.
- [62] DOBYNS, W. B., O. REINER, R. CARROZZO und D. H. LEDBETTER: *Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13*. JAMA, 270(23):2838–2842, Dec 1993.
- [63] DOBYNS, W. B. und C. L. TRUWIT: *Lissencephaly and other malformations of cortical development: 1995 update*. Neuropediatrics, 26(3):132–147, Jun 1995.
- [64] DOBYNS, W. B., C. L. TRUWIT, M. E. ROSS, N. MATSUMOTO, D. T. PILZ, D. H. LEDBETTER, J. G. GLEESON, C. A. WALSH und A. J. BARKOVICH: *Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly*. Neurology, 53(2):270–277, Jul 1999.
- [65] DOHERTY und WALSH: *CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth*. Mol Cell Neurosci, 8(2/3):99–111, Aug 1996.
- [66] DOHERTY, P., P. SMITH und F. S. WALSH: *Shared cell adhesion molecule (CAM) homology domains point to CAMs signalling via FGF receptors*. Perspect Dev Neurobiol, 4(2-3):157–168, 1996.
- [67] EBELING, O., A. DUCZMAL, S. AIGNER, C. GEIGER, S. SCHÖLLHAMMER, J. T. KEMSHEAD, P. MÖLLER, R. SCHWARTZ-ALBIEZ und P. ALTEVOGT: *L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in*

- binding to alpha v beta 3 integrin.* Eur J Immunol, 26(10):2508–2516, Oct 1996.
- [68] EDEN, S., R. ROHATGI, A. V. PODTELEJNIKOV, M. MANN und M. W. KIRSCHNER: *Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck.* Nature, 418(6899):790–793, Aug 2002.
- [69] EDMONDSON, J. C. und M. E. HATTEN: *Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study.* J Neurosci, 7(6):1928–1934, Jun 1987.
- [70] EDWARDS, D. C., L. C. SANDERS, G. M. BOKOCH und G. N. GILL: *Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics.* Nat Cell Biol, 1(5):253–259, Sep 1999.
- [71] ELLENBROEK, S. I. J. und J. G. COLLARD: *Rho GTPases: functions and association with cancer.* Clin Exp Metastasis, 24(8):657–672, 2007.
- [72] ELLIS, L., I. WALLIS, E. ABREU und K. H. PFENNINGER: *Nerve growth cones isolated from fetal rat brain. IV. Preparation of a membrane subfraction and identification of a membrane glycoprotein expressed on sprouting neurons.* J Cell Biol, 101(5 Pt 1):1977–1989, Nov 1985.
- [73] ELLIS, S. und H. MELLOR: *Regulation of endocytic traffic by rho family GTPases.* Trends Cell Biol, 10(3):85–88, Mar 2000.
- [74] ENDO, M., K. OHASHI, Y. SASAKI, Y. GOSHIMA, R. NIWA, T. UEMURA und K. MIZUNO: *Control of growth cone motility and morphology by LIM kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin.* J Neurosci, 23(7):2527–2537, Apr 2003.

- [75] ENGVALL, E. und P. PERLMANN: *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, Sep 1971.
- [76] FAN, S., S. H. RAMIREZ, T. M. GARCIA und S. DEWHURST: *Dishevelled promotes neurite outgrowth in neuronal differentiating neuroblastoma 2A cells, via a DIX-domain dependent pathway*. *Brain Res Mol Brain Res*, 132(1):38–50, Dec 2004.
- [77] FAULKNER, N. E., D. L. DUJARDIN, C. Y. TAI, K. T. VAUGHAN, C. B. O'CONNELL, Y. WANG und R. B. VALLEE: *A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function*. *Nat Cell Biol*, 2(11):784–791, Nov 2000.
- [78] FENG, Y., E. C. OLSON, P. T. STUKENBERG, L. A. FLANAGAN, M. W. KIRSCHNER und C. A. WALSH: *LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome*. *Neuron*, 28(3):665–679, Dec 2000.
- [79] FIELDS, S. und O. SONG: *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. *Nature*, 340(6230):245–246, Jul 1989.
- [80] FINCKH, U., J. SCHRÖDER, B. RESSLER, A. VESKE und A. GAL: *Spectrum and detection rate of LICAM mutations in isolated and familial cases with clinically suspected L1-disease*. *Am J Med Genet*, 92(1):40–46, May 2000.
- [81] FISCHER, G., V. KÜNEMUND und M. SCHACHNER: *Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1*. *J Neurosci*, 6(2):605–612, Feb 1986.
- [82] FONTAINHAS, A. M. und E. TOWNES-ANDERSON: *RhoA and its role in synaptic structural plasticity of isolated salamander photoreceptors*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(9):4177–4187, Sep 2008.

- [83] FORMOSA, T., J. BARRY, B. M. ALBERTS und J. GREENBLATT: *Using protein affinity chromatography to probe structure of protein machines*. *Methods Enzymol*, 208:24–45, 1991.
- [84] FOURNIER, A. E., F. NAKAMURA, S. KAWAMOTO, Y. GOSHIMA, R. G. KALB und S. M. STRITTMATTER: *Semaphorin3A enhances endocytosis at sites of receptor-F-actin colocalization during growth cone collapse*. *J Cell Biol*, 149(2):411–422, Apr 2000.
- [85] FRANSEN, E., R. D’HOOGHE, G. V. CAMP, M. VERHOYE, J. SIJBERS, E. REYNERS, P. SORIANO, H. KAMIGUCHI, R. WILLEMSSEN, S. K. KOEKKOEK, C. I. D. ZEEUW, P. P. D. DEYN, A. V. DER LINDEN, V. LEMMON, R. F. KOOY und P. J. WILLEMS: *L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns*. *Hum Mol Genet*, 7(6):999–1009, Jun 1998.
- [86] FRANSEN, E., C. SCHRANDER-STUMPEL, L. VITS, P. COUCKE, G. V. CAMP und P. J. WILLEMS: *X-linked hydrocephalus and MASA syndrome present in one family are due to a single missense mutation in exon 28 of the L1CAM gene*. *Hum Mol Genet*, 3(12):2255–2256, Dec 1994.
- [87] FRIEDLANDER, D. R., P. MILEV, L. KARTHIKEYAN, R. K. MARGOLIS, R. U. MARGOLIS und M. GRUMET: *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(3):669–680, May 1994.
- [88] FUKATA, M., T. WATANABE, J. NORITAKE, M. NAKAGAWA, M. YAMAGA, S. KURODA, Y. MATSUURA, A. IWAMATSU, F. PEREZ und K. KAIBUCHI: *Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170*. *Cell*, 109(7):873–885, Jun 2002.

- [89] GALLI, T., A. ZAHRAOUI, V. V. VAIDYANATHAN, G. RAPOSO, J. M. TIAN, M. KARIN, H. NIEMANN und D. LOUVARD: *A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells*. *Mol Biol Cell*, 9(6):1437–1448, Jun 1998.
- [90] GARDINER, E. M., K. N. PESTONJAMASP, B. P. BOHL, C. CHAMBERLAIN, K. M. HAHN und G. M. BOKOCH: *Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis*. *Curr Biol*, 12(23):2029–2034, Dec 2002.
- [91] GARVALOV, B. K., K. C. FLYNN, D. NEUKIRCHEN, L. MEYN, N. TEUSCH, X. WU, C. BRAKEBUSCH, J. R. BAMBURG und F. BRADKE: *Cdc42 regulates cofilin during the establishment of neuronal polarity*. *J Neurosci*, 27(48):13117–13129, Nov 2007.
- [92] GARVER, T. D., Q. REN, S. TUVIA und V. BENNETT: *Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin*. *J Cell Biol*, 137(3):703–714, May 1997.
- [93] GASMAN, S., S. CHASSEROT-GOLAZ, M.-F. BADER und N. VITALE: *Regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells: focus on ARF and Rho GTPases*. *Cell Signal*, 15(10):893–899, Oct 2003.
- [94] GASMAN, S., S. CHASSEROT-GOLAZ, M. R. POPOFF, D. AUNIS und M. F. BADER: *Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho*. *J Biol Chem*, 272(33):20564–20571, Aug 1997.
- [95] GEHLER, S., A. E. SHAW, P. D. SARMIERE, J. R. BAMBURG und P. C. LETOURNEAU: *Brain-derived neurotrophic factor regulation of retinal growth cone fi-*

- lopodial dynamics is mediated through actin depolymerizing factor/cofilin.* J Neurosci, 24(47):10741–10749, Nov 2004.
- [96] GIL, O. D., T. SAKURAI, A. E. BRADLEY, M. Y. FINK, M. R. CASSELLA, J. A. KUO und D. P. FELSENFELD: *Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface.* J Cell Biol, 162(4):719–730, Aug 2003.
- [97] GLEESON, J. G., K. M. ALLEN, J. W. FOX, E. D. LAMPERTI, S. BERKOVIC, I. SCHEFFER, E. C. COOPER, W. B. DOBYNS, S. R. MINNERATH, M. E. ROSS und C. A. WALSH: *Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein.* Cell, 92(1):63–72, Jan 1998.
- [98] GLEESON, J. G., P. T. LIN, L. A. FLANAGAN und C. A. WALSH: *Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons.* Neuron, 23(2):257–271, Jun 1999.
- [99] GOHLA, A., J. BIRKENFELD und G. M. BOKOCH: *Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics.* Nat Cell Biol, 7(1):21–29, Jan 2005.
- [100] GOHLA, A. und G. M. BOKOCH: *14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin.* Curr Biol, 12(19):1704–1710, Oct 2002.
- [101] GOSHIMA, Y., S. OHSAKO und T. YAMAUCHI: *Overexpression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in Neuro2a and NG108-15 neuroblastoma cell lines promotes neurite outgrowth and growth cone motility.* J Neurosci, 13(2):559–567, Feb 1993.
- [102] GREGORY, W. A., J. C. EDMONDSON, M. E. HATTEN und C. A. MASON: *Cytology and neuron-glia apposition of migrating cerebellar granule cells in vitro.* J Neurosci, 8(5):1728–1738, May 1988.



