



UNIVERSITÄT HAMBURG

**Yeast two-hybrid Systeme zur Identifikation
zytoplasmatischer Interaktionspartner der neuronalen
Zelladhäsionsmoleküle MAG, P0 und NCAM**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der
Universität Hamburg

vorgelegt von
ULRICH BORMANN

Hamburg, Oktober 2001

Gutachter:

Herr Prof. Dr. G. Gercken

Frau Prof. Dr. M. Schachner

I	EINLEITUNG	1
1	Neuronale Zelladhäsionsmoleküle	1
1.1	Immunglobulin-Superfamilie	1
1.1.1	Das myelin-assoziierte Glykoprotein - MAG	2
1.1.2	Das Myelin-Protein Zero - P0	7
1.1.3	Das neuronale Zelladhäsionsmolekül - NCAM	10
2	Detektion von intrazellulären Proteininteraktionen	15
2.1	Yeast two-hybrid System	15
2.2	Ras Recruitment System	18
II	ZIELSETZUNG	21
III	MATERIAL	22
1	Chemikalien	22
2	Lösungen und Puffer	22
3	Nährmedien	30
4	Bakterien- und Hefestämme, Zelllinien	32
5	Zellkulturlösungen und -medien	33
6	Molekulargewichtsstandards	34
7	Vektoren	34
8	Antikörper	35
8.1	Primäre Antikörper	35
8.2	Sekundäre Antikörper	36

IV	METHODEN	37
1	DNS-Techniken	37
1.1	Transformation von Bakterien	37
1.2	Plasmidisolation aus 1,5 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen	37
1.3	Plasmidisolation aus 15 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen	38
1.4	Plasmidisolation aus 400 ml <i>E. coli</i> Bakterienkulturen	38
1.5	Restriktionsverdau von DNS	39
1.6	Dephosphorylierung freier DNS-Enden	39
1.7	Ligation von DNS-Fragmenten	40
1.8	Polymerase-Kettenreaktion	40
1.9	Aufreinigung von PCR-Produkten	41
1.10	Gelelektrophorese von DNS	41
1.11	DNS-Isolation aus Agarosegelen	42
1.12	DNS-Reinheitsanalyse und Konzentrationsbestimmung	42
1.13	DNS-Sequenzierung	42
2	RNS-Techniken	43
2.1	Isolation von Gesamt-RNS aus bovinem Ischiasnerv	43
2.2	Isolation von mRNS	44
2.3	Gelelektrophorese von RNS	44
2.4	Konstruktion einer cDNS-Bank aus bovinem Ischiasnerv	45
2.5	Amplifikation von cDNS-Banken	46
3	Interaktionstests	46
3.1	Yeast two-hybrid System	46
3.1.1	Kultivierung und Transformation von Hefestämmen	46
3.1.2	Transformation einzelner Plasmide	47
3.1.3	Durchmusterung von cDNS-Banken	47
3.1.4	β -Galaktosidase-Aktivitätstest	49
3.1.5	Plasmidisolation aus Hefekulturen	49
3.1.6	Elektroporation von Plasmid-DNS in <i>E. coli</i> Bakterien	50
3.2	Ras Recruitment System (RRS)	50

3.3	Oberflächenplasmonresonanz (Biacoresystem)	51
3.4	Calmodulin-Bindungsassay	52
4	Proteinbiochemische Methoden	53
4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit dem BCA-Test	53
4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	53
4.3	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	53
4.4	Western-Blot-Analyse	54
4.4.1	Elektrophoretischer Transfer	54
4.4.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	54
4.4.3	Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz	55
4.5	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	55
4.6	Rekombinante Expression von Proteinen in <i>E. coli</i> mit dem pQE-System	56
4.7	Bakterienlyse mit der French Press	56
4.8	Membranisolation von CHO- und N2A-Zellen	57
4.9	Proteaseassay an isolierten Membranen	57
5	Zellkulturtechniken	57
5.1	Präparation und Kultivierung von primären Hippocampusneuronen	57
5.2	Kultivierung von CHO- und N2A-Zellen	58
5.3	Transfektion von CHO-Zellen	58
5.4	Lyse von CHO- und N2A-Zellen	59
6	Computerunterstützte Sequenzanalyse	59
V	ERGEBNISSE	60
1	Suche nach Bindungspartnern mit dem Yeast two-hybrid System	60
1.1	Darstellung der S-, L-MAG- und P0-Köder und Test der Konstrukte auf Autoaktivierung im Yeast two-hybrid System	60
1.2	Herstellung der cDNS-Bank aus bovinem Ischiasnerv	61
1.3	Durchmusterung der Ischiasnerv cDNS-Bank mit dem P0-Köder	61
1.4	Durchmusterung der Ratten-Hirn-cDNS-Bank mit dem S-MAG-Köder	62

2	Suche nach Bindungspartnern mit dem Ras Recruitment System	62
2.1	Darstellung der L-MAG- und NCAM-Konstrukte und Test auf Einsetzbarkeit im RRS	63
2.2	Durchmusterung der RRS-cDNS-Bank mit dem L-MAG-Köder	64
2.3	Durchmusterung der RRS-cDNS-Bank mit dem NCAM140tr.-Köder	65
2.4	Durchmusterung der RRS-cDNS-Bank mit dem NCAM180tr.-Köder	66
3	Untersuchung der NCAM-Calmodulin-Interaktion	66
3.1	Expression der intrazellulären Domänen von NCAM	66
3.2	Oberflächenplasmonresonanz-Analysen	67
3.3	CaM-Bindungsassay	71
3.4	Überprüfung der NCAM-CaM-Interaktion im Ras Recruitment System	72
3.5	Untersuchung der Verteilung von Calmodulin und NCAM in primären Hippocampusneuronen	73
3.6	Calmodulin und die Proteolyse von NCAM	74
3.6.1	CaM-Inhibitionsstudien an isolierten N2A-Plasmamembranen	75
3.6.2	CaM- und Proteaseinhibitionsstudien in Zellkultur	76
3.6.3	NCAM-Proteolyse in TACE-defizienten Fibroblasten	79
VI	DISKUSSION	82
1	Suche nach Bindungspartnern mit konventionellem Yeast two-hybrid und Ras Recruitment System	82
2	NCAM-Calmodulin-Interaktion	85
VII	ZUSAMMENFASSUNG	91
VII	SUMMARY	93
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	95

IX	ANHANG	115
1	Oligonukleotide	115
2	Datenbankeinträge	115
3	Plasmide	116
3.1	Yeast two-hybrid Konstrukte	116
3.2	Ras Recruitment Konstrukte	117
3.3	Expressionskonstrukte	119
4	Lebenslauf	122
	Danksagung	123

Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
CAM	Zelladhäsionsmolekül
cfu	„colony-forming unit“
CHX	Cycloheximid
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DNS-BD	DNS-Bindungsdomäne
DMEM	Dulbeccos Medium
DTT	Dithiotreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
ECM	Extrazelluläre Matrix
FAK	focal adhesion kinase
f.c.	Endkonzentration
FCS	fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
GEF	Guanylnukleotidaustauschfaktor
GMEM	Glasgow Medium
HRP	Meerrettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kD	Kilodalton
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung

MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
mGAP	Säugetier GTPase-aktivierendes Protein
mRas	Säugetier Ras-Protein
mRNS	messenger RNS
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
OPR	Oberflächenplasmonresonanz
ORF	offener Leserahmen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P0	Myelin Protein Zero
PNS	Peripheres Nervensystem
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSA	Polysialinsäure
RRS	Ras Recruitment System
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
tPA	gewebeeigener Plasminogen Aktivator
UAS	upstream activation sequence
T _m	Schmelztemperatur
ü.N.	über Nacht
yRas	Hefe-Ras-Protein
ZNS	Zentralnervensystem

I Einleitung

1 Neuronale Zelladhäsionsmoleküle

Neuronale Zelladhäsionsmoleküle werden in vier Gruppen eingeteilt: Integrine (Hynes, 1992; Reichardt and Tomaselli, 1991), kalziumabhängige Cadherine (Kemler and Ozawa, 1989; Takeichi, 1991), Moleküle der extrazellulären Matrix (Reichardt and Tomaselli, 1991; Sanes, 1989) und Zelloberflächen-Glykoproteine der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie (Brummendorf and Rathjen, 1993; Williams and Barclay, 1988).

1.1 Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie umfaßt Proteine unterschiedlicher Struktur, allen gemeinsam sind jedoch Immunglobulindomänen (Abbildung 1). Die ursprünglichen Vertreter dieser Gruppe stellen Antikörper (Edelman et al., 1969) und MHC-Antigene (Orr et al., 1979) dar. Viele Ig-Moleküle des Immunsystems sind an hochspezifischen Zell-Zell-Erkennungsprozessen beteiligt (Springer, 1990). Die Ig-Proteine des Nervensystems enthalten neben den Immunglobulindomänen weitere Strukturmerkmale, die sich innerhalb ihrer Polypeptidketten wiederholen. Eine dieser strukturellen Determinanten sind Fibronektindomänen des Typs-(III). Erstmals beschrieben wurde dieses Motiv als ein aus 90 Aminosäuren bestehendes Modul im extrazellulären Matrixmolekül Fibronektin (Kornblihtt et al., 1985), später wurden Fibronektin Typ-(III)-Domänen auch in anderen ECM-Molekülen entdeckt (Engel, 1991). Funktionelle Analysen zeigten, daß Fibronektindomänen in die Vermittlung von Zell-ECM-Interaktionen involviert sind (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Aufgrund weiteren Studien an Tenascin-C und Tenascin-R konnten FN-Typ-(III)-Domänen darüberhinaus Funktionen, wie z.B. die Förderung des Neuritenwachstums, zugeschrieben werden (Dorries et al., 1996; Xiao et al., 1996).

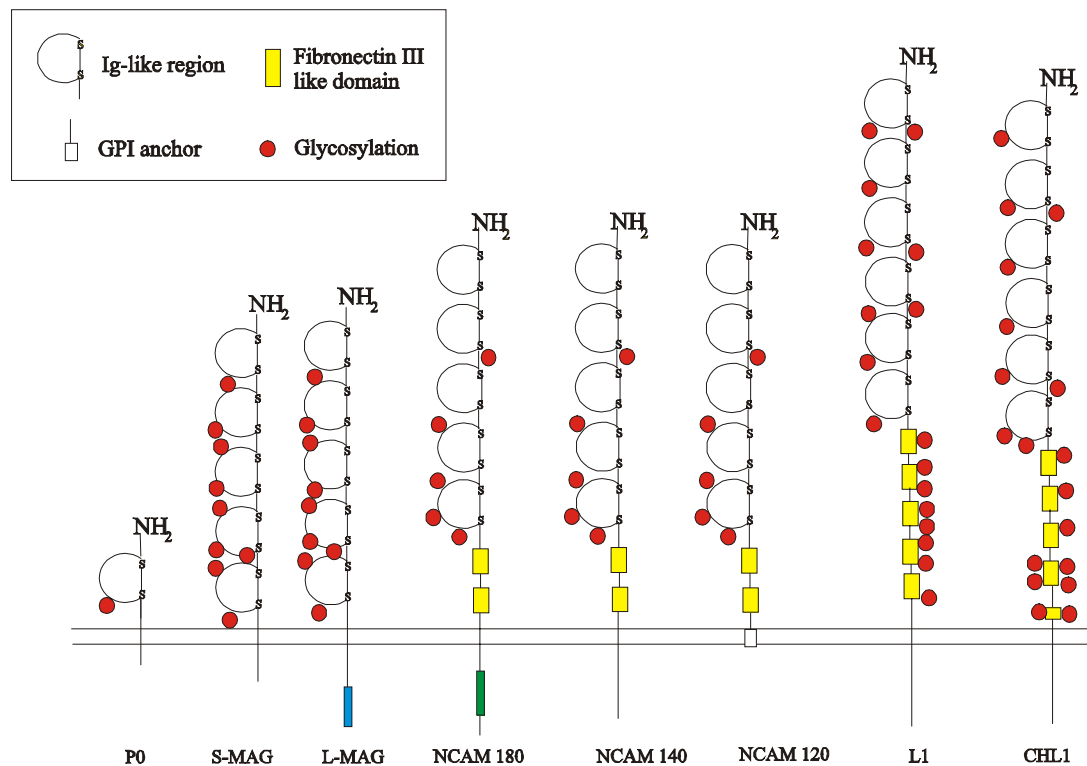


Abbildung 1: Ausgewählte Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Zelladhäsionsmoleküle gehören zur Ig-Superfamilie. Sie besitzen einen extrazellulären Teil, welcher Ig-ähnliche und Fibronectin Typ-(III)-ähnliche Domänen trägt, eine Transmembranregion und einen intrazellulären Teil bzw. einen GPI-Anker.

Im folgenden sollen die Zelladhäsionsmoleküle myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin Protein Zero (P0) und das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) näher beschrieben werden.

1.1.1 Das myelin-assoziierte Glykoprotein - MAG

Die Myelinschicht bildet die elektrische Isolation von Axonen und gewährleistet damit die schnelle Weiterleitung von Nervenimpulsen. Die Bildung des Myelins erfolgt in vielen Schritten und erfordert komplexe Interaktionen zwischen den myelinisierenden Oligodendrozyten bzw. Schwann-Zellen und den zu ummantelnden Axonen. Ein Molekül, von dem gezeigt werden konnte, daß es an der Modulation von

Neuron-Glia-Interaktionen mitwirkt und zur Bildung von morphologisch intaktem Myelin beisteuert, ist das myelin-assoziierte Glykoprotein (Schachner and Bartsch, 2000).

MAG besteht aus fünf extrazellulären Ig-Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Region, die aufgrund von alternativem mRNS-Spleißen in zwei unterschiedlichen Längen auftritt (Arquint et al., 1987; Lai et al., 1987; Salzer et al., 1987). Die kurze (S-MAG, 67 kD) und die lange Isoform (L-MAG, 72 kD) sind stark glykosyliert (ca. 30% des Gesamtgewichts) und wandern daher im SDS-Polyacrylamidgel mit einem apparenten Molekulargewicht von 100 kD.

Der Expressionsverlauf von L-MAG zeigt in Nagetieren im frühen Entwicklungsstadium sowohl im PNS als auch im ZNS ein Maximum, danach vermindert sich seine Menge stetig. Obwohl L-MAG im sich entwickelnden ZNS die häufigere Isoform darstellt, macht es nur einen sehr geringen Teil des gesamten MAGs im sich entwickelnden PNS aus. Im adulten ZNS ist S-MAG die dominierende Isoform, im adulten PNS ist L-MAG nicht mehr nachweisbar (Inuzuka et al., 1991; Pedraza et al., 1991). Das differentielle Expressionsmuster von S- und L-MAG macht es wahrscheinlich, daß die beiden Isoformen unterschiedliche Aufgaben auf dem Wege von der Axonerkennung über die Myelinbildung bis hin zur Aufrechterhaltung intakten Myelins übernehmen.