- [103] GROOTJANS, J. J., P. ZIMMERMANN, G. REEKMANS, A. SMETS, G. DEGEEST, J. DÜRR und G. DAVID: *Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(25):13683–13688, Dec 1997.
- [104] GROYSMAN, M., I. SHOVAL und C. KALCHEIM: *A negative modulatory role for rho and rho-associated kinase signaling in delamination of neural crest cells*. Neural Develop, 3:27, 2008.
- [105] GRUMET, M. und G. M. EDELMAN: *Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms*. J Cell Biol, 106(2):487–503, Feb 1988.
- [106] GRUMET, M., D. R. FRIEDLANDER und G. M. EDELMAN: *Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin*. Cell Adhes Commun, 1(2):177–190, Sep 1993.
- [107] GÜNZL, A. und B. SCHIMANSKI: *Tandem affinity purification of proteins*. Curr Protoc Protein Sci, Chapter 19:Unit 19.19, Feb 2009.
- [108] HALL, S. G. und A. J. BIEBER: *Mutations in the Drosophila neuroglial cell adhesion molecule affect motor neuron pathfinding and peripheral nervous system patterning*. J Neurobiol, 32(3):325–340, Mar 1997.
- [109] HAN, J., K. LUBY-PHELPS, B. DAS, X. SHU, Y. XIA, R. D. MOSTELLER, U. M. KRISHNA, J. R. FALCK, M. A. WHITE und D. BROEK: *Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav*. Science, 279(5350):558–560, Jan 1998.
- [110] HANDSCHUMACHER, R. E., M. W. HARDING, J. RICE, R. J. DRUGGE und D. W. SPEICHER: *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 226(4674):544–547, Nov 1984.

- [111] HANKIN, M. H. und C. F. LAGENAUR: *Cell adhesion molecules in the early developing mouse retina: retinal neurons show preferential outgrowth in vitro on L1 but not N-CAM*. J Neurobiol, 25(5):472–487, May 1994.
- [112] HATTEN, M. E.: *New directions in neuronal migration*. Science, 297(5587):1660–1663, Sep 2002.
- [113] HAWKINS, M., B. POPE, S. K. MACIVER und A. G. WEEDS: *Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments*. Biochemistry, 32(38):9985–9993, Sep 1993.
- [114] HAYDEN, S. M., P. S. MILLER, A. BRAUWEILER und J. R. BAMBURG: *Analysis of the interactions of actin depolymerizing factor with G- and F-actin*. Biochemistry, 32(38):9994–10004, Sep 1993.
- [115] HEASMAN, S. J. und A. J. RIDLEY: *Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 9(9):690–701, Sep 2008.
- [116] HEDRICK, L., K. R. CHO, E. R. FEARON, T. C. WU, K. W. KINZLER und B. VOGELSTEIN: *The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis*. Genes Dev, 8(10):1174–1183, May 1994.
- [117] HENLEY, J. R., H. CAO und M. A. MCNIVEN: *Participation of dynamin in the biogenesis of cytoplasmic vesicles*. FASEB J, 13 Suppl 2:S243–S247, Dec 1999.
- [118] HEUKESHOVEN, J. und R. DERNICK: *Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels*. Electrophoresis, 9(1):28–32, Jan 1988.
- [119] HINSHAW, J. E.: *Dynamin and its role in membrane fission*. Annu Rev Cell Dev Biol, 16:483–519, 2000.

- [120] HIROSE, M., T. ISHIZAKI, N. WATANABE, M. UEHATA, O. KRANENBURG, W. H. MOOLENAAR, F. MATSUMURA, M. MAEKAWA, H. BITO und S. NARUMIYA: *Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells*. J Cell Biol, 141(7):1625–1636, Jun 1998.
- [121] HIROTSUNE, S., M. W. FLECK, M. J. GAMBELLO, G. J. BIX, A. CHEN, G. D. CLARK, D. H. LEDBETTER, C. J. MCBAIN und A. WYNshaw-BORIS: *Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality*. Nat Genet, 19(4):333–339, Aug 1998.
- [122] HORTSCH, M.: *The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks*. Neuron, 17(4):587–593, Oct 1996.
- [123] HORTSCH, M., K. S. O'SHEA, G. ZHAO, F. KIM, Y. VALLEJO und R. R. DUBREUIL: *A conserved role for L1 as a transmembrane link between neuronal adhesion and membrane cytoskeleton assembly*. Cell Adhes Commun, 5(1):61–73, Jan 1998.
- [124] HSIEH, S. H.-K., G. B. FERRARO und A. E. FOURNIER: *Myelin-associated inhibitors regulate cofilin phosphorylation and neuronal inhibition through LIM kinase and Slingshot phosphatase*. J Neurosci, 26(3):1006–1015, Jan 2006.
- [125] HYNES, R. O.: *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 69(1):11–25, Apr 1992.
- [126] ICHETOVKIN, I., W. GRANT und J. CONDEELIS: *Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex*. Curr Biol, 12(1):79–84, Jan 2002.
- [127] IGNELZI, M. A., D. R. MILLER, P. SORIANO und P. F. MANESS: *Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1*. Neuron, 12(4):873–884, Apr 1994.

- [128] ITOH, R. E., K. KUROKAWA, Y. OHBA, H. YOSHIZAKI, N. MOCHIZUKI und M. MATSUDA: *Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells*. Mol Cell Biol, 22(18):6582–6591, Sep 2002.
- [129] JACOBS, T., F. CAUSERET, Y. V. NISHIMURA, M. TERAOKA, A. NORMAN, M. HOSHINO und M. NIKOLI?: *Localized activation of p21-activated kinase controls neuronal polarity and morphology*. J Neurosci, 27(32):8604–8615, Aug 2007.
- [130] JAFFE, A. B. und A. HALL: *Rho GTPases: biochemistry and biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 21:247–269, 2005.
- [131] JOUET, M., A. ROSENTHAL, G. ARMSTRONG, J. MACFARLANE, R. STEVENSON, J. PATERSON, A. METZENBERG, V. IONASESCU, K. TEMPLE und S. KENWRICK: *X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene*. Nat Genet, 7(3):402–407, Jul 1994.
- [132] KADMON, G., F. VON BOHLEN UND HALBACH, R. HORSTKORTE, M. ECKERT, P. ALTEVOGT und M. SCHACHNER: *Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons*. Eur J Neurosci, 7(5):993–1004, May 1995.
- [133] KADMON, G., A. KOWITZ, P. ALTEVOGT und M. SCHACHNER: *The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions*. J Cell Biol, 110(1):193–208, Jan 1990.
- [134] KALUS, I., B. SCHNEGELSBERG, N. G. SEIDAH, R. KLEENE und M. SCHACHNER: *The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1*. J Biol Chem, 278(12):10381–10388, Mar 2003.
- [135] KAMIGUCHI, H. und V. LEMMON: *Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones*. J Neurosci, 20(10):3676–3686, May 2000.