Die Lokalisation von MAG auf der Oberfläche von Oligodendrozyten und myelinisierenden Schwann-Zellen wurde immunzytochemisch untersucht (siehe z.B. Bartsch et al., 1989; Martini and Schachner, 1986; Trapp et al., 1989). Die Fortsätze von Oligodendrozyten sind bereits zu Beginn der Myelinisierung MAG-immunreaktiv, welches eine Rolle von MAG bei der Initiation der Myelinbildung nahelegt. Auf Schwann-Zellen ist MAG erst detektierbar, nachdem sich die Schwann-Zell-Membran mindestens einmal um ein Axon gelegt hat. Nach Ausbildung der Myelinschicht beschränkt sich die Lokalisation von MAG auf die periaxonale Region der myelinisierten Axone und auf paranodale Regionen der Myelinschichten.

Verschiedene Zellkulturexperimente bestätigen die These, daß MAG die Interaktionen zwischen Nervenzellen und myelinbildenden Gliazellen beeinflusst. Die Applikation von Fab-Fragmenten eines monoklonalen anti-MAG-Antikörpers verhindert die Oligodendrozyten-Oligodendrozyten-, sowie die Oligodendrozyten-Neuron-Adhäsion *in vitro* (Poltorak et al., 1987). Liposomen, in welche aufgereinigtes MAG inkorporiert ist, binden an Nervenzellen, die endogen kein MAG exprimieren (Poltorak et al., 1987). Es ist daher wahrscheinlich, daß MAG die Bindung zwischen Neuronen und Oligodendrozyten über eine heterophile Interaktion mit bisher nicht identifizierten neuronalen Rezeptoren moduliert. Andere Studien belegen die Mitwirkung von MAG an der Initiation der Myelinisierung. So führte z.B. die Reduktion der MAG-Expression in Schwann-Zellen mittels retroviraler MAG-Antisense-mRNS zur Störung der Myelinisierung von Neuriten kokultivierter Neurone (Owens and Bunge, 1991).

Zur weiteren Untersuchung der *in vivo*-Funktionen von MAG wurden MAG-defiziente Mausmutanten (MAG^{-/-}) hergestellt (Li et al., 1994; Montag et al., 1994). Die Initiation der Myelinisierung und die Myelinbildung im peripheren Nervensystem von MAG^{-/-}-Mäusen verläuft überraschenderweise normal. Erst nach dem zweiten postnatalen Monat tritt eine Degeneration der myelinisierten Nervenfasern ein (Fruttiger et al., 1995). Im Gegensatz zum PNS ist die Bildung von kompaktem Myelin im ZNS junger MAG^{-/-}-Mäuse stark verzögert. Weitere Abnormalitäten im ZNS-Myelin adulter Tiere sind das Fehlen periaxonaler zytoplasmatischer Kragen (75%), das Auftreten zwei- bzw. mehrfach ummantelter Axone und eine verstärkte Dystrophie der Oligodendrozytenfortsätze (Bartsch et al., 1995; Li et al., 1994; Montag et al., 1994). Die oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß MAG funktionell an der Initiation der Myelinisierung, an der Bildung, sowie an der Aufrechterhaltung kompakten Myelins beteiligt ist.

Zur Erforschung der unterschiedlichen Aufgaben der beiden MAG-Isoformen bei Myelinisierungsprozessen wurde eine L-MAG-Mausmutante generiert (Fujita et al., 1998). Hierzu wurde im Exon 13 des MAG-Gens ein Stopcodon insertiert, welches zur Expression eines C-terminal verkürzten L-MAGs führt (diese trunkierte Form entspricht S-MAG ohne dessen letzte vier Aminosäuren). Die Expression des

alternativ gespleißten S-MAG wird durch diese Mutation nicht beeinflusst. Die qualitative und quantitative Analyse des Myelins im ZNS der L-MAG-Mutanten zeigt den gleichen Phänotyp wie die MAG-Nullmutante. Das Erscheinungsbild des PNS-Myelins wird bis ins hohe Alter (16 Monate) nicht beeinflusst. Diese Beobachtungen zeigen, daß L-MAG zwar für die Bildung kompakten Myelins im ZNS notwendig ist, im PNS dagegen für die Bildung und Aufrechterhaltung intakten Myelins die S-MAG-Isoform auszureichen scheint.

Mehrere extrazelluläre Bindungspartner von MAG sind bisher entdeckt worden. MAG interagiert mit bestimmten Kollagenen und beeinflusst so die Ausbildung von Kollagenfibrillen (Bachmann et al., 1995; Probstmeier et al., 1992). Tenascin-R, eine weitere Komponente der Extrazellulärmatrix konnte als Interaktionspartner von MAG ausgemacht werden (Yang et al., 1999). Tenascin-R kolokalisiert mit MAG an Ranvier'schen Schnürringen im ZNS, einer für die Ausbreitung von Aktionspotentialen funktionell wichtigen Position. Beide Moleküle regulieren dort auf bisher ungeklärte Weise spannungsabhängige Natriumkanäle (Srinivasan et al., 1998; Xiao et al., 1999). Fibronectin, ein weiteres Molekül der ECM wurde kürzlich als Interaktionspartner von MAG entdeckt. Es konnte mit Hilfe von Affinitätspräzipitationen mit MAG-Fc aus verschiedenen neuronalen Zellen und aus Hirnhomogenat präzipitiert werden (Streng et al., 2001).

Potentielle axonale Rezeptoren oder Liganden von MAG konnten bislang noch nicht exakt identifiziert werden. Aufgrund von Affinitätspräzipitationsexperimenten ist allerdings bekannt, daß es sich bei ihnen um sialinsäure-tragende Glykoproteine und Glykolipide handelt (DeBellard et al., 1996; Schnaar et al., 1998; Streng et al., 1999). Es wurde vorgeschlagen, daß MAG-vermittelte trans-Interaktionen (zwischen zwei gegenüber liegenden Zellplasmamembranen) über sialinsäure-enthaltende Komponenten in cis (innerhalb derselben Zellplasmamembran) reguliert werden können (Tropak and Roder, 1997).

Die Beteiligung an Axonerkennungsprozessen und an der Initiation der Myelinisierung erfordert, daß MAG die extrazellulären Signale in die Gliazelle weiterleiten kann. Dieses ist entweder durch direkte Interaktion mit Molekülen der

Signaltransduktionsmaschinerie oder indirekt über Wechselwirkungen mit dritten Proteinen möglich. Umemori *et al.* konnten eine Interaktion von L- und S-MAG mit der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase *fyn* durch Koimmunpräzipitation der beiden Proteine nachweisen (Umemori *et al.*, 1994). Sie konnten weiterhin an transfizierten COS-Zellen zeigen, daß L-MAG nach Stimulation mit monoklonalen anti-MAG-Antikörpern die *fyn*-Kinase aktivieren kann. *fyn* ist im Myelin von Hirnen junger Mäuse detektierbar, und seine Aktivität ist zu Beginn der Myelinisierung am stärksten. Es erscheint demnach wahrscheinlich, daß die L-MAG-*fyn*-Interaktion auch *in vivo* Relevanz besitzt. Der Stellenwert dieser Interaktion zeigt sich in einer Maus-Doppelmutante, welche sowohl für MAG, als auch für *fyn* defizient ist. Diese Mutante zeigt im Vergleich zu den einfach defizienten Mutanten eine verstärkte Hypomyelinisierung im ZNS. Die Detektion einer L-MAG-abhängigen Kinaseaktivität in der *fyn*-Mutante zeigt jedoch, daß es weitere Interaktionspartner von L-MAG geben muß, die möglicherweise die Funktion der MAG-*fyn*-Interaktion kompensieren können (Umemori *et al.*, 1994).

Serinreste beider MAG-Isoformen können von der Proteinkinase C phosphoryliert werden (Kirchhoff *et al.*, 1993). Die physiologischen Stimuli, die diese Phosphorylierung *in vivo* modulieren sind allerdings unbekannt. Während S-MAG ausschließlich an Serinresten phosphoryliert wird, konnte gezeigt werden, daß im L-MAG auch Tyrosinreste, insbesondere Tyr⁶²⁰, phosphoryliert werden. Tyr⁶²⁰ liegt in einer putativen SH2-Bindungsdomäne, einem Motiv, welches für die Interaktion mit verschiedenen Signaltransduktionsproteinen bekannt ist. Kopräzipitationsversuche haben gezeigt, daß die Phospholipase C γ nur dann mit L-MAG interagiert, wenn Tyr⁶²⁰ phosphoryliert ist (Jaramillo *et al.*, 1994).

Es ist bisher neben der Phospholipase C γ nur ein einziges Protein bekannt, das intrazellulär mit MAG interagiert und keine Kinase darstellt: Das S100 β , welches kalziumabhängig und spezifisch mit der langen L-MAG-Isoform interagiert (Kursula *et al.*, 1999). S100 β gehört zur EF-Hand-Familie kalziumbindender Proteine und ist unter anderem in Signaltransduktionsprozesse involviert.

Die Identifikation weiterer intrazellulärer Bindungspartner von S- und L-MAG könnte zur Aufklärung der unterschiedlichen Aufgaben führen, welche den beiden Isoformen im peripheren und zentralen Nervensystem bei Myelinisierungsprozessen zukommen.

1.1.2 Das Myelin-Protein Zero - P0

Das Myelin-Protein Zero ist das strukturell einfachste Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie (Abbildung 1). Es besteht aus einer einzigen extrazellulären Ig-Domäne, einer Transmembranregion und einem positiv geladenen intrazellulären Teil. P0 ist mit einem Anteil von ca. 50% das weitaus häufigste Protein des Myelins im PNS von Säugetieren, wo es ausschließlich von Schwann-Zellen exprimiert wird. Die Expression von P0 in peripheren Nerven von Nagetieren steigt in den ersten Wochen nach der Geburt an und verläuft parallel zur Myelinisierung (Hahn et al., 1987; Stahl et al., 1990; Wiggins et al., 1975). Obgleich nachgewiesen werden konnte, daß P0 im sich entwickelnden Nerven der Maus erst nach Erreichen eines 1:1 Verhältnisses von Axonen zu Schwann-Zellen detektiert werden kann (Martini et al., 1988; Trapp et al., 1981), zeigen Versuche an Hühnern eine P0-Expression lange vor Beginn der Myelinisierung (Zhang et al., 1995). Auch in der Ratte kann P0 bereits in embryonalen Schwann-Zellen, in Schwannschen Vorläuferzellen und in der Neuralleiste nachgewiesen werden (Lee et al., 1997; Zhang et al., 1995). Die frühe Expression von P0 deutet darauf hin, daß die Axonerkennung durch Schwann-Zellen und der anschließende Beginn der Myelinisierung im PNS über P0 vermittelt werden könnte. Darüber hinaus weist die Lokalisation von P0 in nicht-kompakten Bereichen der sich formenden Myelinscheide auf eine Rolle im Spiralisierungsprozeß hin (Martini et al., 1988). Bestätigung fand letztere Theorie durch Versuche an Schwann-Zellen, in welchen retroviral P0-spezifische Antisense-mRNS eingeschleust wurde. Die dadurch bedingte Reduktion der P0-Expression verhinderte nicht die Ummantelung individueller Axone, wohl aber die anschließende Spiralisierung und die Ausbildung von kompakten Lamellen (Owens and Boyd, 1991).

In voll entwickelten Myelinscheiden beschränkt sich die P0-Lokalisation auf kompakte Regionen. Dort übernimmt das Protein wahrscheinlich eine stabilisierende

Funktion und hält die einzelnen Lamellen zusammen (Martini et al., 1988; Trapp et al., 1981). Diese Hypothese deckt sich mit der Beobachtung, daß P0 die Zell-Zell-Adhäsion *in vitro* fördern kann (D'Urso et al., 1990; Filbin et al., 1990; Schneider-Schaulies et al., 1990). Nach Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der extrazellulären Domäne von P0 wurde vorgeschlagen, daß die Adhäsion über eine *trans*-Bindung von Homotetrameren benachbarter Zellen vermittelt wird (Shapiro et al., 1996). Auf der einen Seite wurde angenommen, daß der exakte Membranabstand im Myelin durch die direkte Interkalation von P0 über eine Tryptophanseitenkette entsteht (Shapiro et al., 1996). Auf der anderen Seite wird vermutet, daß die positiv geladene intrazelluläre Domäne von P0 mit negativ geladenen Phospholipiden der gegenüber liegenden Schwann-Zellmembran interagiert und dadurch die „*major dense line*“ bildet (Ding and Brunden, 1994; Martini et al., 1995a).

Der Stellenwert, den P0 bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Myelin im PNS einnimmt, zeigt sich am Phänotyp eines P0-defizienten Mausmodells (P0^{-/-}). P0^{-/-}-Mäuse zeigen eine eingeschränkte Motorkoordination, sie leiden unter Tremor und zeitweiligen Krämpfen (Giese et al., 1992). Die peripheren Nerven dieser Tiere sind stark hypomyelinisiert. Ultrastrukturell betrachtet erscheinen nahezu alle Nervenfasern morphologisch abnormal. Die meisten Axone sind von einer zu dünnen, nicht kompakten Myelinschicht ummantelt. Bei manchen Fasern fehlt das Myelin vollständig. Auch sind Anzeichen von Axon- und Myelindegeneration erkennbar. Die Reizweiterleitung in den Nerven der P0^{-/-}-Tiere ist typisch für eine schwere dysmyelinisierende Neuropathie. Mit fortschreitendem Alter der Tiere steigt auch die Anzahl der nicht myelinisierten Nervenfasern.

Heterozygote Mäuse, denen nur ein P0-Allel fehlt (P0^{-/+}), unterscheiden sich phänotypisch kaum von Wildtypmäusen. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung erscheinen die peripheren Nerven von P0^{-/+}-Mäusen im Alter von vier Wochen normal (Giese et al., 1992; Martini et al., 1995b). Mit steigendem Alter verringert sich die Dicke der Myelinschichten, sie sind deutlich zu dünn im Verhältnis zum Durchmesser der von ihnen ummantelten Axone. Die Myelinscheiden dieser Nervenfasern werden häufig vom Auftreten sogenannter „*onion bulbs*“ begleitet, bei denen ein Axon von mehreren Schwann-Zellen gleichzeitig myelinisiert wird

(Guenard et al., 1996; Martini et al., 1995b; Shy et al., 1997). Zusammengefasst lassen die obigen Beobachtungen den Schluß zu, daß P0^{-/+}-Mäuse eine progressive Form einer peripheren Neuropathie entwickeln. Es kann daher gefolgert werden, daß das P0-Protein im peripheren Nervensystem eine dosisabhängige Funktion bei der Aufrechterhaltung des Myelins wahrnimmt.

Die intrazelluläre Domäne von P0 enthält mehrere putative Serin-/Threonin-Kinase Erkennungssequenzen. Tatsächlich konnte in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Studien gezeigt werden, daß Serin- und Threoninreste innerhalb der intrazellulären Domäne von P0 phosphoryliert werden (Ekici et al., 1998; Montag-Sallaz et al., 1999; Wolfer et al., 1998). Die Funktionen dieser posttranslationalen Modifikationen sind bisher weitgehend ungeklärt. Adhäsionsstudien an transfizierten CHO-Zellen, welche C-terminal trunkiertes P0 exprimierten, legen nahe, daß die intrazelluläre Domäne für homophile trans-Interaktionen notwendig ist (Wong and Filbin, 1994; Wong and Filbin, 1996). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß auch ein Tyrosinrest (Y¹⁹¹) des P0 phosphoryliert wird (Iyer et al., 2000; Xu et al., 2000). Der Grad der Tyrosinphosphorylierung ist im sich entwickelnden Nerven stärker als im adulten, was impliziert, daß die Phosphorylierung funktionell wirksam sein könnte (Iyer et al., 2000). Mehrere bisher nicht identifizierte, ebenfalls an Tyrosinresten phosphorylierte Proteine konnten mit P0 koimmunpräzipitiert werden. Für eine Kopräzipitation war die Phosphorylierung von P0 an Y¹⁹¹ essentiell (Xu et al., 2000).

Die wichtige Rolle, die P0 bei der Myelinisierung im peripheren Nervensystem zukommt, zeigt sich nicht nur in den P0-defizienten Mäusen, sondern auch bei verschiedenen humanen Erbkrankheiten. Punktmutationen im P0-Gen wurden mit einer Form der Charcot-Marie-Tooth Krankheit (CMT-1B) und dem Déjérine-Sottas Syndrom (DSS) in Verbindung gebracht (Warner et al., 1996). Die genauen Mechanismen, mit denen P0 bei der Bildung von Myelin, der Kompaktierung und dem Erhalt der Myelinschichten mitwirkt, sind bisher nicht vollständig geklärt. Es ist wahrscheinlich, daß P0 nicht allein als Strukturprotein, sondern auch als Signalüberträger fungiert. Die Identifikation intrazellulärer Bindungspartner von P0 könnte daher dazu beitragen, die obigen Prozesse genauer zu verstehen.

1.1.3 Das neuronale Zelladhäsionsmolekül - NCAM

NCAM war das erste Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, welches isoliert und im Detail untersucht wurde (Brackenbury et al., 1977; Cunningham et al., 1987; Hoffman et al., 1982). Es stellt den Prototyp der neuronalen Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie dar. Alle NCAM-Isoformen besitzen extrazellulär fünf Ig-Domänen, gefolgt von zwei Fibronektin Typ-(III)-ähnlichen Regionen. Die Vielfalt der NCAM-Isoformen entsteht sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch durch posttranslationale Modifikationen. Die drei Hauptisoformen von NCAM werden durch alternatives Spleißen eines Primärtranskriptes gebildet, was zu Proteinen mit apparenten Molekulargewichten von 120, 140 und 180 kD führt (Cunningham et al., 1987). NCAM140 und NCAM180 sind Transmembranproteine und besitzen zytoplasmatische Domänen, welche sich lediglich durch eine 261 Aminosäuren lange Insertion im NCAM180 unterscheiden (Abbildung 1). NCAM120 ist mit der Plasmamembran über einen GPI-Anker verbunden. Die Expression der unterschiedlichen Isoformen ist sowohl zeitlich als auch in ihrer Zelltypspezifität differentiell reguliert (Jorgensen, 1995). Während NCAM140 sowohl in prä- als auch in postsynaptischen Membranen detektiert werden kann, akkumuliert NCAM180 in postsynaptischen Dichten von Synapsen reifer Neurone (Persohn et al., 1989; Pollerberg et al., 1985). Die Expression von NCAM140 und -180 nimmt in Hirnen adulter Nagetiere ab.

Die extrazelluläre Domäne von NCAM ist an kalziumunabhängigen Zell-Zell- und Zell-ECM-Interaktionen beteiligt, die bei der Proliferation, der Zellmigration, dem Neuritenwachstum, der Axonbündelung und bei der Ausbildung von synaptischen Kontakten eine Rolle spielen (Cremer et al., 1997a; Doherty et al., 1990; Doherty and Walsh, 1992; Fields and Itoh, 1996; Jorgensen, 1995; Schachner, 1991; Sporns et al., 1995). NCAM kann sowohl homophile als auch heterophile Wechselwirkungen eingehen. Es gibt verschiedene Modelle der homophilen Bindung, die entweder von einer reinen trans-Interaktion ausgehen oder das zusätzliche Auftreten von homophilen cis-Interaktionen postulieren (Ranheim et al., 1996; Rao et al., 1994). NCAM bindet in einer heterophilen cis-Interaktion L1, was zu einer Verstärkung von

L1-L1-Wechselwirkungen benachbarter Zellen führt („*assisted homophilic binding*“) (Kadmon et al., 1990a; Kadmon et al., 1990b). Ein weiterer extrazellulärer Interaktionspartner ist Heparin, eine Hauptkomponente der extrazellulären Matrix (Cole et al., 1986a; Cole et al., 1986b; Cole and Glaser, 1986). Probstmeier *et al.* konnten zeigen, daß die extrazelluläre Domäne von NCAM Kollagen I-IV und IX bindet (Probstmeier et al., 1989). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das unglykosylierte NCAM-Rückgrat und sogar einzelne Domänen von NCAM Funktionen bei der Zellerkennung übernehmen können. So bewirken die IgI- und IgII-Domänen *in vitro* die Zelladhäsion, wenn sie als Substrat angeboten werden. IgI, IgII und IgIV sind in die Migration von Zellen aus Kleinhirnexplantaten involviert. Die Fibronectin Typ-(III)-Domäne II und auch die Ig-Domänen I-V stimulieren das Neuritenwachstum.

NCAM durchläuft typische posttranslationale Modifikationen. So werden Serin- und Threoninreste phosphoryliert, mehrere intrazelluläre Cysteinreste palmitoyliert und extrazellulär treten Glykosylierungen auf. NCAM ist aber das einzige Molekül der Ig-Superfamilie, welches durch eine hochspezifische Veränderung, die Bindung von Polysialinsäure, modifiziert wird. Alle NCAM-Isoformen können diese lineare α -2,8-verknüpfte Polymerkette von bis zu 200 PSA-Resten tragen (Schachner and Martini, 1995), aber im Hippocampus ist dieses Epitop nur in NCAM180 detektierbar (Doyle et al., 1992). Die Menge von NCAM-gebundenem PSA nimmt im Laufe der Entwicklung ab. Während PSA im Embryonalstadium ca. 30% des NCAM-Gewichtes ausmacht, fällt sein Anteil auf ca. 10% in adulten Hirnen ab (Rothbard et al., 1982). Aufgrund der Tatsache, daß PSA-NCAM in Bereichen, welche lebenslanger struktureller Reorganisation unterliegen, erhalten bleibt, wird dem PSA-Epitop eine Funktion bei regenerativen Prozessen und der synaptischen Plastizität zugeschrieben (Becker et al., 1996; Doherty et al., 1995; Eckhardt et al., 2000; Muller et al., 1996; Regan and Fox, 1995). Darüber hinaus vermindert PSA die adhäsiven Eigenschaften von NCAM und verstärkt NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum (Rutishauser, 1990).

NCAM-defiziente Mäuse (NCAM^{-/-}) zeigen einen unerwartet milden Phänotyp (Cremer et al., 1994; Cremer et al., 1997). Den stärksten Defekt findet man im

olfaktorischen System dieser Mäuse, einer Region, in der PSA-NCAM normalerweise lebenslang exprimiert wird. Der olfaktorische Bulbus der NCAM^{-/-}-Mäuse ist im Vergleich zu dem der Wildtyptiere stark verkleinert, wahrscheinlich aufgrund einer verminderten Migration von Zellen in diese Region. Ähnliche Beobachtungen konnten für NCAM180-defiziente Mäuse (Tomasiewicz et al., 1993) und für Wildtypmäuse, in denen durch Behandlung mit Endoneuraminidase N NCAM-assoziiertes PSA entfernt wurde (Ono et al., 1994), gemacht werden. Jüngere Untersuchungen legen eine Beteiligung von NCAM an axonalem Wachstum und axonaler Wegfindung nahe. Detaillierte Studien belegen eine Reduktion der Moosfaserdichte im Hippocampus (Cremer et al., 1997), welche die Defizite der NCAM^{-/-}-Maus im räumlichen Lernen („*Morris water maze*“) erklären könnte (Cremer et al., 1994). Die Beteiligung von NCAM an synaptischer Plastizität wurde anhand von Versuchen an organotypischen Hippocampus-Gewebekulturen der NCAM^{-/-}-Mäuse bestätigt. LTP ist in den NCAM^{-/-}-Hippocampi im Vergleich zu den Wildtyptieren vermindert. Die enzymatische Entfernung von PSA führt in den Gewebekulturen der Wildtypmaus zur vollständigen Inhibition von LTP und LTD (Muller et al., 1996). Zusätzlich zu den Defiziten im räumlichen Lernen zeigen die männlichen NCAM^{-/-}-Tiere eine verstärkte Aggressivität und eine leicht verminderte Explorationsaktivität (Cremer et al., 1994; Stork et al., 1997).

Die Vermittlung komplexer Prozesse wie synaptischer Plastizität und Neuritenwachstum erfordern die Weiterleitung der Signale in die Zelle. NCAM wirkt bei seinen homophilen und heterophilen Interaktionen sowohl als Rezeptor als auch als Ligand. Die Signaltransduktionskaskaden, die bei NCAM-stimuliertem Neuritenwachstum eine Rolle spielen, waren bereits Gegenstand intensiver Untersuchungen (Crossin and Krushel, 2000). Früh wurde entdeckt, daß NCAM-abhängiges Neuritenwachstum die G-Protein-stimulierte Aktivierung von Kalziumkanälen des L- und N-Typs veranlaßt und der darauf folgende Kalziumeinstrom schließlich Neuritenwachstum bewirkt (Doherty et al., 1991). Die Tatsache, daß NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum mit Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen zu unterdrücken ist, veranlaßte Williams *et al.* zu der Hypothese, daß NCAM-bedingtes Neuritenwachstum allein über den FGF-Rezeptor vermittelt wird (Williams et al., 1994a; Williams et al., 1994b; Williams et al., 1995).

NCAM verursacht in dieser Theorie auf bislang ungeklärte Weise die Dimerisierung und durch die darauf folgende Phosphorylierung des Rezeptors die Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade unter Beteiligung der Phospholipase C γ .

Die Annahme, daß der FGF-Rezeptor einziger Mediator NCAM-abhängiger Signaltransduktion ist, wurde durch Versuche an *fyn*-defizienten Neuronen in Frage gestellt, welche zeigten, daß in diesen Zellen das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum inhibiert ist (Beggs et al., 1994). Später konnte eine direkte Interaktion zwischen NCAM140 und *fyn*, nicht aber zwischen NCAM180 und *fyn* durch Koimmunpräzipitation demonstriert werden (Beggs et al., 1997). In derselben Studie konnte gezeigt werden, daß nach Bindung von NCAM und Kreuzvernetzung mit sekundären Antikörpern FAK, eine weitere Kinase, an den NCAM/*fyn*-Komplex bindet und daß beide Kinasen verstärkt phosphoryliert sind. Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges mündet in den MAP-Kinaseweg und führt zur Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 (Schmid et al., 1999). Kolkova *et al.* konnten kürzlich zeigen, daß in PC12-Zellen beide Signaltransduktionswege, der FGF-R- und der *fyn*/FAK-Weg, an NCAM-stimuliertem Neuritenwachstum mitwirken (Kolkova et al., 2000a).

Die Stimulation von NCAM bewirkt in Kulturen von Astrozyten und Kleinhirnneuronen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Krushel et al., 1999). Sowohl NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum als auch die Aktivierung von NF κ B kann zum Teil durch eine Überexpression von Konstrukten der zytoplasmatischen Domäne von NCAM inhibiert werden (Kolkova et al., 2000b; Little et al., 2001). Dieser dominant-negative Effekt legt nahe, daß NCAM für die obigen Prozesse direkte Interaktionen mit intrazellulären Bindungspartnern eingehen muß. Die Identifikation von Proteinen, die an derartigen NCAM-Wechselwirkungen beteiligt sind, stellt daher weiterhin eine wichtige Aufgabe zur Aufklärung der dem Neuritenwachstum und synaptischer Plastizität zugrundeliegenden Mechanismen dar.

Die extrazellulären Domänen verschiedener strukturell und funktionell diverser Proteine können von der Membran proteolytisch abgespalten werden. Dieses

Phänomen wird als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet und hat zumeist physiologische Konsequenzen. Auch NCAM existiert nicht nur als membrangebundenes Protein. Lösliche NCAM-Formen sind schon früh in Zellkulturüberständen und Körperflüssigkeiten beschrieben worden (Ibsen et al., 1983; Rutishauser et al., 1976). Nybroe et al. detektierten insgesamt vier NCAM-Polypeptide unterschiedlicher Größe im Medium von kultivierten neuronalen Zellen. Ein ca. 115 kD großes Fragment ist am stärksten repräsentiert (Nybroe et al., 1989). Die quantitative Verteilung der löslichen NCAM-Formen variiert in der Cerebrospinalflüssigkeit von Ratten mit dem Alter der Tiere. Eine ca. 150-180 kD schwere, PSA-tragende, lösliche Form des NCAMs kann in humanem Serum nachgewiesen werden und wird als spezifischer Marker für bestimmte Lungenkrebserkrankungen diskutiert (Jaques et al., 1993; Takamatsu et al., 1994).

Der Ursprung der löslichen NCAM-Fragmente und die Natur der für ihre Bildung verantwortlichen Proteasen ist bisher nur partiell aufgeklärt worden. Bekannt ist, daß die kalziumabhängige Protease Calpain NCAM schneiden kann. Während eine Gruppe die NCAM180-spezifische Umwandlung zu 120-160 kD großen Fragmenten postuliert (Covault et al., 1991), gehen andere davon aus, daß beide Transmembranisoformen von NCAM intrazellulär von Calpain geschnitten werden können und daß dabei ein 25 kD großes proteolytisches Fragment durch Spaltung in der intrazellulären Region entsteht (Sheppard et al., 1991). Weitere Proteasen, tPA und Plasmin, scheinen in die Proteolyse von NCAM involviert zu sein. tPA wandelt Plasminogen zur aktiven Protease Plasmin um. Plasmin ist wiederum ein Aktivator von Metalloproteasevorläufern. Hoffman *et al.* konnten eine verstärkte Sezernierung von löslichen NCAM-Fragmenten der Größen 65 und 75 kD nach Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und einer Induktion von LTP feststellen (Hoffman et al., 1998a; Hoffman et al., 1998b). In einer späteren Studie konnten sie zeigen, daß eine kurze Inkubation von kultivierten Hippocampuschnitten mit NMDA zu einer spezifischen Erhöhung der NCAM180-Expression führte, eine verlängerte Applikation mit NMDA aber eine 50%ige Reduktion von NCAM180 bewirkte. In beiden Fällen blieben die Mengen der anderen Isoformen quantitativ unverändert (Hoffman et al., 2001). Im Gegensatz zu dieser Isoformspezifität wurde demselben Proteasesystem die Degradation aller NCAM-Isoformen nach LTP-Induktion durch Kainatinjektion in

den Hippocampus von Mäusen zugeschrieben (Endo et al., 1998; Endo et al., 1999). Fazeli *et al.* konnten nach Stimulation von LTP in Maus-Hippocampi nur ein einziges NCAM-immunreaktives Fragment von 115 kD nachweisen, dessen Ursprung ungeklärt blieb (Fazeli et al., 1994).

Inwieweit der Bildung von löslichen NCAM-Formen *in vivo* eine funktionelle Rolle zukommt und über welche Mechanismen die NCAM-Proteolyse gesteuert wird, bleibt bislang weitgehend ungeklärt. In Bindungsstudien konnte allerdings gezeigt werden, daß aus Mäusehirnen isoliertes lösliches, ca. 110 kD schweres NCAM spezifische Interaktionen mit ECM-Molekülen eingehen kann (Probstmeier et al., 1989). Da durch das „*shedding*“ also nicht nur die Menge von NCAM auf der Oberfläche reguliert wird, sondern funktionell wirksame NCAM-Formen entstehen, stellt die Aufklärung der proteolytischen Zusammenhänge eine interessante Herausforderung dar.