- [136] KAMIGUCHI, H., K. E. LONG, M. PENDERGAST, A. W. SCHAEFER, I. RAPO-PORT, T. KIRCHHAUSEN und V. LEMMON: *The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway*. J Neurosci, 18(14):5311–5321, Jul 1998.
- [137] KAMIGUCHI, H., K. E. LONG, M. PENDERGAST, A. W. SCHAEFER, I. RAPO-PORT, T. KIRCHHAUSEN und V. LEMMON: *The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway*. J Neurosci, 18(14):5311–5321, Jul 1998.
- [138] KAMIYA, A., K. ICHIRO KUBO, T. TOMODA, M. TAKAKI, R. YOUN, Y. OZEKI, N. SAWAMURA, U. PARK, C. KUDO, M. OKAWA, C. A. ROSS, M. E. HATTEN, K. NAKAJIMA und A. SAWA: *A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development*. Nat Cell Biol, 7(12):1167–1178, Dec 2005.
- [139] KANEKO, T., A. MAEDA, M. TAKEFUJI, H. AOYAMA, M. NAKAYAMA, S. KAWABATA, Y. KAWANO, A. IWAMATSU, M. AMANO und K. KAIBUCHI: *Rho mediates endocytosis of epidermal growth factor receptor through phosphorylation of endophilin A1 by Rho-kinase*. Genes Cells, 10(10):973–987, Oct 2005.
- [140] KEMLER, R. und M. OZAWA: *Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion molecule*. Bioessays, 11(4):88–91, Oct 1989.
- [141] KENWRICK, S., V. IONASESCU, G. IONASESCU, C. SEARBY, A. KING, M. DUBOWITZ und K. E. DAVIES: *Linkage studies of X-linked recessive spastic paraplegia using DNA probes*. Hum Genet, 73(3):264–266, Jul 1986.
- [142] KENWRICK, S., A. WATKINS und E. D. ANGELIS: *Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations*. Hum Mol Genet, 9(6):879–886, Apr 2000.

- [143] KHOLMANSKIKH, S. S., J. S. DOBRIN, A. WYNshaw-BORIS, P. C. LETOURNEAU und M. E. ROSS: *Disregulated RhoGTPases and actin cytoskeleton contribute to the migration defect in Lis1-deficient neurons*. J Neurosci, 23(25):8673–8681, Sep 2003.
- [144] KHOLMANSKIKH, S. S., H. B. KOELLER, A. WYNshaw-BORIS, T. GOMEZ, P. C. LETOURNEAU und M. E. ROSS: *Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQ-GAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility*. Nat Neurosci, 9(1):50–57, Jan 2006.
- [145] KIRCHHAUSEN, T., J. S. BONIFACINO und H. RIEZMAN: *Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins*. Curr Opin Cell Biol, 9(4):488–495, Aug 1997.
- [146] KIZHATIL, K., Y.-X. WU, A. SEN und V. BENNETT: *A new activity of doublecortin in recognition of the phospho-FIGQY tyrosine in the cytoplasmic domain of neurofascin*. J Neurosci, 22(18):7948–7958, Sep 2002.
- [147] KOENIG, E. und A. GIUDITTA: *Protein-synthesizing machinery in the axon compartment*. Neuroscience, 89(1):5–15, Mar 1999.
- [148] KOLKOVA, K., V. NOVITSKAYA, N. PEDERSEN, V. BEREZIN und E. BOCK: *Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway*. J Neurosci, 20(6):2238–2246, Mar 2000.
- [149] KORNBLIHTT, A. R., K. UMEZAWA, K. VIBE-PEDERSEN und F. E. BARALLE: *Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene*. EMBO J, 4(7):1755–1759, Jul 1985.
- [150] KOROLL, M., F. G. RATHJEN und H. VOLKMER: *The neural cell recognition molecule neurofascin interacts with syntenin-1 but not with syntenin-2, both of*

- which reveal self-associating activity.* J Biol Chem, 276(14):10646–10654, Apr 2001.
- [151] KRAYNOV, V. S., C. CHAMBERLAIN, G. M. BOKOCH, M. A. SCHWARTZ, S. SLA-BAUGH und K. M. HAHN: *Localized Rac activation dynamics visualized in living cells.* Science, 290(5490):333–337, Oct 2000.
- [152] KUHN, T. B., P. J. MEBERG, M. D. BROWN, B. W. BERNSTEIN, L. S. MINAMIDE, J. R. JENSEN, K. OKADA, E. A. SODA und J. R. BAMBURG: *Regulating actin dynamics in neuronal growth cones by ADF/cofilin and rho family GTPases.* J Neurobiol, 44(2):126–144, Aug 2000.
- [153] KUHN, T. B., E. T. STOECKLI, M. A. CONDRAU, F. G. RATHJEN und P. SONDEREGGER: *Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4).* J Cell Biol, 115(4):1113–1126, Nov 1991.
- [154] KUNZ, S., M. SPIRIG, C. GINSBURG, A. BUCHSTALLER, P. BERGER, R. LANZ, C. RADER, L. VOGT, B. KUNZ und P. SONDEREGGER: *Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin-1 and Ng cell adhesion molecule.* J Cell Biol, 143(6):1673–1690, Dec 1998.
- [155] KUNZ, S., U. ZIEGLER, B. KUNZ und P. SONDEREGGER: *Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NgCAM during neurite fasciculation.* J Cell Biol, 135(1):253–267, Oct 1996.
- [156] LAEMMLI, U. K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [157] LAGENAUR, C. und V. LEMMON: *An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension.* Proc Natl Acad Sci U S A, 84(21):7753–7757, Nov 1987.

- [158] LAMAZE, C., T. H. CHUANG, L. J. TERLECKY, G. M. BOKOCH und S. L. SCHMID: *Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac*. Nature, 382(6587):177–179, Jul 1996.
- [159] LANG, T., I. WACKER, I. WUNDERLICH, A. ROHRBACH, G. GIESE, T. SOLDATI und W. ALMERS: *Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells*. Biophys J, 78(6):2863–2877, Jun 2000.
- [160] LEE, P. L., D. E. JOHNSON, L. S. COUSENS, V. A. FRIED und L. T. WILLIAMS: *Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor*. Science, 245(4913):57–60, Jul 1989.
- [161] LEE-HOEFELICH, S. T., C. G. CAUSING, M. PODKOWA, X. ZHAO, J. L. WRANA und L. ATTISANO: *Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis*. EMBO J, 23(24):4792–4801, Dec 2004.
- [162] LEMMON, V., K. L. FARR und C. LAGENAUR: *L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism*. Neuron, 2(6):1597–1603, Jun 1989.
- [163] LETOURNEAU, P. C.: *Possible roles for cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis*. Dev Biol, 44(1):77–91, May 1975.
- [164] LETOURNEAU, P. C. und T. A. SHATTUCK: *Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones*. Development, 105(3):505–519, Mar 1989.
- [165] LEVY, O. A., J. J. LAH und A. I. LEVEY: *Notch signaling inhibits PC12 cell neurite outgrowth via RBP-J-dependent and -independent mechanisms*. Dev Neurosci, 24(1):79–88, 2002.



- [166] LIN, C. H. und P. FORSCHER: *Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow*. Neuron, 14(4):763–771, Apr 1995.
- [167] LIN, C. H., C. A. THOMPSON und P. FORSCHER: *Cytoskeletal reorganization underlying growth cone motility*. Curr Opin Neurobiol, 4(5):640–647, Oct 1994.
- [168] LINDNER, J., F. G. RATHJEN und M. SCHACHNER: *L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum*. Nature, 305(5933):427–430, 1983.
- [169] LITTLE, C., W. MURRAY und A. CLOUDMAN: *The Genetics of Non-Epithelial Tumor Formation in Mice*. Am. J. Cancer, 36:431–450, 1939.
- [170] LIU, J., J. D. FARMER, W. S. LANE, J. FRIEDMAN, I. WEISSMAN und S. L. SCHREIBER: *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 66(4):807–815, Aug 1991.
- [171] LOERS, G., S. CHEN, M. GRUMET und M. SCHACHNER: *Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis*. J Neurochem, 92(6):1463–1476, Mar 2005.
- [172] LOM, B., V. HÖPKER, S. MCFARLANE, J. L. BIXBY und C. E. HOLT: *Fibroblast growth factor receptor signaling in Xenopus retinal axon extension*. J Neurobiol, 37(4):633–641, Dec 1998.
- [173] LUSKIN, M. B. und C. J. SHATZ: *Studies of the earliest generated cells of the cat's visual cortex: cogeneration of subplate and marginal zones*. J Neurosci, 5(4):1062–1075, Apr 1985.
- [174] LYONS, W. E., E. B. GEORGE, T. M. DAWSON, J. P. STEINER und S. H. SNYDER: *Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 91(8):3191–3195, Apr 1994.

- [175] LÜTHI, A., H. MOHAJERI, M. SCHACHNER und J. P. LAURENT: *Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes.* J Neurosci Res, 46(1):1–6, Oct 1996.
- [176] MARETZKY, T., M. SCHULTE, A. LUDWIG, S. ROSE-JOHN, C. BLOBEL, D. HARTMANN, P. ALTEVOGT, P. SAFTIG und K. REISS: *L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth.* Mol Cell Biol, 25(20):9040–9053, Oct 2005.
- [177] MARK, M. D., Y. LIU, S. T. WONG, T. R. HINDS und D. R. STORM: *Stimulation of neurite outgrowth in PC12 cells by EGF and KCl depolarization: a Ca(2+)-independent phenomenon.* J Cell Biol, 130(3):701–710, Aug 1995.
- [178] MARTIN-BELMONTE, F., A. GASSAMA, A. DATTA, W. YU, U. RESCHER, V. GERKE und K. MOSTOV: *PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42.* Cell, 128(2):383–397, Jan 2007.
- [179] MARTINI, R.: *Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves.* J Neurocytol, 23(1):1–28, Jan 1994.
- [180] MARTINI, R. und M. SCHACHNER: *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(6 Pt 1):2439–2448, Dec 1986.
- [181] MARTINI, R. und M. SCHACHNER: *Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein)*

- in regenerating adult mouse sciatic nerve.* J Cell Biol, 106(5):1735–1746, May 1988.
- [182] MAY, R. C., E. CARON, A. HALL und L. M. MACHESKY: *Involvement of the Arp2/3 complex in phagocytosis mediated by FcγR or CR3.* Nat Cell Biol, 2(4):246–248, Apr 2000.
- [183] MCKEEHAN, W. L. und R. G. HAM: *Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers.* J Cell Biol, 71(3):727–734, Dec 1976.
- [184] MEBERG, P. J. und J. R. BAMBURG: *Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor.* J Neurosci, 20(7):2459–2469, Apr 2000.
- [185] MEBERG, P. J., S. ONO, L. S. MINAMIDE, M. TAKAHASHI und J. R. BAMBURG: *Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension.* Cell Motil Cytoskeleton, 39(2):172–190, 1998.
- [186] MECHTERSHEIMER, S., P. GUTWEIN, N. AGMON-LEVIN, A. STOECK, M. OLESZEWSKI, S. RIEDLE, R. POSTINA, F. FAHRENHOLZ, M. FOGEL, V. LEMMON und P. ALTEVOGT: *Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins.* J Cell Biol, 155(4):661–673, Nov 2001.
- [187] MEIRI, K. F., J. L. SAFFELL, F. S. WALSH und P. DOHERTY: *Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones.* J Neurosci, 18(24):10429–10437, Dec 1998.

- [188] MIKI, H., S. SUETSUGU und T. TAKENAWA: *WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac*. EMBO J, 17(23):6932–6941, Dec 1998.
- [189] MILEV, P., D. R. FRIEDLANDER, T. SAKURAI, L. KARTHIKEYAN, M. FLAD, R. K. MARGOLIS, M. GRUMET und R. U. MARGOLIS: *Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules*. J Cell Biol, 127(6 Pt 1):1703–1715, Dec 1994.
- [190] MILLARD, T. H., S. J. SHARP und L. M. MACHESKY: *Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex*. Biochem J, 380(Pt 1):1–17, May 2004.
- [191] MILLER, K. G., C. M. FIELD, B. M. ALBERTS und D. R. KELLOGG: *Use of actin filament and microtubule affinity chromatography to identify proteins that bind to the cytoskeleton*. Methods Enzymol, 196:303–319, 1991.
- [192] MILLER, R. K., S. C. CHENG und M. D. ROSE: *Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules*. Mol Biol Cell, 11(9):2949–2959, Sep 2000.
- [193] MIURA, M., H. ASOU, M. KOBAYASHI und K. UYEMURA: *Functional expression of a full-length cDNA coding for rat neural cell adhesion molecule L1 mediates homophilic intercellular adhesion and migration of cerebellar neurons*. J Biol Chem, 267(15):10752–10758, May 1992.
- [194] MIURA, M., M. KOBAYASHI, H. ASOU und K. UYEMURA: *Molecular cloning of cDNA encoding the rat neural cell adhesion molecule L1. Two L1 isoforms in the cytoplasmic region are produced by differential splicing*. FEBS Lett, 289(1):91–95, Sep 1991.

- [195] MOHAJERI, M. H., U. BARTSCH, H. VAN DER PUTTEN, G. SANSIG, L. MUCKE und M. SCHACHNER: *Neurite outgrowth on non-permissive substrates in vitro is enhanced by ectopic expression of the neural adhesion molecule L1 by mouse astrocytes*. Eur J Neurosci, 8(6):1085–1097, Jun 1996.
- [196] MOLLOY, M. P., B. R. HERBERT, K. L. WILLIAMS und A. A. GOOLEY: *Extraction of Escherichia coli proteins with organic solvents prior to two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 20(4-5):701–704, 1999.
- [197] MOORE, S. W., J. P. CORREIA, K. L. W. SUN, M. POOL, A. E. FOURNIER und T. E. KENNEDY: *Rho inhibition recruits DCC to the neuronal plasma membrane and enhances axon chemoattraction to netrin 1*. Development, 135(17):2855–2864, Sep 2008.
- [198] MOOS, M., R. TACKE, H. SCHERER, D. TEPLow, K. FRÜH und M. SCHACHNER: *Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin*. Nature, 334(6184):701–703, Aug 1988.
- [199] MORGAN, T. E., R. O. LOCKERBIE, L. S. MINAMIDE, M. D. BROWNING und J. R. BAMBURG: *Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor*. J Cell Biol, 122(3):623–633, Aug 1993.
- [200] MORRIS, J. A., G. KANDPAL, L. MA und C. P. AUSTIN: *DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation*. Hum Mol Genet, 12(13):1591–1608, Jul 2003.
- [201] MUNHEYUKI, E., E. NISHIDA, K. SUTOH und H. SAKAI: *Purification of cofilin, a 21,000 molecular weight actin-binding protein, from porcine kidney and identification of the cofilin-binding site in the actin sequence*. J Biochem, 97(2):563–568, Feb 1985.

- [202] NAKAMURA, M., H. MASUDA, J. HORII, K. KUMA, N. YOKOYAMA, T. OHBA, H. NISHITANI, T. MIYATA, M. TANAKA und T. NISHIMOTO: *When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin.* J Cell Biol, 143(4):1041–1052, Nov 1998.
- [203] NIETHAMMER, M., D. S. SMITH, R. AYALA, J. PENG, J. KO, M. S. LEE, M. MORABITO und L. H. TSAI: *NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein.* Neuron, 28(3):697–711, Dec 2000.
- [204] NIWA, R., K. NAGATA-OHASHI, M. TAKEICHI, K. MIZUNO und T. UEMURA: *Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin.* Cell, 108(2):233–246, Jan 2002.
- [205] NOLTE, C. und R. MARTINI: *Immunocytochemical localization of the L1 and N-CAM cell adhesion molecules and their shared carbohydrate epitope L2/HNK-1 in the developing and differentiated gustatory papillae of the mouse tongue.* J Neurocytol, 21(1):19–33, Jan 1992.
- [206] NORMAN, J. C., L. S. PRICE, A. J. RIDLEY, A. HALL und A. KOFFER: *Actin filament organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small GTP-binding proteins.* J Cell Biol, 126(4):1005–1015, Aug 1994.
- [207] OHNO, S.: *Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity.* Curr Opin Cell Biol, 13(5):641–648, Oct 2001.
- [208] OKANO, I., J. HIRAOKA, H. OTERA, K. NUNOUE, K. OHASHI, S. IWASHITA, M. HIRAI und K. MIZUNO: *Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs.* J Biol Chem, 270(52):31321–31330, Dec 1995.

- [209] OLMSTED, J. B., K. CARLSON, R. KLEBE, F. RUDDLE und J. ROSENBAUM: *Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 65(1):129–136, Jan 1970.
- [210] OLOFSSON, B.: *Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling*. Cell Signal, 11(8):545–554, Aug 1999.
- [211] ONO, S. und K. ONO: *Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics*. J Cell Biol, 156(6):1065–1076, Mar 2002.
- [212] O’ROURKE, N. A., M. E. DAILEY, S. J. SMITH und S. K. MCCONNELL: *Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex*. Science, 258(5080):299–302, Oct 1992.
- [213] OZEKI, Y., T. TOMODA, J. KLEIDERLEIN, A. KAMIYA, L. BORD, K. FUJII, M. OKAWA, N. YAMADA, M. E. HATTEN, S. H. SNYDER, C. A. ROSS und A. SAWA: *Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudeE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(1):289–294, Jan 2003.
- [214] PAYNE, H. R., S. M. BURDEN und V. LEMMON: *Modulation of growth cone morphology by substrate-bound adhesion molecules*. Cell Motil Cytoskeleton, 21(1):65–73, 1992.
- [215] PENG, J., B. J. WALLAR, A. FLANDERS, P. J. SWIATEK und A. S. ALBERTS: *Disruption of the Diaphanous-related formin Drf1 gene encoding mDia1 reveals a role for Drf3 as an effector for Cdc42*. Curr Biol, 13(7):534–545, Apr 2003.
- [216] PERSOHN, E. und M. SCHACHNER: *Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum*. J Cell Biol, 105(1):569–576, Jul 1987.