2 Detektion von intrazellulären Proteininteraktionen

2.1 Yeast two-hybrid System

Die Entwicklung des Yeast two-hybrid Systems (Fields and Song, 1989) basiert auf der Entdeckung des modulären Aufbaus eukaryontischer Transkriptionsfaktoren (Sadowski et al., 1988). Viele dieser Faktoren (z.B. das Gal4 Protein der Hefe) besitzen zwei räumlich und funktionell voneinander unabhängige Domänen: Eine DNS-Bindungsdomäne (DNS-BD), welche an spezifische DNS-Sequenzen bindet, die in der Hefe „*upstream activation sequences*“ (UAS) genannt werden und eine Aktivierungsdomäne (AD), die den RNS-Polymerase II-Komplex zur Transkription der abwärts der UAS liegenden Gene veranlasst (Abbildung 2A) (Hope and Struhl, 1986; Keegan et al., 1986; Ma and Ptashne, 1987). Beide Domänen sind für die Transkription essentiell, für die Funktionalität des Transkriptionsfaktors müssen die DNS-Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne aber nicht notwendigerweise

Soll die Interaktion eines Proteins X mit einem Protein Y untersucht werden, so konstruiert man zwei Plasmide. Das eine kodiert für ein Fusionsprotein, welches aus der DNS-Bindungsdomäne eines Transkriptionsfaktors und X (Köderkonstrukt), das andere aus der Aktivierungsdomäne und Y besteht (Beutekonstrukt). Transformiert man Hefezellen mit beiden Plasmiden, so erfolgt nur dann die Transkription der vom verwendeten Transkriptionsfaktor kontrollierten Gene, wenn durch eine Interaktion zwischen X und Y dessen Funktionalität wiederhergestellt wird.

Die am häufigsten im Yeast two-hybrid System benutzten DNS-Bindungsdomänen stammen von Gal4 oder LexA, die gängigsten Aktivierungsdomänen von Gal4 oder dem *Herpes virus VP16*. Als Reportergen wird häufig das *E. coli lacZ* Gen eingesetzt, welches auf X-Gal-Substrat durch Blaufärbung die Identifizierung von positiven Kolonien ermöglicht. Desweiteren kommen Hefegene zum Einsatz, die in die Biosynthese von Aminosäuren involviert sind (*His3* oder *Leu2*) und damit eine Selektion auf entsprechenden Mangelmedien erlauben.

Obgleich das Yeast two-hybrid System erfolgreich zur Identifizierung neuer Bindungspartner diverser Proteine eingesetzt wurde, besitzt es dennoch Nachteile und Grenzen. Da der Interaktionsnachweis im Kern der Hefe erfolgt, können die untersuchten Fusionsproteine toxisch für die Zelle sein. Desweiteren können viele in die Transkriptionsmaschinerie eingreifende Proteine im klassischen Yeast two-hybrid System nicht verwendet werden, da sie autoaktivierend wirken und somit das System kurzschließen. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß Interaktionen, die normalerweise im Zytosol oder an der Zellmembran stattfinden, im Kern der Hefe nicht erfolgen (Colas and Brent, 1998). So zeigte sich bei dem Versuch, alle möglichen Protein-Protein-Interaktionen des Hefe-Genoms mit Hilfe des Yeast two-hybrid Systems zu identifizieren, daß Proteine membranständigen Ursprungs mit einem Anteil von nur 8% aller entdeckten Wechselwirkungen deutlich unterrepräsentiert sind (Uetz et al., 2000).

2.2 Ras Recruitment System

Das Ras Recruitment System (Broder et al., 1998) nutzt die Tatsache, daß Ras an der Plasmamembran lokalisiert sein muß, um funktionell wirksam zu sein (Buss et al., 1989). Normalerweise wird diese Lokalisierung über die Anlagerung eines Farnesylrestes an eine Konsensussequenz in der carboxyterminalen Region des Ras-Proteins, die CAAX-Box erreicht (Hancock et al., 1989). Mutiertes Ras, welches durch das Fehlen dieser Sequenz nicht farnesyliert wird, aktiviert den Adenylatcyclaseweg aufgrund der mangelnden Membranlokalisation nicht.

Im RRS wird der Hefestamm *cdc25-2* verwendet. Aufgrund einer temperatursensitiven Mutation im Cdc25-Gen bleibt das Hefe-Ras-Protein (yRas) bei 36°C in diesem Stamm inaktiv, da bei dieser Temperatur der benötigte Guanylnukleotidaustauschfaktor (GEF) Cdc25 nicht funktionell ist (Petitjean et al., 1990). Hefezellen dieses Stammes verhalten sich bei einer permissiven Temperatur von 25°C normal, bei der restriktiven Temperatur von 36°C sind sie nicht lebensfähig (Abbildung 3A). Die Transformation mit einem mutierten Säugetierhomologen Ras-Protein, welchem die CAAX-Box fehlt, kann per se aufgrund der mangelnden Membranverankerung die Funktion des yRas bei 36°C nicht kompensieren. Auf dieser Grundlage wurde das RRS entwickelt (Abbildung 3).

Die für die zu untersuchenden Proteine kodierenden cDNS werden in geeignete Plasmide inseriert und in den *cdc25-2* Hefestamm transformiert. Sollen intrazelluläre Bindungspartner für ein Transmembranprotein gesucht werden, so wird die zytoplasmatische Domäne dieses Proteins als Fusionsprotein mit dem CAAX-deletierten und aufgrund einer weiteren Mutation permanent aktiven (also GEF-unabhängigen) Ras, dem mRas(61) exprimiert. Proteine einer cDNS-Bank werden zusammen mit einem Myristylierungssignal exprimiert, welches dazu führt, daß sie zur Membran transportiert und dort verankert werden. Das mRas(61)-Fusionsprotein kann bei der restriktiven Temperatur nur dann den Adenylatcyclase-Signaltransduktionsweg aktivieren, wenn es durch die Interaktion mit einem

membrangekoppelten Protein der cDNS-Bank in der räumlichen Nähe der Membran positioniert wird (Abbildung 3B).

Das größte Problem bei der Durchmusterung von cDNS-Banken mit dem RRS stellt die große Anzahl an falsch positiven Klonen dar, bei denen das aus der cDNS-Bank stammende, myristylierte Protein allein in der Lage ist, das Wachstum bei 36°C zu ermöglichen. Ein sehr häufig auftretender falsch positiver Klon kodiert für das Säugetier-Ras (mRas). Das mRas wird in der Membran verankert und ist auf diese Weise in der Lage köderunabhängiges Wachstum bei der restriktiven Temperatur zu gewähren (Abbildung 3C). Im verbesserten RRS (Aronheim, 1997) transformiert man daher zusätzlich zu den zwei oben beschriebenen Plasmiden ein drittes, welches für das säugetierspezifische GTPase-aktivierende Protein (mGAP) kodiert. Dieses drängt das mRas in seine GDP-gebundene, inaktive Form und unterdrückt damit das unspezifische Wachstum bei 36°C (Abbildung 3D). Trotz der Verbesserung des RRS stellen falsch positive Klone ein großes Problem dar. Werden z.B. Sos-Homologe aus der cDNS-Bank mit dem Myristylierungssignal in der Hefe exprimiert, so können diese aufgrund ihrer GEF-Aktivität das Hefe-Ras bei 36°C aktivieren und so die Funktion des Cdc25 übernehmen. Sos ist daher der häufigste falsch positive Klon im verbesserten RRS (Abbildung 3E).

Ein weiteres Problem bei der Verwendung des RRS ist, daß die Mutation im Cdc25-Gen rückmutieren kann. Als Konsequenz wird durchgehend ein funktionelles Cdc25 Protein exprimiert und die Hefezellen können *per se* bei der restriktiven Temperatur überleben. Um zwischen diesen Revertanten und Hefezellen, welche aufgrund einer Protein-Protein-Interaktion wachsen, unterscheiden zu können, prüft man die Galaktoseabhängigkeit des Wachstums. Das Fusionsprotein des Beuteplasmids steht unter der Kontrolle des Galaktosepromotors. Kolonien, welche bei 36°C auf Galaktoseplatten, aber nicht auf Glukoseplatten wachsen, repräsentieren positive Klone. Revertanten überleben auf beiden Platten, da ihr Wachstum nicht von der Expression des Beutefusionsproteins abhängt, also nicht galaktoseabhängig ist.

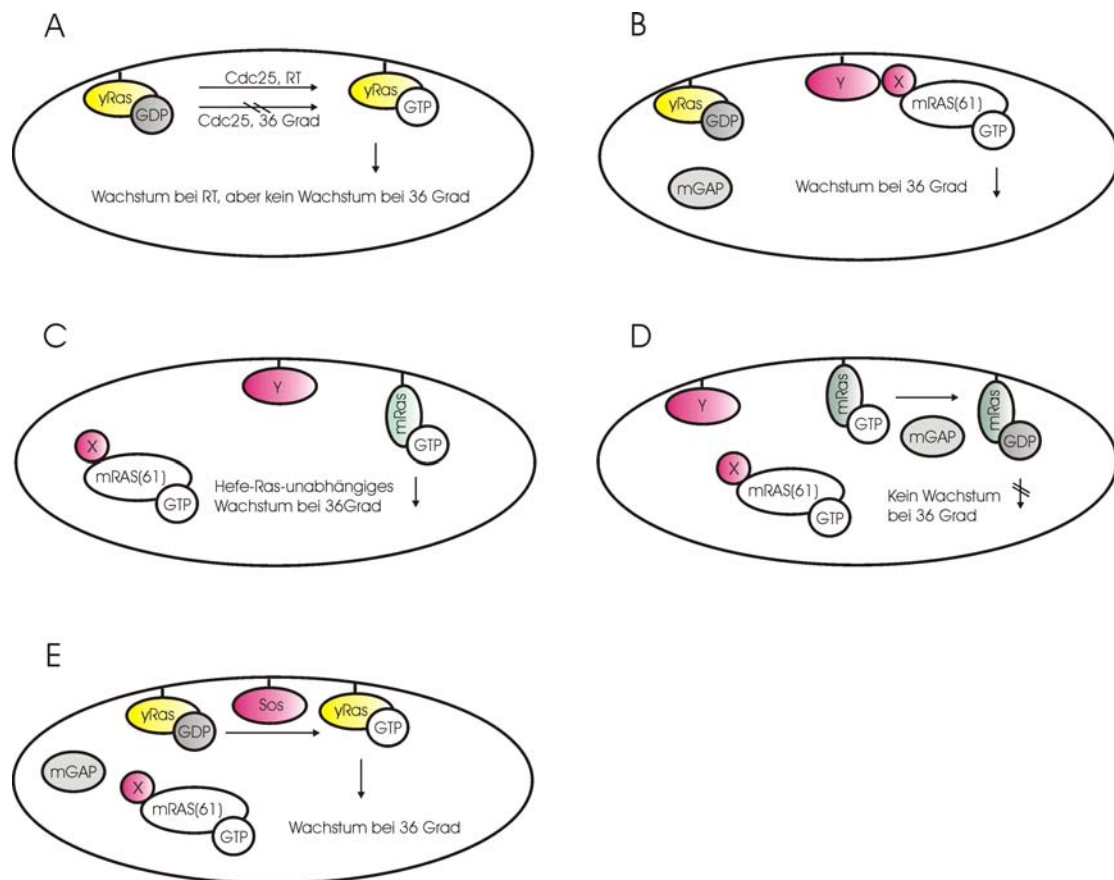


Abbildung 3: Das Ras Recruitment System. **A:** Bei permissiver Temperatur (RT) wächst die Hefezelle aufgrund des funktionellen Cdc25, bei der restriktiven Temperatur (36°C) kann sie nicht überleben. **B:** Bei einer Interaktion des Köder- und Beutefusionsproteins kann die Hefezelle aufgrund der räumlichen Lokalisation des mRas(61) in der Nähe der Membran überleben. **C:** Falsch positive Klone entstehen durch Verankerung von mRas der cDNS-Bank in der Zellmembran. **D:** Die Kotretransformation mit mGAP unterdrückt die mRas-Falsch Positiven. **E:** Häufig auftretende Falsch positive Klone im RRS sind Sos-Homologe, welche die Funktion des Cdc25 übernehmen können.

Trotz der geschilderten Probleme stellt das RRS ein sehr geeignetes System für die Suche nach intrazellulären Bindungspartnern von membranständigen Proteinen dar, da die Detektion der Protein-Protein-Interaktion in räumlicher Nähe der Plasmamembran erfolgt.

II Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten intrazelluläre Bindungspartner neuronaler Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie identifiziert werden. Diese Moleküle nehmen wichtige Aufgaben bei der neuronalen Entwicklung wahr. So sind sie an Prozessen der Zellerkennung, der Neuritogenese, der Förderung des axonalen Wachstums und der axonalen Wegfindung, der Bildung und Erhaltung von Myelinscheiden und vielen anderen Prozessen beteiligt. Derartige Funktionen erfordern die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere und sind daher häufig auf die Existenz zytoplasmatischer Interaktionspartner angewiesen. Dennoch sind bisher nur wenige intrazelluläre Bindungspartner von Zelladhäsionsmolekülen entdeckt worden.

Eine Möglichkeit, nach unbekannten Protein-Protein-Interaktionen zu suchen, besteht in der Durchmusterung von cDNS-Genbanken mit Yeast two-hybrid Systemen. Hierzu sollten in dieser Arbeit die intrazellulären Domänen des myelin-assoziierten Glykoproteins, des Myelin-Protein Zero und des neuralen Zelladhäsionsmoleküls NCAM bei der Suche nach Bindungspartnern eingesetzt werden. Für den Einsatz des P0-Köders mußte zunächst eine geeignete cDNS-Bibliothek aus peripherem Nervengewebe hergestellt werden. Diese sowie kommerziell erhältliche Banken aus Mäuse- bzw. Rattenhirn sollten dann mit P0- und den obigen Ködern durchmustert werden. Neben dem konventionellen Yeast two-hybrid System sollte das Ras Recruitment System etabliert und zur Identifizierung zytoplasmatischer Interaktionspartner eingesetzt werden.

Die erhaltenen Wechselwirkungen sollten anschließend mit Hilfe weiterer Methoden genauer charakterisiert werden. Zum einen sollten die Interaktionen per Koimmunpräzipitation verifiziert und zum anderen durch den Einsatz in Biacore-Experimenten die Bindungskonstanten der Interaktionen bestimmt werden.

III Material

1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den folgenden Firmen bezogen: Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland), Macherey & Nagel (Düren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Molekulargewichtsstandards von Life Technologies bezogen. DNS-Aufreinigungskits wurden von Life Technologies, Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Macherey & Nagel und Qiagen (Hilden, Deutschland) gekauft. Plasmide und molekularbiologische Reagenzien wurden von den Firmen Clontech (Heidelberg, Deutschland), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Pharmacia Biotech, Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen und Stratagene (Amsterdam, Niederlande) erhalten. Oligonukleotide wurden bei metabion (München, Deutschland) bestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Plasmide sind im Anhang aufgeführt. Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Nunc (Roskilde, Dänemark) und Life Technologies bezogen.