- [217] PFENNINGER, K. H., L. ELLIS, M. P. JOHNSON, L. B. FRIEDMAN und S. SOMLO: *Nerve growth cones isolated from fetal rat brain: subcellular fractionation and characterization*. Cell, 35(2 Pt 1):573–584, Dec 1983.
- [218] PIPER, M. und C. HOLT: *RNA translation in axons*. Annu Rev Cell Dev Biol, 20:505–523, 2004.
- [219] PORTES, V. DES, J. M. PINARD, P. BILLUART, M. C. VINET, A. KOULAKOFF, A. CARRIÉ, A. GELOT, E. DUPUIS, J. MOTTE, Y. BERWALD-NETTER, M. CATALA, A. KAHN, C. BELDJORD und J. CHELLY: *A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome*. Cell, 92(1):51–61, Jan 1998.
- [220] QUALMANN, B. und H. MELLOR: *Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases*. Biochem J, 371(Pt 2):233–241, Apr 2003.
- [221] QUARLES, R. H., J. L. EVERLY und R. O. BRADY: *Evidence for the close association of a glycoprotein with myelin in rat brain*. J Neurochem, 21(5):1177–1191, Nov 1973.
- [222] RAKIC, P.: *Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus*. J Comp Neurol, 141(3):283–312, Mar 1971.
- [223] RAKIC, P.: *Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex*. J Comp Neurol, 145(1):61–83, May 1972.
- [224] RAKIC, P.: *Neurons in rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition*. Science, 183(123):425–427, Feb 1974.
- [225] RAMEH, L. E., A. ARVIDSSON, K. L. CARRAWAY, A. D. COUVILLON, G. RATHBUN, A. CROMPTON, B. VANRENTERGHEN, M. P. CZECH, K. S. RAVICHANDRAN, S. J. BURAKOFF, D. S. WANG, C. S. CHEN und L. C. CANTLEY:



- A comparative analysis of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains.* J Biol Chem, 272(35):22059–22066, Aug 1997.
- [226] RAMSER, E.: *Unraveling the interactions of 14-3-3 with the neuronal proteins L1 and alpha II spectrin.* Doktorarbeit, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 2009.
- [227] RATHJEN, F. G. und M. SCHACHNER: *Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion.* EMBO J, 3(1):1–10, Jan 1984.
- [228] RATHJEN, F. G. und M. SCHACHNER: *Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion.* EMBO J, 3(1):1–10, Jan 1984.
- [229] RATHJEN, F. G., J. M. WOLFF, R. FRANK, F. BONHOEFFER und U. RUTISHAUSER: *Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation.* J Cell Biol, 104(2):343–353, Feb 1987.
- [230] RATNER, D.: *The interaction bacterial and phage proteins with immobilized Escherichia coli RNA polymerase.* J Mol Biol, 88(2):373–383, Sep 1974.
- [231] REHM, H.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics.* Spektrum-Akademischer Verlag, 5 Aufl., 2006.
- [232] REICHARDT, L. F. und K. J. TOMASELLI: *Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development.* Annu Rev Neurosci, 14:531–570, 1991.
- [233] REID, R. A., D. D. BRONSON, K. M. YOUNG und J. J. HEMPERLY: *Identification and characterization of the human cell adhesion molecule contactin.* Brain Res Mol Brain Res, 21(1-2):1–8, Jan 1994.

- [234] REINER, O., R. CARROZZO, Y. SHEN, M. WEHNERT, F. FAUSTINELLA, W. B. DOBYNS, C. T. CASKEY und D. H. LEDBETTER: *Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats*. *Nature*, 364(6439):717–721, Aug 1993.
- [235] RIDLEY, A. J.: *Rho GTPases and cell migration*. *J Cell Sci*, 114(Pt 15):2713–2722, Aug 2001.
- [236] RIDLEY, A. J., M. A. SCHWARTZ, K. BURRIDGE, R. A. FIRTEL, M. H. GINSBERG, G. BORISY, J. T. PARSONS und A. R. HORWITZ: *Cell migration: integrating signals from front to back*. *Science*, 302(5651):1704–1709, Dec 2003.
- [237] RIENTO, K. und A. J. RIDLEY: *Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(6):446–456, Jun 2003.
- [238] RIVAS, R. J. und M. E. HATTEN: *Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons*. *J Neurosci*, 15(2):981–989, Feb 1995.
- [239] ROHATGI, R., L. MA, H. MIKI, M. LOPEZ, T. KIRCHHAUSEN, T. TAKENAWA und M. W. KIRSCHNER: *The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly*. *Cell*, 97(2):221–231, Apr 1999.
- [240] ROSE, S. P.: *Glycoproteins and memory formation*. *Behav Brain Res*, 66(1-2):73–78, Jan 1995.
- [241] ROSSO, S., F. BOLLATI, M. BISBAL, D. PERETTI, T. SUMI, T. NAKAMURA, S. QUIROGA, A. FERREIRA und A. CÁCERES: *LIMK1 regulates Golgi dynamics, traffic of Golgi-derived vesicles, and process extension in primary cultured neurons*. *Mol Biol Cell*, 15(7):3433–3449, Jul 2004.
- [242] RUOSLAHTI, E. und M. D. PIERSCHBACHER: *New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins*. *Science*, 238(4826):491–497, Oct 1987.

- [243] RUPPERT, M., S. AIGNER, M. HUBBE, H. YAGITA und P. ALTEVOGT: *The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5*. J Cell Biol, 131(6 Pt 2):1881–1891, Dec 1995.
- [244] RØNN, L. C., P. DOHERTY, A. HOLM, V. BEREZIN und E. BOCK: *Neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule requires fibroblast growth factor receptor activation*. J Neurochem, 75(2):665–671, Aug 2000.
- [245] SACHANA, M., J. FLASKOS, E. ALEXAKI und A. J. HARGREAVES: *Inhibition of neurite outgrowth in N2a cells by leptophos and carbaryl: effects on neurofilament heavy chain, GAP-43 and HSP-70*. Toxicol In Vitro, 17(1):115–120, Feb 2003.
- [246] SAFFELL, J. L., E. J. WILLIAMS, I. J. MASON, F. S. WALSH und P. DOHERTY: *Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs*. Neuron, 18(2):231–242, Feb 1997.
- [247] SAGHATELYAN, A. K., A. G. NIKONENKO, M. SUN, B. ROLF, P. PUTTHOFF, M. KUTSCHE, U. BARTSCH, A. DITYATEV und M. SCHACHNER: *Reduced GABAergic transmission and number of hippocampal perisomatic inhibitory synapses in juvenile mice deficient in the neural cell adhesion molecule L1*. Mol Cell Neurosci, 26(1):191–203, May 2004.
- [248] SAHAI, E. und C. J. MARSHALL: *RHO-GTPases and cancer*. Nat Rev Cancer, 2(2):133–142, Feb 2002.
- [249] SAKAI, T., T. FURUYAMA, Y. OHOKA, N. MIYAZAKI, S. FUJIOKA, H. SUGIMOTO, M. AMASAKI, S. HATTORI, T. MATSUYA und S. INAGAKI: *Mouse semaphorin H induces PC12 cell neurite outgrowth activating Ras-mitogen-activated protein*

- kinase signaling pathway via Ca(2+) influx.* J Biol Chem, 274(42):29666–29671, Oct 1999.
- [250] SALINA, D., K. BODOOR, D. M. ECKLEY, T. A. SCHROER, J. B. RATTNER und B. BURKE: *Cytoplasmic dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown.* Cell, 108(1):97–107, Jan 2002.
- [251] SAMBROOK, J., E. FRITSCH und T. MANIATIS: *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2 Aufl., 1989.
- [252] SASAKI, S., A. SHIONOYA, M. ISHIDA, M. J. GAMBELLO, J. YINGLING, A. WYNshaw-BORIS und S. HIROTSUNE: *A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system.* Neuron, 28(3):681–696, Dec 2000.
- [253] SCHAEFER, A. W., Y. KAMEI, H. KAMIGUCHI, E. V. WONG, I. RAPOPORT, T. KIRCHHAUSEN, C. M. BEACH, G. LANDRETH, S. K. LEMMON und V. LEMMON: *L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1.* J Cell Biol, 157(7):1223–1232, Jun 2002.
- [254] SCHAEFER, A. W., H. KAMIGUCHI, E. V. WONG, C. M. BEACH, G. LANDRETH und V. LEMMON: *Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization.* J Biol Chem, 274(53):37965–37973, Dec 1999.
- [255] SCHMECHEL, D. E. und P. RAKIC: *A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes.* Anat Embryol (Berl), 156(2):115–152, Jun 1979.
- [256] SCHMID, R. S., B. R. MIDKIFF, V. P. KEDAR und P. F. MANESS: *Adhesion molecule L1 stimulates neuronal migration through Vav2-Pak1 signaling.* Neuroreport, 15(18):2791–2794, Dec 2004.

- [257] SCHMID, R. S., W. M. PRUITT und P. F. MANESS: *A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis*. J Neurosci, 20(11):4177–4188, Jun 2000.
- [258] SCHMIDT, A. und A. HALL: *Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch*. Genes Dev, 16(13):1587–1609, Jul 2002.
- [259] SCHMIDT, C., V. KÜNEMUND, E. S. WINTERGERST, B. SCHMITZ und M. SCHACHNER: *CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1*. J Neurosci Res, 43(1):12–31, Jan 1996.
- [260] SCHNEEGANS, T.: *Untersuchungen zum Einfluss der Proteine NFI-A und LIS1 auf Expression und Funktion des Zellerkennungsmoleküls L1*. Doktorarbeit, Universität Hamburg, 2005.
- [261] SHIMADA, T., M. TORIYAMA, K. UEMURA, H. KAMIGUCHI, T. SUGIURA, N. WATANABE und N. INAGAKI: *Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth*. J Cell Biol, 181(5):817–829, Jun 2008.
- [262] SHU, T., R. AYALA, M.-D. NGUYEN, Z. XIE, J. G. GLEESON und L.-H. TSAI: *Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning*. Neuron, 44(2):263–277, Oct 2004.
- [263] SILVA, J. S. D., V. SCHUBERT und C. G. DOTTI: *RhoA, Rac1, and cdc42 intracellular distribution shift during hippocampal neuron development*. Mol Cell Neurosci, 27(1):1–7, Sep 2004.
- [264] SINZ, A.: *Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes*. J Mass Spectrom, 38(12):1225–1237, Dec 2003.

- [265] SMITH, D. S., M. NIETHAMMER, R. AYALA, Y. ZHOU, M. J. GAMBELLO, A. WYNshaw-BORIS und L. H. TSAI: *Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1*. Nat Cell Biol, 2(11):767–775, Nov 2000.
- [266] SMITH, P. K., R. I. KROHN, G. T. HERMANSON, A. K. MALLIA, F. H. GARTNER, M. D. PROVENZANO, E. K. FUJIMOTO, N. M. GOEKE, B. J. OLSON und D. C. KLENK: *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 150(1):76–85, Oct 1985.
- [267] SNAPPER, S. B., F. TAKESHIMA, I. ANTÓN, C. H. LIU, S. M. THOMAS, D. NGUYEN, D. DUDLEY, H. FRASER, D. PURICH, M. LOPEZ-ILASACA, C. KLEIN, L. DAVIDSON, R. BRONSON, R. C. MULLIGAN, F. SOUTHWICK, R. GEHA, M. B. GOLDBERG, F. S. ROSEN, J. H. HARTWIG und F. W. ALT: *N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility*. Nat Cell Biol, 3(10):897–904, Oct 2001.
- [268] SOGAWA, Y., Y. YOSHIMURA, A. OTAKA und T. YAMAUCHI: *Ca(2+)-independent activity of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II involved in stimulation of neurite outgrowth in neuroblastoma cells*. Brain Res, 881(2):165–175, Oct 2000.
- [269] SOLECKI, D. J., L. MODEL, J. GAETZ, T. M. KAPOOR und M. E. HATTEN: *Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration*. Nat Neurosci, 7(11):1195–1203, Nov 2004.
- [270] STANLEY, P. und L. SIMINOVITCH: *Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins*. Somatic Cell Genet, 3(4):391–405, Jul 1977.

- [271] SUCHANEK, M., A. RADZIKOWSKA und C. THIELE: *Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells.* Nat Methods, 2(4):261–267, Apr 2005.
- [272] SUMI, T., K. MATSUMOTO und T. NAKAMURA: *Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase.* J Biol Chem, 276(1):670–676, Jan 2001.
- [273] SUTER, D. M., L. D. ERRANTE, V. BELOTSERKOVSKY und P. FORSCHER: *The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling.* J Cell Biol, 141(1):227–240, Apr 1998.
- [274] TAI, C.-Y., D. L. DUJARDIN, N. E. FAULKNER und R. B. VALLEE: *Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function.* J Cell Biol, 156(6):959–968, Mar 2002.
- [275] TAKEDA, Y., H. ASOU, Y. MURAKAMI, M. MIURA, M. KOBAYASHI und K. UYEMURA: *A nonneuronal isoform of cell adhesion molecule L1: tissue-specific expression and functional analysis.* J Neurochem, 66(6):2338–2349, Jun 1996.
- [276] TAKEICHI, M., H. INUZUKA, K. SHIMAMURA, M. MATSUNAGA und A. NOSE: *Cadherin-mediated cell-cell adhesion and neurogenesis.* Neurosci Res Suppl, 13:S92–S96, 1990.
- [277] TANAKA, T., F. F. SERNEO, C. HIGGINS, M. J. GAMBELLO, A. WYNshaw-BORIS und J. G. GLEESON: *Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration.* J Cell Biol, 165(5):709–721, Jun 2004.
- [278] TASHIMA, K., H. YAMAMOTO, C. SETOYAMA, T. ONO und E. MIYAMOTO: *Over-expression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II inhibits neurite out-growth of PC12 cells.* J Neurochem, 66(1):57–64, Jan 1996.

- [279] TAYA, S., T. SHINODA, D. TSUBOI, J. ASAKI, K. NAGAI, T. HIKITA, S. KURODA, K. KURODA, M. SHIMIZU, S. HIROTSUNE, A. IWAMATSU und K. KAIBUCHI: *DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1*. J Neurosci, 27(1):15–26, Jan 2007.
- [280] THIERY, J. P., R. BRACKENBURY, U. RUTISHAUSER und G. M. EDELMAN: *Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina*. J Biol Chem, 252(19):6841–6845, Oct 1977.
- [281] THURNHERR, T., Y. BENNINGER, X. WU, A. CHROSTEK, S. M. KRAUSE, K.-A. NAVE, R. J. M. FRANKLIN, C. BRAKEBUSCH, U. SUTER und J. B. RELVAS: *Cdc42 and Rac1 signaling are both required for and act synergistically in the correct formation of myelin sheaths in the CNS*. J Neurosci, 26(40):10110–10119, Oct 2006.
- [282] TIGYI, G., D. J. FISCHER, A. SEBÖK, C. YANG, D. L. DYER und R. MILEDI: *Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca<sup>2+</sup> signaling and Rho*. J Neurochem, 66(2):537–548, Feb 1996.
- [283] TORIYAMA, M., T. SHIMADA, K. B. KIM, M. MITSUBA, E. NOMURA, K. KATSUTA, Y. SAKUMURA, P. ROEPSTORFF und N. INAGAKI: *Shootin1: A protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization*. J Cell Biol, 175(1):147–157, Oct 2006.
- [284] TOSHIMA, J., J. Y. TOSHIMA, T. AMANO, N. YANG, S. NARUMIYA und K. MIZUNO: *Cofilin phosphorylation by protein kinase testicular protein kinase 1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation*. Mol Biol Cell, 12(4):1131–1145, Apr 2001.



- [285] TOSHIMA, J., J. Y. TOSHIMA, M. SUZUKI, T. NODA und K. MIZUNO: *Cell-type-specific expression of a TESK1 promoter-linked lacZ gene in transgenic mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(3):566–573, Aug 2001.
- [286] TOWBIN, H., T. STAHELIN und J. GORDON: *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9):4350–4354, Sep 1979.
- [287] TRAKSELIS, M. A., S. C. ALLEY und F. T. ISHMAEL: *Identification and mapping of protein-protein interactions by a combination of cross-linking, cleavage, and proteomics*. *Bioconjug Chem*, 16(4):741–750, 2005.
- [288] TSAI, L.-H. und J. G. GLEESON: *Nucleokinesis in neuronal migration*. *Neuron*, 46(3):383–388, May 2005.
- [289] TURSUN, B., A. SCHLÜTER, M. A. PETERS, B. VIEHWEGER, H. P. OSTENDORFF, J. SOOSAIRAJAH, A. DRUNG, M. BOSSENZ, S. A. JOHNSEN, M. SCHWEIZER, O. BERNARD und I. BACH: *The ubiquitin ligase Rnf6 regulates local LIM kinase 1 levels in axonal growth cones*. *Genes Dev*, 19(19):2307–2319, Oct 2005.
- [290] TYUKHTENKO, S., L. DESHMUKH, V. KUMAR, J. LARY, J. COLE, V. LEMMON und O. VINOGRADOVA: *Characterization of the neuron-specific L1-CAM cytoplasmic tail: naturally disordered in solution it exercises different binding modes for different adaptor proteins*. *Biochemistry*, 47(13):4160–4168, Apr 2008.
- [291] UEHATA, M., T. ISHIZAKI, H. SATOH, T. ONO, T. KAWAHARA, T. MORISHITA, H. TAMAKAWA, K. YAMAGAMI, J. INUI, M. MAEKAWA und S. NARUMIYA: *Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension*. *Nature*, 389(6654):990–994, Oct 1997.
- [292] VITS, L., G. V. CAMP, P. COUCKE, E. FRANSEN, K. D. BOULLE, E. REYNIERS, B. KORN, A. POUSTKA, G. WILSON und C. SCHRANDER-STUMPEL: *MASA syn-*