2 Lösungen und Puffer

(in alphabetischer Reihenfolge)

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Lösungen und Puffer mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

10 × AP-Puffer	0,5	M	Tris-HCl (pH 8,5)
<i>(Dephosphorylierung)</i>	50	mM	MgCl ₂
3-AT-Lösung	1	M	3-Amino-1,2,4-triazol in ddH ₂ O
<i>(Hefetransformation)</i>			steril filtriert

BCA-Reagenz A (<i>BCA-Test</i>)	1	% (v/v)	Bicinchoninsäure Dinatriumsalz
	1,7	% (w/v)	Na ₂ CO ₃ × H ₂ O
	0,16	% (w/v)	Natriumtartrat
	0,4	% (w/v)	NaOH
	0,95	% (w/v)	NaHCO ₃ , pH 11,25
BCA-Reagenz B (<i>BCA-Test</i>)	4	% (w/v)	CuSO ₄ × 5 H ₂ O
Beladungspuffer (<i>RNS-Gel</i>)	1	mM	EDTA pH 8,0
	0,25	% (w/v)	Orange G
Blockierungslösung (<i>Westernblot</i>)	4	% (w/v)	Milchpulver in TBS
DB-Puffer (<i>Hefepiasmidisolation</i>)	1	mM	EDTA in 1 M Sorbitol
DNS-Probenpuffer (5 ×) (<i>DNS-Gelelektrophorese</i>)	50	% (v/v)	Glycerol in TAE-Puffer
	100	mg	Orange G
Elutionspuffer QF (<i>Qiagen, Plasmid Maxi Kit</i>)	1,25	M	NaCl
	50	mM	Tris-HCl, pH 8,5
	15	%	Isopropanol
Entwicklungslösung (<i>Silberfärbung</i>)	7,5	g	Natriumcarbonat
	30	μl	Formaldehyd (37% w/v) *
	auf 250 ml		H ₂ O
			* frisch vor Gebrauch zugeben

Equilibrierungspuffer QBT (Qiagen, Plasmid Maxi Kit)	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 %	Isopropanol
	0,15 %	Triton® X-100
Färbelösung (X-gal) (β -Galaktosidase-Test)	100 ml	Z-Puffer
	0,27 ml	β -Mercaptoethanol
	1,67 ml	X-gal-Lösung
Fixierlösung (Silberfärbung)	75 %	Ethanol
	25 %	Essigsäure
Gelsolubilisierungspuffer L1 (Concert™ Gel Extraction Kit)	Natriumperchlorat und –acetathaltiger Puffer	
HEPES-Puffer (Biacore)	10 mM	HEPES, pH 7,4
	150 mM	NaCl
Homogenisationspuffer (Membranisolation)	1 mM	NaHCO ₃ , pH 7,9
	0,2 mM	CaCl ₂
	0,2 mM	MgCl ₂
	1,0 mM	Spermidin
Inkubationslösung (Silberfärbung)	75 ml	Ethanol
	17,0 g	Natriumacetat
	1,25 ml	Glutaraldehyd (25% w/v) *
	0,5 g	Na ₂ S ₂ O ₃ × H ₂ O *
	auf 250 ml	H ₂ O
	* frisch vor Gebrauch zugeben	

10 × Ligationspuffer (<i>Ligation</i>)	200 mM	Tris-HCl, pH 7,9
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	DTT
	6 mM	ATP
LiSorb (<i>Hefetransformation</i>)	100 mM	Lithiumacetat, pH 7,5
	1 mM	EDTA
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	0,8 M	Sorbitol
Lösung A (<i>Hefeplasmidisolation</i>)	50 mM	Glukose
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
Lösung B (<i>Hefeplasmidisolation</i>)	0,2 N	NaOH
	1 %	SDS
Lösung C (<i>Hefeplasmidisolation</i>)	4 M	Kaliumacetat
	2 M	Essigsäure
Lösung I (<i>GFX™ Plasmidisolation</i>)	100 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	10 mM	EDTA
	400 µg/ml	Rnase I
Lösung II (<i>GFX™ Plasmidisolation</i>)	190 mM	NaOH
	1 %	SDS
Lösung III (<i>GFX™ Plasmidisolation</i>)	Chaotroper Acetatpuffer	
Lysierpuffer P2 (<i>Qiagen, Plasmid Maxi Kit</i>)	200 mM	NaOH
	1 %	SDS

10 × MOPS-Laufpuffer (<i>RNS-Gel</i>)	200	mM	MOPS, pH 7,0
	50	mM	Natriumacetat, pH 4,8
	10	mM	EDTA, pH 8,0
	auf	1 l	mit DEPC Wasser, pH 7,0
Nativer Lysierpuffer (<i>Bakterienlyse</i>)	50	mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8
	300	mM	NaCl
	10	mM	Imidazol
Neutralisationspuffer P3 (<i>Qiagen, Plasmid Maxi Kit</i>)	3,0	mM	Kaliumacetat, pH 5,5
NTE-Puffer (<i>Hefepiasmidisolation</i>)	0,1	M	NaCl
	10	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA
10 × PCR-Puffer	100	mM	KCl
	100	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	200	mM	Tris-HCl, pH 8,75
	20	mM	MgSO ₄
	1	% (v/v)	Triton [®] X-100
	1	mg/ml	BSA
PEG/LiAc (<i>Hefetransformation</i>)	10	mM	Tris-HCl, pH 7,5
	1	mM	EDTA
	100	mM	Lithiumacetat
	40	% (w/v)	PEG4000
Puffer A1 (<i>Macherey und Nagel,</i> <i>NucleoSpin[®] Plasmid Kit</i>)	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	Rnase A

Puffer A2	200	mM	NaOH
<i>(NucleoSpin® Plasmid Kit)</i>	1	%	SDS
Puffer A3	3,0	mM	Kaliumacetat, pH 5,5
<i>(NucleoSpin® Plasmid Kit)</i>			
Puffer A4	Tris-EDTA Puffer mit 80% (v/v) Ethanol		
<i>(NucleoSpin® Plasmid Kit)</i>			
Puffer H1	Enthält Guanidin Hydrochlorid, EDTA, Tris-HCl		
<i>(Concert™ PCR Purification)</i>	und Isopropanol		
Puffer H2	Enthält NaCl, EDTA und Tris-HCl		
<i>(Concert™ PCR Purification)</i>			
Resuspensionspuffer P1	50	mM	Tris-HCl, pH 8,0
<i>(Qiagen, Plasmid Maxi Kit)</i>	10	mM	EDTA
	100	µg/ml	Rnase A
RIPA-Puffer	50	mM	Tris-HCl, pH 7.4
<i>(Lyse von Zellen)</i>	1	% (w/v)	Triton X-100
	150	mM	NaCl
RNS-Probenpuffer (für 30 µl Gesamtprobenvolumen)			
	2,5	µl	10 × MOPS-Laufpuffer
	4,4	µl	37% Formaldehyd
	12,5	µl	Formamid
SDS-Laufpuffer (10 ×)	0,25	M	Tris-HCl, pH 8,3
<i>(Proteingel)</i>	1,92	M	Glycin
	1,0	M	SDS

SDS-Polyacrylamidsammelgel (5%ig)	3,77 ml	deionisiertes Wasser
	0,32 ml	1 M Tris pH 6,8
	0,05 ml	10% SDS
	0,83 ml	30% Acrylamid – Bis 29:1
	25,0 µl	10% APS
	5,0 µl	TEMED
SDS-Polyacrylamidtrenngel (10%ig)	3,92 ml	deionisiertes Wasser
	5,26 ml	1 M Tris pH 8,8
	0,14 ml	10% SDS
	4,70 ml	30% Acrylamid – Bis 29:1
	70,0 µl	10% APS
	7,0 µl	TEMED
5 × SDS-Probenpuffer (SDS-PAGE)	62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	50 % (v/v)	Glycerol
	12,5 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	1 %	Bromphenolblau
Silberlösung (Silberfärbung)	0,5 g	Silbernitrat
	50 µl	Formaldehyd (37% w/v) *
	auf 250 ml	H ₂ O
		* frisch vor Gebrauch zugeben
Stoplösung (Silberfärbung)	1 % (w/v)	Glycin in Wasser
50 × TAE (DNS-Gele)	2 M	Tris-Actetat, pH 8,0
	100 mM	EDTA

10 × TE	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,5
	10 mM	EDTA
Träger-DNS (<i>Hefetransformation</i>)	10 mg/ml	Heringssperma-DNS in Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 vor Gebrauch 20 min kochen, dann auf Eis lagern
Transferpuffer (<i>Western-Blot</i>)	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycin
Waschpuffer (<i>GFX™ Plasmid isolation</i>)	Tris-EDTA Puffer mit 80% (v/v) Ethanol	
Waschpuffer L2 (<i>Concert™ Gel Extraction Kit</i>)	Tris-EDTA Puffer mit NaCl und 80% (v/v) Ethanol	
Waschpuffer QC (<i>Qiagen, Plasmid Maxi Kit</i>)	1,0 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 %	Isopropanol
X-gal-Lösung (<i>β-Galaktosidase-Test</i>)	20 mg/ml	X-gal in DMF, dunkel lagern, -20°C
Z-Puffer (<i>β-Galaktosidase-Test</i>)	16 g/l	Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O
	5,5 g/l	NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O
	0,75 g/l	KCl
	0,246 g/l	MgSO ₄ × 7 H ₂ O
Zymolyase-Lösung (<i>Hefepiasmid isolation</i>)	30 mg/ml	in ddH ₂ O

3 Nährmedien

Die Nährmedien wurden autoklaviert, Antibiotika und andere hitzelabile Zusätze wurden nach Abkühlung auf weniger als 50°C zugesetzt.

Gal-Medium	20	g	D-Galaktose
	10	g	D-Raffinose
	1,7	g	Hefestickstoffbasis
	5	g	Ammoniumsulfat
	*	mg	Aminosäuremix
auf 1 l mit ddH ₂ O, pH 6,2, autoklavieren			
* laut Hersteller			

Gal-Platten	20	g	D-Galaktose
	10	g	D-Raffinose
	1,7	g	Hefestickstoffbasis
	5	g	Ammoniumsulfat
	10	g	Glycerol
	*	mg	Aminosäuremix
	40	g	Agar
auf 1 l mit ddH ₂ O, pH 6,2, autoklavieren			
* laut Hersteller			

Glu-Medium	20	g	D-Glukose
	1,7	g	Hefestickstoffbasis
	5	g	Ammoniumsulfat
	*	mg	Aminosäuremix
auf 1 l mit ddH ₂ O, pH 6,2, autoklavieren			
* laut Hersteller			

Glu-Platten	20	g	D-Glukose
	1,7	g	Hefestickstoffbasis
	5	g	Ammoniumsulfat
	*	mg	Aminosäuremix
	40	g	Agar
	auf 1 l mit ddH ₂ O, pH 6,2, autoklavieren		
			* laut Hersteller
LB-Medium	10	g/l	Bacto-Trypton, pH 7,4
	10	g/l	NaCl
	5	g/l	Hefeextrakt
LB-Amp-Medium	100	mg/l	Ampicillin in LB-Medium
LB-Amp-Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
	100	mg/l	Ampicillin
LB-CAM-Platten	20	g/l	Agar in LB-Medium
	30	µg/ml	Chloramphenicol
SD-Medium	6,7	g	Hefestickstoffbasis
	182,2	g	D-Sorbitol
	20	g	Dextrose
	*	mg	Aminosäuremix
	auf 1 l mit ddH ₂ O, pH 5,8, autoklavieren		
			* laut Hersteller
SD-Platten	20	g/l	Agar in SD-Medium
SD-CHX-Platten	1	µg/ml	Cycloheximid in SD-Platten
YPAD-Medium	0,003	%	Adeninhemisulfat in YPD-Medium

YPD-Medium	20	g	Pepton
	10	g	Hefeextrakt
	20	g	Dextrose
	auf 1 l mit ddH ₂ O, pH 6,0, autoklavieren		
YPD-Platten	20	g/l	Agar in YPD-Medium

4 Bakterien- und Hefestämme, Zelllinien

CHO	“Chinese hamster ovary” Dehydrofolatreduktase defiziente Hamsterzelllinie, ATCC CRL-9096 (Stanley and Siminovitch, 1977)
N2A	Maus Neuroblastoma Zelllinie, etabliert von einem spontanen Tumor eines Albino A Mäusestammes
<i>E. coli</i> DH5α	<i>deoR</i>, <i>endA1</i>, <i>gyrA96</i>, <i>hsdR17</i>(r_k⁻m_k⁺), <i>recA1</i>, <i>relA1</i>, <i>supE44</i>, <i>thi-1</i>, Δ(<i>lacZYA-argFV169</i>), Φ80<i>lacZ</i>ΔM15, F⁻ (Clontech)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F⁻, <i>ompT</i>, <i>hsdS_B</i> (r_B⁻m_B⁻), <i>gal</i>, <i>dcm</i> (DE3) (Novagen)
<i>E. coli</i> M15 (pREP4)	NaI^S, Str^S, Rif^S, Lac⁻, Ara⁻, Gal⁻, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺ (Qiagen)
<i>S. cerevisiae</i> cdc25-2	MATα, <i>ura3-52</i>, <i>his3-200</i>, <i>ade2-101</i>, <i>lys2-801</i>, <i>trp1-901</i>, <i>leu2-3, 112</i>, <i>cdc25-2</i> Gal⁺ (Broder et al., 1998)

***S. cerevisiae* CG1945** MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*,
trp1-901, *leu2-3*, 112, *gal4-542*, *gal80-538*, *cyh^r2*,
 LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,
 URA3::GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-*lacZ*
 (Clontech)

***S. cerevisiae* Y187** MATα, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*,
leu2-3, 112, *gal4Δ*, *met⁻* *gal80Δ*, *omi2-12*
 URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-*lacZ*
 (Clontech)

5 Zellkulturlösungen und -medien

Zellkulturmedien wurden als 10 × Konzentrat von Life Technologies bezogen und mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt.

Dulbecco MEM (DMEM)

supplementiert mit	10 % (v/v)	fötalem Kälberserum
	50 U/ml	Penicillin/Streptomycin
	1 mM	Natrium Pyruvat

Glasgow MEM (GMEM) (mit Nukleotiden)

supplementiert mit	10 % (v/v)	fötalem Kälberserum
	50 U/ml	Penicillin/Streptomycin
	4 mM	L-Glutamin

RPMI Medium

Firma Biochrom

Versene

Life Technologies

6 Molekulargewichtsstandards

1 kb DNS Leiter insgesamt 14 Banden zwischen 200-10.000 bp
(*Life Technologies*)

BenchMark™ Proteinleiter 6 µl des Molekulargewichtsstandards wurden pro
(*Life Technologies*) Tasche im SDS-Gel aufgetragen.

7 Vektoren

pACT2 Klonierungsvektor für das Yeast two-hybrid
(*Clontech*) System, enthält die GAL4-Aktivierungsdomäne.

pADH-Ras(61) RRS-Ködevektor zur Herstellung von Köder-
(*A. Aronheim*) fusionskonstrukten mit dem mutierten Säugetier-
Ras-Protein.

pAS2-1 Klonierungsvektor für das Yeast two-hybrid
(*Clontech*) System, enthält die GAL4-Bindungsdomäne.

pcDNA3 Expressionsvektor zur Transfektion von
(*Invitrogen*) Säugerzellen.

pET28a Prokaryontischer Expressionsvektor zur
(*Novagen*) Expression von Proteinen mit Polyhistidin-
Domäne (5xHis) und RGS-Motiv am 5'-Ende der
multiplen Klonierungssequenz zur Aufreinigung
über Nickel und zur leichten Detektion mit
Antikörpern.

pGAD10 Klonierungsvektor für das Yeast two-hybrid
(*Clontech*) System, enthält die GAL4-Aktivierungsdomäne.

pMyr (Stratagene)	RRS-Beutevektor.
pQE30 (QIAGEN)	Prokaryontischer Expressionsvektor zur rekombinanten Expression von Proteinen mit Polyhistidin-Domäne (6xHis) am 5'-Ende der multiplen Klonierungssequenz zur Aufreinigung über Nickel.
pYesΔPolyA (A. Aronheim)	RRS-Beutevektor zur Herstellung von Beute-fusionskonstrukten mit Myristylierungssequenz.
8 Antikörper	
8.1 Primäre Antikörper	
anti-NCAM (2B2)	Aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen die extrazelluläre Domäne von Maus-NCAM (produziert im Labor von M. Schachner) Verdünnung im Westernblot: 1:7.000 in 2% Milch/TBS
anti-NCAM (H28)	Aus Ratte. Monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen Maus-NCAM. Verdünnung in Immunfluoreszenz: 1:200 in 3% BSA/PBS
anti-Calmodulin (Santa Cruz)	Aus Kaninchen. Polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen Maus-Calmodulin. Verdünnung in der Immunfärbung: 1:10 in 3% BSA/PBS

anti-pentaHis (Qiagen)	Aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der das 5×His-Epitop erkennt. Verdünnung im Westernblot: 1:2.000 in 2% Milch/TBS
anti-RGS (Qiagen)	Aus Maus. Monoklonaler Antikörper, der das RGS-Epitop erkennt. Verdünnung im Westernblot: 1:2.000 in 4% Milch/TBS
anti-GAL4-DNA-BD (Santa Cruz)	Aus Maus. Monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen AS 94-147 des humanen GAL4-Proteins Verdünnung im Westernblot: 1:2.000 in 4% Milch/TBS
anti-Ras (Transduction Laboratories)	Aus Maus. Monoklonaler Antikörper. Verdünnung im Westernblot: 1:1.000 in 4% Milch/TBS

8.2 Sekundäre Antikörper

Alle HRP-gekoppelten Sekundärantikörper wurden von Dianova bezogen und in einer Verdünnung von 1:10.000 im Westernblot eingesetzt. Die in der Immunfärbung eingesetzten Cy3- und Cy5-markierten Sekundärantikörper wurden ebenfalls über Dianova bestellt.

IV Methoden

1 DNS-Techniken

1.1 Transformation von Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

Zur Transformation der *E. coli*-Stämme BL21, M15 und DH5 α wurden 100 μ l einer Suspension der chemisch kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNS (10-100 ng) oder einem Ligationsansatz (50 ng DNS) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock (3 min, 42°C) und Abkühlung (3 min, Eisbad) wurden 800 μ l LB-Medium zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert (1 min, 3000 $\times$ g, RT), der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 100 μ l LB-Medium resuspendiert, auf LB-Platten (supplementiert mit Antibiotika der vom Plasmid vermittelten Resistenz) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

1.2 Plasmidisolation aus 1,5 ml *E. coli* Bakterienkulturen

(GFX™ Micro Plasmid Prep Kit, Macherey und Nagel)

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14.000 Upm und Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durchgeführt. Zur Isolation von Plasmid-DNS wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien durch einminütige Zentrifugation sedimentiert. Das Pellet wurde in 150 μ l Lösung I resuspendiert und durch Zugabe von 150 μ l Lösung II und 10-15maliges Invertieren lysiert. Nach 4minütiger Inkubation bei RT wurde durch Zugabe von 300 μ l Lösung III gefällt (10-20maliges Invertieren des Eppendorfgefäßes). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (5 min) abgetrennt und der Überstand auf eine GFX™-Säule pipettiert. Nach einminütiger Inkubation wurde 30 Sekunden lang zentrifugiert und

die auf der Säule gebundene DNS mit 400 µl Waschpuffer gereinigt. Der Puffer wurde durch Zentrifugation (30 sec) entfernt und die Säule zur vollständigen Abtrennung des Waschpuffers erneut zentrifugiert (1 min). Die Säule wurde mit 50 µl heißem Tris-HCl (100 mM, pH 8) inkubiert und die DNS eluiert (1minütige Zentrifugation).

1.3 Plasmidisolation aus 15 ml *E. coli* Bakterienkulturen

(NucleoSpin® Plasmid Isolation Kit, Macherey und Nagel)

Alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 14.000 Upm und Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge durchgeführt. 12 ml einer Übernachtskultur des transformierten Bakterienstammes wurden sedimentiert (5 min, $4.100 \times g$, 4°C) und in 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Durch Zugabe von 500 µl Puffer A2 und vorsichtiges Invertieren wurden die Zellen innerhalb von 5 Minuten bei RT lysiert. Nach Zugabe von 600 µl Puffer A3 und 8maligem Umschwenken wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 Minuten, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin®-Plasmidsäule pipettiert und zentrifugiert (30 sec), die Säule mit 600 µl Puffer A4 gewaschen und zentrifugiert (30 sec). Zur vollständigen Beseitigung von Ethanolrückständen wurde erneut eine Minute zentrifugiert und die DNS zweimal mit je 50 µl heißem Tris (10 mM, pH 8) eluiert (jeweils 1 min Zentrifugation).

1.4 Plasmidisolation aus 400 ml *E. coli* Bakterienkulturen

(Plasmid Maxi Kit, Qiagen)

Zur Isolation großer Mengen DNS wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. 400 ml mit Antibiotika versetztes LB-Medium wurde mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und ü.N. geschüttelt (220 Upm, 37°C). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation sedimentiert ($6.000 \times g$, 15 min, 4°C) und in 10 ml Resuspensionspuffer P1 aufgenommen. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 10 ml

Puffer P2, 6maliges Invertieren und 5minütige Inkubation bei RT. Nach Addition von 10 ml Neutralisationspuffer P3, 6maligem Invertieren und 20minütiger Inkubation auf Eis wurde 30 Minuten zentrifugiert ($20.000 \times g$, 4°C). Der Überstand wurde auf eine equilibrierte Qiagen 500-Säule pipettiert. Nachdem die Lösung durchgelaufen war, wurde zweimal mit jeweils 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNS anschließend mit 15 ml Puffer QF in ein Glasröhrchen eluiert. Die DNS wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 min, $15.000 \times g$, 4°C) pelletiert. Nach einmaligem Waschen mit 70%igem Ethanol und Rezentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das DNS-Pellet getrocknet und mit dreimal 200 μl Tris-HCl (10 mM, pH 8, auf 70°C erhitzt) gelöst.

1.5 Restriktionsverdau von DNS

(Sambrook et al., 1989)

Die zu schneidende DNS wurde mit der zweifachen Menge der berechneten Enzymeinheiten unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen inkubiert. Bei gleichzeitigem Verdau mit mehreren Enzymen wurden die vorgeschlagenen Pufferbedingungen gewählt. Bei Inkompatibilität wurde ein sequentieller Verdau durchgeführt, der Ansatz vor Einsatz des zweiten Enzyms aufgereinigt (Life Technologies, Concert™ PCR Purification System). Das Restriktionsprodukt wurde je nach Verwendungszweck entweder direkt eingesetzt, per PCR Purification System aufgereinigt, oder nach gelelektrophoretischer Separation aus dem Gel eluiert.

1.6 Dephosphorylierung freier DNS-Enden

(Sambrook et al., 1989)

Zum Entfernen freier 5'-Phosphatgruppen von linearisierter Plasmid-DNS wurde alkalische Phosphatase (shrimp alkalische Phosphatase, Boehringer Mannheim) benutzt. Hierzu wurden 50 ng DNS mit AP-Puffer versetzt und nach Zugabe der Phosphatase (1 U) bei 37°C inkubiert (stumpfe DNS-Enden 60 min, klebrige 10 min).

Nach Zerstörung der Phosphatase (15 min, 65°C) wurde die dephosphorylierte DNS in der Ligation eingesetzt.

1.7 Ligation von DNS-Fragmenten

(Sambrook et al., 1989)

Zur Ligation wurden 50 ng dephosphorylierte Plasmid-DNS mit dem 5-10fachen molaren Überschuß an Insert-DNS in 30 µl Ligationspuffer mit T4-DNS-Ligase (1 U) inkubiert (2 h RT oder ü.N. 16°C). Der Ligationsansatz wurde im Anschluß direkt für die bakterielle Transformation eingesetzt.

1.8 Polymerase-Kettenreaktion

(Mullis et al., 1986)

Die Amplifikation von DNS wurde in 50 µl Ansätzen durchgeführt. Dazu wurden die folgenden Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert und die DNS je nach Anwendung entweder mit Hilfe von *Taq*-Polymerase (Life Technologies) oder *Pfu*-Polymerase (Stratagene) vervielfältigt.

DNS	×	ng
Oligonukleotid 1	10	pmol
Oligonukleotid 2	10	pmol
dNTP	10	nmol je Nukleotid
10 × PCR-/Pfu-Puffer	5	µl
Polymerase	2,5	U
ddH ₂ O	auf	50 µl

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte nach reaktionsspezifischen Temperaturprofilen in MJ Research PTC-200 Geräten. Bei Verwendung von Oligonukleotiden mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen wurde die PCR bei der niedrigeren T_m durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch

analysiert und entweder per Gelelektion, oder mit Hilfe eines PCR-Aufreinigungskits isoliert.

1.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

(Concert™ Rapid PCR Purification System, Life Technologies)

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (1 min, 14.000 Upm, RT) durchgeführt. Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde der Reaktionsansatz nach Zugabe von 400 µl Puffer H1 auf eine Mikrosäule pipettiert und zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit Puffer H2 und anschließender Zentrifugation wurden 50 µl Tris-HCl (10 mM, pH 8, 65°C) auf die Säule gegeben, eine Minute inkubiert und die DNS durch Zentrifugation von der Säule eluiert.

1.10 Gelelektrophorese von DNS

(Sambrook et al., 1989)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele in 1 × TAE Puffer gefahren (SubCell® GT Elektrophoresekammern, BIO-RAD). Je nach Fragmentgrößen wurden 0,8-2%ige (w/v) Agarosegel verwendet. Die Elektrophorese wurde je nach Anwendung und Gelgröße bei 90-120 Volt durchgeführt (Laufzeiten je nach Anforderung). Die DNS wurde mit der entsprechenden Menge DNS-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach dem Ende der Elektrophorese wurden die Gele 30 Minuten in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml in 1 × TAE Puffer) gefärbt und mit Hilfe eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB) im UV-Licht analysiert.

1.11 DNS-Isolation aus Agarosegelen

(Concert™ Gel Extraction System, Life Technologies)

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Eppendorf-Tischzentrifuge (1 min, 14.000 Upm, RT) durchgeführt. Zur Extraktion der DNS aus Agarosegelen durch Adsorption an Silicamembranen wurde die Bande unter UV-Licht ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und mit dem dreifachen Volumen Gelsolubilisierungspuffer L1 versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bei 50°C und gelegentlichem Vortexen wurde die Lösung auf eine Concert™-Säule pipettiert, zentrifugiert, einmal mit 700 µl Waschpuffer L2 gewaschen und nach Zentrifugation mit 50 µl heißem Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) eine Minute lang inkubiert und anschließend durch Zentrifugation eluiert.

1.12 DNS-Reinheitsanalyse und Konzentrationsbestimmung

Die Reinheit und Konzentration von DNS wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. DNS-Präparationen mit einer Ratio A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 wurden für ausreichend rein befunden und für weitere Versuche eingesetzt.

1.13 DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNS erfolgte in der Sequenzierabteilung des ZMNH. Hierzu wurde 1 µg DNS in 7 µl ddH₂O gelöst und mit 1 µl des entsprechenden Sequenzierprimers (10 pM) versetzt.

2 RNS-Techniken

Alle Lösungen und Puffer wurden zur Zerstörung von Rnasen vor Gebrauch mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0.1% v/v) versetzt, über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert. Aminhaltige Puffer wurden in ausgebackenen Flaschen mit DEPC-behandelten Lösungen angesetzt. Zur Verhinderung von Aerosol-Kontaminationen wurde ausschließlich mit Filterspitzen pipettiert. Die verwendeten Glasgeräte wurden bei 180°C über Nacht gebacken.

2.1 Isolation von Gesamt-RNS aus bovinem Ischiasnerv

(TRIZOL LS Reagenz, Life Technologies)

1 g tiefgefrorener boviner Ischiasnerv wurde in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff zermahlen bis ein feiner Sand entstanden war. Dieses Gewebepulver wurde in ein Falcontube überführt, mit 15 ml eiskaltem TRIZOL LS Reagenz versetzt und mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators homogenisiert. Alle folgenden Schritte wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Suspension wurde für 5 Minuten inkubiert, nach Zugabe von 4 ml Chloroform (0,2 ml pro 0,75 ml TRIZOL LS Reagenz) 15 Sekunden kräftig geschüttelt und erneut für 10 Minuten inkubiert. Das Gemisch wurde zentrifugiert (4°C, 15 min, 12.000 × g), woraufhin sich die Lösung in drei Phasen trennte. Die obere, klare wässrige Phase, welche die RNS enthielt (ungefähr 70% des eingesetzten TRIZOL LS Volumens) wurde abgenommen.

Zur Fällung der RNS wurden 10 ml Isopropylalkohol (0,5 ml Alkohol pro 0,75 ml TRIZOL LS Reagenz) zugegeben und die RNS nach 10minütiger Inkubation durch Zentrifugation (10 Minuten bei 12.000 × g und 4°C) präzipitiert. Das gelartige Pellet wurde einmal mit 75%igem Ethanol gewaschen (mindestens 1 ml Ethanol auf 0,75 ml TRIZOL LS) und die RNS erneut für 5 Minuten zentrifugiert (7.500 × g bei 4°C). Der Überstand wurde abdekantiert und das verbleibende Pellet luftgetrocknet. Die leicht feuchte RNS wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und durch vorsichtiges Auf- und

Abpipettieren und 10minütige Inkubation bei 55-60°C gelöst. Die RNS wurde mit Hilfe denaturierender Agarosegelelektrophorese analysiert und die Konzentration anschließend spektrophotometrisch festgestellt.