- drome is due to mutations in the neural cell adhesion gene L1CAM.* Nat Genet, 7(3):408–413, Jul 1994.
- [293] VIVÈS, E., P. BRODIN und B. LEBLEU: *A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus.* J Biol Chem, 272(25):16010–16017, Jun 1997.
- [294] WALSH, F. S. und P. DOHERTY: *Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance.* Annu Rev Cell Dev Biol, 13:425–456, 1997.
- [295] WANG, D., Z. LI, E. M. MESSING und G. WU: *Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM.* J Biol Chem, 277(39):36216–36222, Sep 2002.
- [296] WELLER, S. und J. GÄRTNER: *Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene.* Hum Mutat, 18(1):1–12, 2001.
- [297] WEN, Y., C. H. ENG, J. SCHMORANZER, N. CABRERA-POCH, E. J. S. MORRIS, M. CHEN, B. J. WALLAR, A. S. ALBERTS und G. G. GUNDERSEN: *EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration.* Nat Cell Biol, 6(9):820–830, Sep 2004.
- [298] WHITTARD, J. D., T. SAKURAI, M. R. CASSELLA, M. GAZDOIU und D. P. FELSENFELD: *MAP kinase pathway-dependent phosphorylation of the L1-CAM ankyrin binding site regulates neuronal growth.* Mol Biol Cell, 17(6):2696–2706, Jun 2006.
- [299] WICHTERLE, H., J. M. GARCIA-VERDUGO und A. ALVAREZ-BUYLLA: *Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration.* Neuron, 18(5):779–791, May 1997.

- [300] WILLIAMS, A. F. und A. N. BARCLAY: *The immunoglobulin superfamily—domains for cell surface recognition*. *Annu Rev Immunol*, 6:381–405, 1988.
- [301] WILLIAMS, E. J., J. FURNESS, F. S. WALSH und P. DOHERTY: *Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin*. *Neuron*, 13(3):583–594, Sep 1994.
- [302] WOLFER, D. P., H. M. MOHAJERI, H. P. LIPP und M. SCHACHNER: *Increased flexibility and selectivity in spatial learning of transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes*. *Eur J Neurosci*, 10(2):708–717, Feb 1998.
- [303] WONG, E. V., A. W. SCHAEFER, G. LANDRETH und V. LEMMON: *Involvement of p90<sup>sk</sup> in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1*. *J Biol Chem*, 271(30):18217–18223, Jul 1996.
- [304] WOOD, P. M., M. SCHACHNER und R. P. BUNGE: *Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule*. *J Neurosci*, 10(11):3635–3645, Nov 1990.
- [305] WU, G. Y. und H. T. CLINE: *Stabilization of dendritic arbor structure in vivo by CaMKII*. *Science*, 279(5348):222–226, Jan 1998.
- [306] YAMAGUCHI, Y., H. KATOH, H. YASUI, K. MORI und M. NEGISHI: *RhoA inhibits the nerve growth factor-induced Rac1 activation through Rho-associated kinase-dependent pathway*. *J Biol Chem*, 276(22):18977–18983, Jun 2001.
- [307] YANG, E., H. KIM, J. LEE, J. S. SHIN, H. YOON, S. J. KIM und I. H. CHOI: *Overexpression of LIM kinase 1 renders resistance to apoptosis in PC12 cells by inhibition of caspase activation*. *Cell Mol Neurobiol*, 24(2):181–192, Apr 2004.

- [308] YANG, N., O. HIGUCHI und K. MIZUNO: *Cytoplasmic localization of LIM-kinase 1 is directed by a short sequence within the PDZ domain.* Exp Cell Res, 241(1):242–252, May 1998.
- [309] YAVIN, E. und Z. YAVIN: *Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine-coated surface.* J Cell Biol, 62(2):540–546, Aug 1974.
- [310] YONEZAWA, N., Y. HOMMA, I. YAHARA, H. SAKAI und E. NISHIDA: *A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin.* J Biol Chem, 266(26):17218–17221, Sep 1991.
- [311] ZEBDA, N., O. BERNARD, M. BAILLY, S. WELTI, D. S. LAWRENCE und J. S. CONDEELIS: *Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension.* J Cell Biol, 151(5):1119–1128, Nov 2000.
- [312] ZHANG, X., J. Q. DAVIS, S. CARPENTER und V. BENNETT: *Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin.* J Biol Chem, 273(46):30785–30794, Nov 1998.
- [313] ZIGMOND, S. H.: *Formin-induced nucleation of actin filaments.* Curr Opin Cell Biol, 16(1):99–105, Feb 2004.
- [314] ZISCH, A. H. und E. B. PASQUALE: *The Eph family: a multitude of receptors that mediate cell recognition signals.* Cell Tissue Res, 290(2):217–226, Nov 1997.
- [315] ZISCH, A. H., W. B. STALLCUP, L. D. CHONG, K. DAHLIN-HUPPE, J. VOSHOL, M. SCHACHNER und E. B. PASQUALE: *Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cdk5.* J Neurosci Res, 47(6):655–665, Mar 1997.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Ab	Antikörper
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ACC	<i>agenesis of corpus callosum</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADF	<i>actin depolymerizing factor</i>
Amp	Ampicillin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP-2	<i>Activator protein 2</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli tumor supressor protein</i>
aPKC	<i>atypical protein kinase C</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	<i>actin-related protein-2/3</i>
BAPTA-AM	1,2-bis-( <i>o</i> -Aminophenoxy)-ethan- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure, Tetraacetoxyme- thylester
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BIS	<i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
Cam	Chloramphenicol
CAM	<i>cell adhesion molecules</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cek5	<i>chicken embryo kinase 5</i>
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
c-Domäne	zentrale Domäne
CIN	Chronophin

---

CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
ChL1	<i>close homolog of L1</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CLIP-170	<i>cytoplasmic linker protein 170</i>
CRIB	<i>Cdc42/Rac-interactive binding domain</i>
CsA	Cyclosporin A
Cy	Cyanin-Farbstoff
Da	Dalton
DCC	<i>deleted in colonrectal cancer</i>
DCX	Doublecortin
dd H <sub>2</sub> O	destilliertes, deionisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant-negativ
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DRF	<i>diaphanous-related formin</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Embryonaltag
EB1	<i>End-binding protein 1</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
euk.	eukaryotisch
F-Aktin	Aktinfilamente
Fc	<i>fragment crystalline</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FGF-R	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
FN III	Fibronektin Typ III
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>guanine nucleotide-dissociation inhibitor</i>

GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTP $\gamma$ S	Guanosin-5'-(3- <i>o</i> -thio)-triphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperzino)-ethansulfonsäure
HIS	6fach His-Markierung
Hom.	Homogenat
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	<i>horse serum</i>
HSAS	<i>hydrocephalus due to the aqueduct of Sylvius</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -L-thiogalaktosid
IMAC	<i>immobilized-metal affinity chromatography</i>
izd	intrazelluläre Domäne
Kan	Kanamycin
ko	<i>knock-out</i>
LB	Luria Bertani
LIM	von Lin11, Isl-1 und Mec
m	Maus
MAG	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MASA	<i>mental retardation, aphasia, shuffling gait, adducted thumb</i>
MATra	<i>magnet-assisted transfection</i>
mc	monoklonal
MEKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
mDia	<i>mammalian diaphanous</i>
MLC	<i>myosin light chain</i>
MS	Massenspektrometrie

---

MTOC	<i>microtubule organizing center</i>
Mw	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewicht <i>cut-off</i>
NC	Nitrocellulose
NCAM	<i>neuronal cell adhesion molecule</i>
Nde1	<i>nuclear distribution protein NudE homolog 1</i>
Ndel1	<i>nuclear distribution protein NudE-like 1</i>
NILE	<i>nerve growth factor-inducible large external glycoprotein</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
NMD	<i>neuronal migration disorder</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NP-40	Nonidet P-40
NrCAM	<i>NgCAM related neuronal cell adhesion molecule</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
Nud	<i>nuclear distribution</i>
OD	optische Dichte
P	postnatal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	<i>p21-activated protein kinase</i>
PAR	<i>polarity protein partitioning-defective</i>
PBS	<i>phosphate buffered salt solution</i>
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
pc	polyklonal
pd	<i>pull-down</i>
p-Domäne	periphere Domäne
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PH	<i>plextrin homology</i>
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PLL	Poly-L-Lysin
prok.	prokaryotisch
P/S	Penicillin/Streptomycin
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RanBPM	<i>Ran-binding protein M</i>
RBD	<i>Rho binding domain</i>
rel.	relativ