2.2 Isolation von mRNS

(Oligotex™, Qiagen)

Die mRNS wurde mit Hilfe von Oligotexkügelchen isoliert. Die Durchführung erfolgte nach der „*Spin-Column*“ Prozedur des Handbuchs. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge bei RT. Bei Ausgangsmengen von bis zu 1 mg Gesamt-RNS wurde das Volumen mit DEPC-Wasser auf 500 µl gebracht und 500 µl Bindungspuffer, sowie 55 µl Oligotexkügelchen zugegeben. Die Suspension wurde durch vorsichtiges Schnippen des Gefäßes gemischt und anschließend für 3 Minuten bei 70°C inkubiert. Durch langsames Abkühlen in einem Wasserbad auf Raumtemperatur wurde der Poly(A)-Schwanz der mRNS an die Oligo(dT)-Oberfläche der Kügelchen hybridisiert. Der mRNS/Oligotex-Komplex wurde für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Kügelchen wurden in 400 µl Waschpuffer OW2 resuspendiert, auf eine Mikrosäule pipettiert und für 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Gefäß überführt und nach erneuter Zugabe von 400 µl Waschpuffer OW2 eine Minute zentrifugiert. Zur Elution der mRNS wurde die Säule in ein frisches Gefäß überführt und dieses in einen 70°C heißen Heizblock gestellt. Nach einminütiger Inkubation mit 30 µl heißem Elutionspuffer (70°C) wurde zentrifugiert (1 Minute). Der Elutionsschritt wurde wiederholt und die Eluate vereint.

2.3 Gelelektrophorese von RNS

(Sambrook et al., 1989)

Die Integrität der RNS wurde mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese überprüft (für optimale Resultate wurden 300-500 ng RNS aufgetrennt). Dazu wurden 0,7 g Agarose in 50,7 ml DEPC-Wasser aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 60°C

wurden 5,8 ml $10 \times$ MOPS-Laufpuffer und 1,75 ml 37%iges Formaldehyd zugegeben und das Gel gegossen. Zu 5,6 μ l RNS-Lösung wurden 19,4 μ l RNS-Probenpuffer gegeben, 15 Minuten bei 55°C inkubiert und die Proben bis zur Gelbeladung auf Eis gelagert. Die RNS wurde nach Zugabe von 3 μ l Beladungspuffer gelelektrophoretisch aufgetrennt (Gelvorlauf 5 Minuten bei 50 V, Auftrennung 2 Stunden bei 50 V). Das Gel wurde mehrmals mit DEPC-Wasser gewaschen und 35 Minuten gefärbt (0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in 0,1 M Ammoniumacetat). Nach zweistündigem Entfärben in DEPC-Wasser wurden die ribosomalen 28S und 18S RNS-Banden im UV-Licht detektiert.

2.4 Konstruktion einer cDNS-Bank aus bovinem Ischiasnerv

(Matchmaker™ Two-Hybrid cDNS-Library Construction Kit, Clontech)

Zur Synthese einer cDNS-Bank im Hefeexpressionsvektor pGAD10 wurden 10 μ g aus bovinem Ischiasnerv isolierte mRNA eingesetzt. Die Herstellung der Bank erfolgte gemäß dem detaillierten, mitgelieferten Protokoll (PT1113-1, Version PR71194).

Kurz beschrieben erfolgte die DNS-Erststrangsynthese unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern und randomisierten Primern aus jeweils 5 μ g mRNA mit Hilfe von MMLV Reverser Transkriptase. Nach Generation der DNS-Zweitstränge wurden ungepaarte DNS-Überhänge mit T4 DNS Polymerase verdaut, so daß stumpfe Enden entstanden. Nach Vereinigung und Aufreinigung der Ansätze wurden *EcoRI* vorgeschnittene Adapter an die stumpfe DNS ligiert. Die DNS-Doppelstränge wurden anschließend phosphoryliert und nach einer Größenfraktionierung mittels Mikrosäulen in den mit *EcoRI*-vorgeschnittenen pGAD10 Vektor ligiert. Die Plasmidbank wurde in *E. coli* Bakterien amplifiziert und die Anzahl unabhängiger Transformanten bestimmt.

Zur Überprüfung der Integrität der cDNS-Bank wurde die Plasmid-DNS aus 20 einzelnen Bakterienkolonien isoliert, mit *EcoRI* geschnitten und die Größe der

eingebauten cDNS durch Auftrennung im Agarose-Gel analysiert. Weiterhin wurden 10 cDNS-Inserts sequenziert, um die korrekte Ligation der Adaptoren und den offenen Leserahmen zu kontrollieren. Die auf diese Weise erzeugte Primärbank wurde auf einen Titer größer 10^9 cfu/ml eingestellt und als Glycerolstock bei -80°C weggefroren.

2.5 Amplifikation von cDNS-Banken

(Sambrook et al., 1989)

Primäre cDNS-Banken wurden vor dem Einsatz im Yeast two-hybrid System zunächst amplifiziert. Hierzu wurden die Titer der Bakterienglycerolstocks bestimmt, anschließend insgesamt 5×10^6 Transformanten auf 150 LB-Amp-Platten (145 mm Durchmesser) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Kolonien wurden mit LB-Amp-Medium von den Platten geschabt und in insgesamt 5 Liter Medium aufgenommen. Nach einer Erholungsphase von zwei Stunden wurde die Plasmid-DNS isoliert (insgesamt 12 Plasmid Maxi Kit Präparationen, Qiagen). Die erhaltene DNS wurde vereint und in kleinen Aliquots bei -20°C gelagert.

3 Interaktionstests

3.1 Yeast two-hybrid System

3.1.1 *Kultivierung und Transformation von Hefestämmen*

(Guthrie and Fink, 1991)

Hefestämme wurden dauerhaft als Glycerolstock (in YPD-Medium, 25% Glycerin (v/v), -80°C) bzw. für bis zu drei Wochen auf YPD- oder SD-Platten ausgestrichen (bei 4°C) gelagert.

Die Hefestämme CG1945 und Y187 wurden bei 30°C kultiviert. Für Flüssigkulturen wurden 50 ml YPD-Medium mit mehreren (2-3 mm großen) Kolonien inokuliert und die Vorkultur bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt ($OD_{600} > 1,5$; 250 Upm; über Nacht). Für die Hauptkultur wurden 300 ml YPAD durch Zugabe einer entsprechenden Menge Vorkultur auf eine $OD_{600} = 0,2-0,3$ gebracht und 4-5 Stunden geschüttelt (250 Upm, bis zu einer $OD_{600} = 0,5 \pm 0,1$). Die Zellen wurden zentrifugiert ($1000 \times g$, RT, 5 min), das Sediment zweimal mit jeweils 50 ml ddH₂O und einmal mit LiSorb gewaschen (Zentrifugation unter denselben Bedingungen wie zuvor). Das Pellet wurde in 1,5 ml LiSorb aufgenommen und bis zur Transformation bei RT gelagert.

3.1.2 Transformation einzelner Plasmide

(Guthrie and Fink, 1991)

Sollten einzelne Plasmidkombinationen in die Hefezellen transformiert werden, so wurden 100 µl der kompetenten Hefezellen mit 1 µg der jeweiligen Plasmide und 10 µl Träger-DNS gemischt und gevortext. Nach Zugabe von 900 µl PEG/LiAc wurde für 30 min bei 30°C geschüttelt, anschließend 100 µl DMSO zugegeben und vorsichtig gemischt. Die Transformation erfolgte darauf per Hitzeschock bei 42°C für 15 min, wobei alle 5 min durch vorsichtiges Schnippen gemischt wurde. Der Ansatz wurde 3 min auf Eis inkubiert, 1 min zentrifugiert (RT, Eppendorf-Tischzentrifuge, 6.000 Upm) das Zellpellet in 100 µl $1 \times TE$ resuspendiert, auf entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und 4-6 Tage bei 30°C inkubiert.

3.1.3 Durchmusterung von cDNS-Banken

(Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System, Clontech)

Das Köderplasmid wurde in Hefezellen des Stammes CG1945 transformiert und auf Fähigkeit zur Autoaktivierung der Reportergene geprüft. Leichte Autoaktivität wurde im konventionellen Yeast two-hybrid System durch Zusatz von 3-AT (5-10 mM) im Medium unterdrückt.

Zur Durchmusterung von cDNS-Banken wurden Köder- und Genbankplasmid sequentiell transformiert. Zunächst wurde das Köderplasmid transformiert, anschließend die cDNS-Bank. Die Durchführung entsprach im wesentlichen der Transformation einzelner Plasmide (siehe IV 3.1.2), allerdings wurden für die Vorkultur 100 ml SD-Medium (-trp) und für die Hauptkultur 500 ml YPAD-Medium benutzt.

Die kompetenten Hefezellen wurden auf 14 Ansätze à 100 µl verteilt, jeweils mit 100 µl DNS-Mix versetzt (DNS-Mix: 400 µg cDNS-Bank-Plasmid, 1 ml Träger-DNS, 150 µl 10 × TE, 150 µl 10 × LiAc mit ddH₂O auf 1,5 ml) und kurz gevortext. Nach Zugabe von jeweils 900 µl PEG/LiAc wurde für 30 min geschüttelt (30°C, 250 Upm). Es wurden je 100 µl DMSO zugegeben und per Hitzeschock transformiert. Die nach Zentrifugation (RT, 6.000 × g, Eppendorf-Zentrifuge) erhaltenen Zellpellets wurden in je 200 µl 1 × TE aufgenommen und auf insgesamt 14 SD-Platten (-trp, -leu, -his, + 3-AT; 145 mm Durchmesser) ausgestrichen. Positive Kolonien wurden nach 6-10 Tagen isoliert und erneut auf Selektionsplatten vereinzelt. Zum selektiven Verlust des Köderplasmids wurden Einzelkolonien in 100 µl 1 × TE resuspendiert und auf Cycloheximid-supplementierten SD-Platten (-leu, + 1 µg/ml CHX) für 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

Zur Überprüfung der two-hybrid-Interaktion wurden diploide Transformanten durch Kreuzung der Hefestämme CG1945 und Y187 hergestellt. Dazu wurden Hefezellen des Stammes Y187 zunächst mit den Kontrollplasmiden transformiert. Dann wurden einzelne Kolonien dieser Hefen zusammen mit CG1945-Kolonien, die das Bankplasmid trugen, in 3 ml YPD-Medium gemischt und bei 30°C ü.N. geschüttelt. 100 µl der Übernachtskultur wurden auf Selektionsplatten (-trp, -leu, -his, + 3-AT) ausplattiert und das Wachstum der Doppeltransformanten verfolgt.

3.1.4 *β -Galaktosidase-Aktivitätstest*

(Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System, Clontech)

Neben der Aktivierung des *HIS3*-Gens ließ sich die Interaktion zweier Proteine im Yeast two-hybrid System auch anhand der β -Galaktosidase-Aktivität überprüfen. Dazu wurde ein Filterabzug der Hefezellen erstellt. Die am Filter haftenden Zellen wurden durch mehrfaches Eintauchen in flüssigen Stickstoff lysiert. Der Filterabzug wurde in einer vorbereiteten Petrischale auf einem mit frisch hergestellter Färbelösung (X-Gal) befeuchteten Filterpapier positioniert und anschließend in der verschlossenen Petrischale bei 30°C inkubiert. Die tiefblaue Färbung der Positivkontrollen (aufgrund der Expression des Gal4-Transkriptionsfaktors) konnte nach 20-30 Minuten beobachtet werden.

3.1.5 *Plasmidisolation aus Hefekulturen*

(Yeast Protocols Handbook PT3024-1, Clontech)

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten, wenn nicht anders vermerkt, bei maximaler Geschwindigkeit und RT in einer Eppendorf-Zentrifuge.

3 ml einer Übernachtskultur wurden zentrifugiert und das Zellpellet in 400 μ l DB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 40 μ l Zymolyase-Lösung und einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Hefezellen durch Zentrifugation (2 min, 6.000 $\times$ g, RT) sedimentiert. Nach einmaligem Waschen mit NTE-Puffer wurden 100 μ l Lösung A zugegeben, gevortext und zur alkalischen Lyse 200 μ l Lösung B addiert und vorsichtig gemischt. Nach 4minütiger Inkubation bei RT wurden 300 μ l Lösung C zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min) wurden 500 μ l des Überstandes in ein frisches Gefäß überführt und die DNS durch Zugabe von 300 μ l Isopropanol gefällt. Nach 5minütiger Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde das DNS-Pellet getrocknet und in 50 μ l Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) gelöst.

3.1.6 *Elektroporation von Plasmid-DNS in E. coli Bakterien*

Da die aus Hefezellen isolierte Plasmid-DNS für Sequenzierungszwecke nicht rein genug ist, wurde sie zunächst per Elektroporation in *E. coli* Bakterien transformiert. Hierzu wurden 100 µl elektrokompente Zellen mit der DNS gemischt und in 0,1 cm Küvetten elektroporiert (*E. coli* Pulser™, BIORAD, 1,8 kV). Der Elektroporationsansatz wurde mit LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und nach einstündiger Inkubation bei 37°C komplett auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. Von diesen Platten wurden nach 24 Stunden einzelne Kolonien gepickt und damit für die Plasmidisolation Flüssigkulturen angeimpft.

3.2 **Ras Recruitment System (RRS)**

(Aronheim et al., 1997)

Die Kultivierung und Transformation der Hefe erfolgte im wesentlichen wie bereits beschrieben. Der im Ras Recruitment System verwendete Hefestamm *cdc25-2* wurde bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert - unter permissiven Bedingungen bei 22-25°C, unter restriktiven Bedingung bei 36-37°C. Zur Durchmusterung von cDNS-Banken wurden zunächst Köder- und mGAP-Plasmid kotransformiert, anschließend die cDNS-Bank.

Für die Vorkultur wurden 100 ml Glu-Medium (-leu, -trp) mit einigen mGAP- und Köderplasmid-tragenden Kolonien inokuliert, bei 24°C bis zum Erreichen der stationären Phase geschüttelt (250 Upm) und mit dieser Suspension die Hauptkultur (500 ml YPAD-Medium) angeimpft. Das in 1,5 ml LiSorb aufgenommene Zellpellet wurde in 50 µl Aliquots auf 30 Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und mit jeweils 50 µl DNS-Mix (300 µl Träger-DNS und 90 µg cDNS-Bank auf 1,5 ml Volumen mit LiSorb) versetzt, gevortext und 30 min bei 24°C geschüttelt (250 Upm). Es wurden 900 µl PEG/LiAc zugegeben, gemischt und weitere 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl DMSO erfolgte der Hitzeschock wie oben beschrieben. Die nach

Zentrifugation erhaltenen Zellpellets wurden in jeweils 200 µl 1 × TE aufgenommen und auf großen Glu-Platten (-trp, -leu, -ura) für 2-3 Tage bei 24°C inkubiert.

Die unter den permissiven Bedingungen gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe eines Stempels und autoklaviertem Kunstsamt auf Glu- und Gal-Platten (-trp, -leu, -ura) repliziert. Nach 6-10 Tagen Inkubation bei 36°C wurden diejenigen Kolonien isoliert, welche auf den Galaktose-, aber nicht auf den Glukose-Platten gewachsen waren. Diese Kolonien wurden auf zwei mit einem Raster versehenen Glu-Platten ausgestrichen. Eine Platte diente zur Sicherung der positiven Kolonien und wurde bei 4°C verwahrt. Die andere wurde nach viertägiger Inkubation bei 24°C erneut auf Glu- und Gal-Platten replikaplatziert und die Galaktoseabhängigkeit des Wachstums unter den restriktiven Bedingungen verfolgt. Von Hefekolonien, die zweimalig differentielles Wachstum auf Glukose- und Galaktose-Platten zeigten, wurde die Plasmid-DNS isoliert und diese per Elektroporation in *E. coli* Bakterien transformiert. Durch Ausstreichen auf LB-CAM-Platten wurde auf Genbankplasmid-tragende Transformanten selektioniert. Nach Plasmidisolation wurden die DNS-Inserts mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* herausgeschnitten und deren Größe gelelektrophoretisch festgestellt. Zusätzlich konnten durch Verdau der Plasmid-DNS mit *RsaI* mehrfach auftretende Klone identifiziert werden, so daß nur einzelne Vertreter dieser Gruppen weiter charakterisiert werden mußten.