---

ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SCAR/WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sos	<i>Son of sevenless</i>
SP1	<i>spastic paraparesis type 1</i>
src	<i>steroid receptor coactivator</i>
SSH	Slingshot Phosphatase
Stim.	Stimulation
Sulfo-SBED	Sulfosuccinimidyl-[2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)- hexanoamido]ethyl-1,3'-dithiopropionat
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered salt solution</i>
TBST	<i>tris buffered salt solution mit Tween 20</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin</i>
TESK	<i>testicular protein kinase</i>
TI-VAMP	<i>tetanus neurotoxin-insensitive vesicle associated membrane protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (enzymatisch)
UV	ultraviolett
Verd.	Verdünnung
v/v	Volumen pro Volumen
WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
WB	Westernblot
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp

**Aminosäuren**

<b>Aminosäure</b>	<b>Dreibuchstabencode</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

**9.2 Sequenzen der rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteine**

L1cfi-His (mouse) Mw: 13,7 kDa

His-CFIKRSKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETFGEYRSLESDNEEKAFGSSQPSLNG-  
DIKPLGSDDSLADYGGSDVDVQFNEDGSFIGQYSGKKEKEAAGGNDSSGATSPINPAVALE

NCAM140-His (rat) Mw: 14,2 kDa

His-DITCYFLNKCGLLMCIAVNLCGKAGPGAKGKDMEEGKAAFSKDESKEPIVEVRTEEER-  
TPNHDGGKHTEPNETTPLTEPEKGPVETKSEPQESEAKPAPTEVKTVPNEATQTKENESKA

GST-Cofilin-1 (mouse) Mw: 35 kDa

GST-MASGVAVSDGVIKVFNDMKVRKSSTPEEVKKRKKAVLFCLSEDKKNIIILEEGKEIIVGD-  
VGQTVDDPYTTFFVKMLPKDCRYALYDATYETKESKKEDLVFIFWAPENAPLKSMMIYASSK-  
DAIKKKLTGIKHELQANCYEEVKDRCTLAEKLGGSAVISLEGKPL

GST-PAK1-CRIB (mouse) Mw: 35,8 kDa

GST-RSILPGDKTNKKKEKERPEISLPSDFEHTIHVGFDVAVTGEFTGMPEQWARLLQTSNIT-  
KSEQKKNPQAVLDVLEFYNSKKTSNSQK

GST-Rhotekin-RBD (mouse) Mw: 35,5 kDa

GST-ILEDLNMLYIRQMALSLEDTELQRKLDHEIRMRDGACKLLAACSQREQALEATKSLIV-  
CNSRILSYMGEHQRRKEAQVEEKTG

### 9.3 Gefahrensymbole

O	Brandfördernd	T	Giftig
C	Ätzend	T+	Sehr giftig
E	Explosionsgefährlich	Xn	Gesundheitsschädlich
F	Leichtentzündlich	Xi	Reizend
F+	Hochentzündlich	N	Umweltgefährlich

### 9.4 Gefahrstoffe

Die folgende Liste beinhaltet sämtliche in der Arbeit verwendete Gefahrstoffe mit ihren Risiko- und Sicherheitssätzen.

Gefahrstoff	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	22-24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
2-Propanol	F, Xi	11-36-67	7-16-24-26
ABTS	Xi	36/37/38	26-36
Acrylamide/Bis, 29:1	T	20/21-25-36/38-43-45-46- 48/23/24/25-62	53-9-20-23-26-36/37/39- 45-60
Ampicillin		42/43	23-26
Aprotinin	Xn	22-42/43	22-24-36/37-45
APS	O, Xn	8-22-36/37/38-42/43	22-24-26-37
BC-Assay Lösung A	Xi	36	26-36
BC-Assay Lösung B	Xn	21/22	1/2-36/37-45
Chloroform	Xn	22-38-40-48-20/22	36/37
Coomassie Brilliant Blau			22-24/25
Dithiothreitol	Xn	22-36/38	24/25
EDTA	Xi	22-36/37/38	26-36
Essigsäure 100 %	C	10-35	23.2-26-45
Ethanol	F	11	7-16
Ethanolamin	C	20/21/22-34	(1/2)-26-36/37/39-45
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
Kanamycinsulfat	T	61	45-36/37/39
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23-24/25	7-16-36/37-45
Methylenblau	Xn	22	

Tris	Xi	36/38	26
TEMED	F, C	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Toluidinblau			22-24/25
Natriumazid	T+, N	28-32-50/53	28.1-45-60-61
Natriumcarbonat	Xi	36	(2)-22-26
Natriumhydroxid	C	35	26-37/39-45
Natriumselenit	T+, N	23-28-31-43-51/53	28-36/37-45-61
Nonidet P-40	Xi	36/38	23
Paraformaldehyd	Xn	20/22-36/37/38-40-43	22-26-36/37
Penicillin	Xn	42/43	22-36/37
Phenol	T	24/25-34	28.6-45
Salzsäure 37 %	C	34-37	26-36/37/39-45
SDS	Xn	21/22-36/37/38	26-36/37
Streptomycin	Xn	22-61	53-36/37/39-45
L-Thyroxin			22-24/25
Triton X-100	Xi	36/37/38	26-36
Trypsin	Xi	36/37/38-42	22-24-26-36/37
Wasserstoffperoxid 30 %	C	34	3-26-36/37/39-45

### 9.4.1 Risiko- und Sicherheitssätze

#### R-Sätze

---

R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
R 10	Entzündlich.
R 11	Leichtentzündlich.
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut.
R 25	Giftig beim Verschlucken.
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken.
R 31	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R 34	Verursacht Verätzungen.
R 35	Verursacht schwere Verätzungen.
R 36	Reizt die Augen.
R 37	Reizt die Atmungsorgane.
R 38	Reizt die Haut.
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
R 45	Kann Krebs erzeugen.

R 46	Kann vererbare Schäden verursachen.
R 48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut.
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
R 39/23	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

---

#### S-Sätze

S 2	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
S 3	Kühl aufbewahren.
S 7	Behälter dicht geschlossen halten.
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
S 16	Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen.
S 20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
S 22	Staub nicht einatmen.
S 23	Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen. (geeignete Bezeichnungen vom Hersteller anzugeben)
S 23.2	Dampf nicht einatmen.
S 24	Berührung mit der Haut vermeiden.
S 26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
S 28.1	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser.
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

---

S 37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
S 53	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. – Nur für den berufsmäßigen Verwender –.
S 60	Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
S 1/2	Unter Verschluss und für Kinder unzugänglich aufbewahren.
S 24/25	Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
S 37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

**9.5 Publikationen**

Tilling T\*, Gensler S\*, Martin M, Figge C, Dotti CG and Schachner M. *The cell adhesion molecule L1 supports axonogenesis by interaction with the GTPases Rac1 and cdc42.*

(\*: Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.) In Vorbereitung.

Figge C, Schachner M, Tilling T. *L1 mediates neurite outgrowth in cerebellar neurons via cofilin.* In Vorbereitung.



## Danksagung

Frau Prof. Dr. M. Schachner danke ich für die Überlassung dieses interessanten Projektes und für die fortwährende Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. C. Betzel danke ich für die nette Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit am Department Chemie der Universität Hamburg.

Bei Herrn Dr. T. Tilling möchte ich mich ganz herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, die vielen Diskussionen und Anregungen und seine große Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die massenspektrometrische Analyse gilt mein Dank Dr. F. Buck.

Y. Feng danke ich für die freundliche Überlassung der LIS1- und Nde1-Plasmide, A. Hall für die PAK1-CRIB- und Rhotekin-RBD-Plasmide und I. Bach für den Cofilin-Expressionsvektor.

Bei Herrn Prof. Dr. Carlos Dotti bedanke ich mich für die vielen Anregungen und Ideen im Rahmen unserer Kooperation.

Für die Einweisung in die Primärzellkultur und die Beantwortung vieler Fragen möchte ich mich bei G. Dityateva und A. Dityatev sowie G. Loers und N. Karl bedanken.

Bei F. Morellini möchte ich mich für die große Hilfe und die Beantwortung vieler Fragen bei der statistischen Analyse meiner Daten bedanken.

G. Wolters danke ich insbesondere für die Zusammenarbeit bei der Affinitätschromatographie und zudem für die vielen guten Diskussionen und Ratschläge.

Meinen lieben Kollegen danke ich herzlich für die großartige Unterstützung und die tolle Atmosphäre, allen voran Janinne und Daniel, den letzten Mitstreitern aus E.32.

Bei meinen Eltern möchte ich mich besonders bedanken, denn ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit gar nicht möglich gewesen.

Chema, no sé como agradecértelo! Un millón de gracias!

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, Carina Figge, geb. 03.01.1980 in Haan, dass zuvor keine weiteren Promotionsversuche von mir unternommen worden sind oder an anderer Stelle vorgelegt wurden.

Hamburg, den

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Carina Figge, geb. 03.01.1980 in Haan, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Hamburg, den