Zur Überprüfung der RRS-Interaktionen wurden die Genbankplasmide in verschiedenen Kombinationen zusammen mit Kontrollplasmiden in die *cdc25-2*-Hefe transformiert und das differentielle Wachstum bei 36°C auf Glukose- und Galaktose-Platten analysiert.

3.3 Oberflächenplasmonresonanz (Biacoresystem)

(Jonsson et al., 1991)

Die Untersuchungen zur „Biomolekularen Interaktionsanalyse“ wurden in der Serviceabteilung des ZMNH von Dr. Christian Schulze an einem Biacore 3000 Gerät durchgeführt. Hintergrund der Technik ist das physikalische Phänomen der

Oberflächenplasmonresonanz: Innerhalb gewisser Grenzen besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge des auf einer Meßoberfläche angesammelten Materials und der indirekt gemessenen Änderung des Brechungsindizes dieser Schicht. Während der eine Bindungspartner auf einer hydrophilen Matrix (CM5-Chip) immobilisiert wird, strömt der andere Partner in einem Pufferstrom über die Schicht. Die resultierende zeitliche Änderung des Meßwertes wird in einem Sensorgramm dargestellt. Aus dem Verlauf der Kurven lassen sich anhand eines vorgegebenen Modells der Wechselwirkung die Dissoziationskonstanten und gegebenenfalls auch die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Interaktion errechnen.

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der rekombinant hergestellten, über Nickel aufgereinigten intrazellulären Domänen von NCAM140, NCAM180, CHL1 und L1 wurden diese in HEPES-Puffer gelöst (1 μ M) und die Proteinlösungen entweder in An- oder in Abwesenheit von Kalzium (1 mM CaCl_2 oder 5 mM EDTA) im Pufferstrom über die Calmodulinoberfläche geleitet.

3.4 Calmodulin-Bindungsassay

Calmodulin-Agarosebeads (Calbiochem) wurden vor ihrem Einsatz zweimal mit Ripapuffer (0,1% NP-40) gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei $200 \times g$ und 4°C . Die Untersuchung der Bindung aufgereinigter, rekombinant exprimierter intrazellulärer Domänen von NCAM erfolgte in An- bzw. Abwesenheit von Kalzium. Hierzu wurden sämtliche Puffer entweder mit 1 mM MgCl_2 und 2 mM CaCl_2 , oder mit 5 mM EDTA versetzt.

30 μ l Beads wurden in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß in 250 μ l Ripapuffer (0,1-0,5% NP-40) mit dem His-markierten Protein (10 μ g) versetzt und 2 Stunden bei 4°C bei geringer Geschwindigkeit rotiert. Die Beads wurden 5×5 Minuten mit Ripapuffer (0,1% NP-40) gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 60 μ l $2 \times$ SDS-Probenpuffer und 15minütiges Aufkochen. Die Beads wurden abzentrifugiert (5 Minuten, 14.000 UpM, RT) und das Eluat gelelektrophoretisch aufgetrennt.

4 Proteinbiochemische Methoden

4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mit dem BCA-Test

(Smith et al., 1985)

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurden Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. Je 10 µl Proteinlösung wurden mit 200 µl dieser BCA-Lösung versetzt, gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Vermessung der Extinktion bei 560 nm und die Ermittlung des Proteingehaltes durch Korrelation mit einer BSA-Eichreihe.

4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Zur Analyse von Proteinen und Proteingemischen wurden SDS-Polyacrylamidgele (Trenngel 8-12%ig, Sammelgel 5%ig, 1 mm Dicke) in Mini-Protean III Elektrophoresekammern (BIO-RAD) verwendet. Die Proben wurden mit der entsprechenden Menge 5 × Probenpuffer versetzt, 20 min aufgekocht und kurz abzentrifugiert. Die Elektrophorese wurde mit 80 V gestartet und nach 10 Minuten auf 140 V hochgestellt. Die Laufzeit richtete sich nach den aufzutrennenden Proteingrößen. Als Molekulargewichtsstandard und zur Überprüfung des Transfers im anschließenden Westernblot wurde die vorgefärbte BenchMark™ Leiter (Life Technologies) benutzt.

4.3 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

(Bruckner et al., 2000)

Zur Überprüfung der Reinheit von Proteinpräparationen und für den Calmodulinbindungsassay wurden SDS-Gele silbergefärbt. Alle Schritte erfolgten bei RT unter leichtem Schütteln bei 100 Upm. Das Gel wurde in 50 ml Fixierlösung 30 min inkubiert und anschließend mit 50 ml Inkubationslösung für mindestens

30 min behandelt. Nach Waschen mit Wasser (3×5 min) wurde die Silberlösung appliziert (40 ml, 20 min). Das Gel wurde kurz gewaschen und mit Entwicklungslösung inkubiert, bis deutliche Banden zu erkennen waren (5-7 min). Die Entwicklung wurde durch 10minütige Behandlung mit Stopplösung beendet. Nach dreimaligem Waschen (s.o.) wurde das Gel in einem Gelrockner (BIO-RAD, GelAir Dryer) zwischen Cellophanfolie getrocknet.

4.4 Western-Blot-Analyse

4.4.1 *Elektrophoretischer Transfer*

(Towbin et al., 1979)

Nach durchgeführter Elektrophorese wurde der Transfersandwich unter Transferpuffer zusammengebaut. Es wurden Nitrocellulosemembranen (Schleicher & Schuell, Protran Nitrocellulose BA 85, $0,45 \mu\text{m}$) verwendet. Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers bei konstanter Spannung wurde eine Mini Trans-Blot Transferzelle von BIO-RAD genutzt (120 min, 65 V, Eiskühlung oder 35 V über Nacht).

4.4.2 *Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen*

(Ausubel, 1996)

Nach Beendigung des elektrophoretischen Transfers wurde die Membran mit der proteingebundenen Seite nach oben in eine Glasküvette gelegt. Nach kurzem Waschen mit TBS wurden 10 ml Blockierungslösung zugegeben und eine Stunde bei RT geschwenkt. Anschließend wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung für 2 h bei RT, oder über Nacht bei 4°C appliziert. Die Membran wurde dann 5×5 Minuten mit TBS gewaschen und für 2 h bei RT mit dem Zweitantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBS (s.o.) wurden die Proteinbanden mit Hilfe verstärkter Chemilumineszenz nachgewiesen.

4.4.3 *Immunologischer Nachweis mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL)*

Die Nitrozellulosemembran wurde für eine Minute mit der ECL-Detektionslösung (Pierce; 1:1-Mischung der Lösungen I und II) inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und der Blot zwischen zwei Cellophanfolien gelegt. Die Auswertung erfolgte durch Belichtung eines Röntgenfilms (Biomax-MR, Kodak) mit Hilfe der Membran über verschiedene Zeiträume.

4.5 **Indirekte Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Fixierung von Hippocampusneuronen wurden diese 15 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,3 bei RT inkubiert. Nach Blockierung mit 3% BSA (in PBS) wurde der monoklonale anti-NCAM-Antikörper (H28, 1:200, 3% BSA in PBS) für 30 Minuten appliziert. Nach viermaligem Waschen mit PBS (5 min) wurde der Fluorochrom-gekoppelte sekundäre Antikörper für 30 Minuten appliziert. Die Zellen wurden erneut viermal 5 Minuten mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit 2% Paraformaldehyd (in PBS) nachfixiert. Die Zellen wurden durch 5minütige Inkubation mit 0,25% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und anschließend mit 3% BSA in PBS blockiert. Nach 60minütiger Inkubation mit dem polyklonalen anti-CaM-Antikörper (1:10, 3% BSA in PBS) wurde viermal 10 Minuten gewaschen. Der Fluorochrom-markierte sekundäre Antikörper wurde anschließend für 30 Minuten appliziert. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurden die Zellen in Aqua Poly/Mount Medium (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) eingebettet.

Zur Untersuchung der Koredistribution von NCAM und Calmodulin wurde der anti-NCAM-Antikörper (1:200) zu den lebenden Kulturen gegeben und diese für 15 Minuten im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend kurz viermal mit vorgewärmtem Medium gewaschen. Der sekundäre Antikörper (1:50) wurde für 5 Minuten appliziert (Bedingungen wie zuvor). Nach erneutem Waschen (s.o.) wurden die Zellen durch 15minütige Behandlung mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei RT fixiert und Calmodulin wie oben beschrieben detektiert.

Die Analyse der immungefärbten Zellen erfolgte an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM510, Zeiss).

4.6 Rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* mit dem pQE-System

(*The QIAexpressionist handbook*, QIAGEN, 1997)

Für die rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli* wurde die korrespondierende cDNS des Proteins in den pQE-Vektor kloniert. Bakterien vom *E. coli*-Stamm M15pREP4 wurden mit dem Expressionskonstrukt transformiert und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. 50 ml LB-Amp-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und bei 37°C ü.N. geschüttelt. 450 ml LB-Amp-Medium wurden mit der Vorkultur inokuliert und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 bei 37°C geschüttelt. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG (0,1-0,5 mM f.c.) induziert und die Kultur weitere 2-6 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation sedimentiert und bis zur Lyse bei -20°C gelagert. Die native Proteinaufreinigung aus den aufgeschlossenen Bakterien (French Press) erfolgte mit Hilfe des N-terminalen *poly His-tag* und Nickelbeads nach den Angaben des Herstellers.

4.7 Bakterienlyse mit der French Press

Die Bakterien wurden sedimentiert (Zentrifugation, $8.000 \times g$, 4°C, 10 min) und in nativem Lysierpuffer resuspendiert (20 ml pro 500 ml Kultur). Die Suspension wurde in eine vorgekühlte French-Pressure-20K-Kammer (Kapazität: 40 ml) überführt. Die Suspension wurde komprimiert (Spectronic Instruments/SLM Amico, 10.000 psi, 5 min) und die Zellen durch vorsichtiges Öffnen des Ventils lysiert. Die Prozedur wurde dreimal wiederholt und die erhaltene Suspension zentrifugiert ($15.000 \times g$, 4°C, 10 min).

4.8 Membranisolation von CHO- und N2A-Zellen

Alle Schritte erfolgten, wenn nicht gesondert erwähnt, bei 4°C bzw. auf Eis. Zellen einer 180 cm² Flasche wurden mit 3 ml Versene abgelöst, kurz zentrifugiert (5 min, 2 × g), einmal mit PBS gewaschen und bei -20°C eingefroren. Die Zellen wurden in 2 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und in einem Potter aufgeschlossen (40 Stöße). Zellkerne wurden durch Sedimentation bei 700 × g abgetrennt und der Überstand ultrazentrifugiert (20.000 × g, 30 min). Das Membranpellet wurde in 8 ml RPMI-Medium aufgenommen und im Potter homogenisiert (10 Stöße).

4.9 Proteaseassay an isolierten Membranen

Jeweils 1 ml Ansätze der resuspendierten Membranen wurden (mit bzw. ohne Zusatz spezifischer Proteaseinhibitoren) für 2 Stunden bei 37°C unter Rotation inkubiert. Die Ansätze wurden ultrazentrifugiert (1 h, 100.000 × g) und der Überstand abgenommen. Die Proteine wurden durch Zugabe von 7 ml eiskaltem Aceton und anschließender Inkubation bei -20°C (>3 Stunden) gefällt. Nach 30minütiger Zentrifugation (41 × g) wurde das Proteinpellet getrocknet (15 min, RT) und mit 200 µl 2×SDS-Probenpuffer resuspendiert, 20 Minuten bei RT inkubiert und anschließend 15 Minuten aufgeköcht. Vor der Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 14.000 UpM).

5 Zellkulturtechniken

5.1 Präparation und Kultivierung von primären Hippocampusneuronen

Kulturen von primären Hippocampusneuronen wurden von einem Tag alten Mäusen durch eine Kombination von enzymatischer und mechanischer Dissoziation erhalten (Dityatev et al., 2000). Die Zellen wurden auf, mit Poly-L-Lysin beschichteten,

Glasplättchen ausgesät. Nach 2-4 Tage langer Inkubation in Hormon-supplementiertem Medium, welches 10% speziell getestetes Pferdeserum enthielt, wurden die Zellen immungefärbt.

5.2 Kultivierung von CHO- und N2A-Zellen

CHO- und N2A-Zellen wurden in 10 ml GMEM bzw. DMEM (10% FCS und 2% Penicillin/Streptomycin) in 75 cm² Flaschen kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen waren: 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchte. Die Zellen wurden bei Erreichen von Konfluenz passagiert (normalerweise nach 2-3 Tagen). Das Medium wurde entfernt und die Zellen durch 5minütige Inkubation mit 3 ml Versene abgelöst. Nach Zentrifugation (5 min, 200 × g, RT) wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:10 passagiert.

5.3 Transfektion von CHO-Zellen

(Lipofectamine Plus manual, Life Technologies)

Für die Transfektion wurden CHO-Zellen in „6well“ Platten (Durchmesser 35 mm, Fläche 9,69 cm²) in 2 ml Medium kultiviert. Einen Tag vor der Transfektion wurden 2×10^5 Zellen pro 35 mm Vertiefung ausgesät. Nach Erreichen einer Zelldichte von 80-90% (nach ca. 18-24 Stunden) wurden die Zellen einmal mit GMEM (ohne FCS und Antibiotika) gewaschen. Pro 35 mm Vertiefung wurden 2 µg DNS transfiziert, bei gleichzeitiger Transfektion mit mehreren Plasmiden wurden jeweils 2 µg verwendet. Es wurden 6 µl Plus Reagent und 4 µl Lipofectamin pro Vertiefung eingesetzt. Nach 3stündiger Inkubation mit dem Transfektionsansatz (1 ml) wurde durch Zugabe von 1 ml GMEM (10% FCS, 2% P/S) gestoppt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 500 µl Versene abgelöst und 1:2 auf neuen Platten kultiviert.

5.4 Lyse von CHO- und N2A-Zellen

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 400 µl Ripa-Puffer (0,5% NP-40) pro 35 mm Schale lysiert (1 h, 4°C, Wippe). Die Zellen wurden von den Platten geschabt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15.000 Upm, 4°C, 10 min) entfernt und der erhaltene Überstand bei -20°C gelagert.

6 Computerunterstützte Sequenzanalyse

Sequenzanalysen und –vergleiche wurden mit Hilfe des Lasergene Programms DNASTAR durchgeführt (www.dnastar.com). Die folgenden Datenbanken wurden für die Untersuchungen genutzt: Medline-, BLASTN- und BLASTP-Server der NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov).

V Ergebnisse

1 Suche nach Bindungspartnern mit dem Yeast two-hybrid System

Zur Identifizierung von zytoplasmatischen Interaktionspartnern der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle MAG und P0 wurde das konventionelle Yeast two-hybrid System eingesetzt. Hierzu mußten die entsprechenden Köderkonstrukte hergestellt und auf ihre Einsetzbarkeit im System überprüft werden.

1.1 Darstellung der S-, L-MAG- und P0-Köder und Test der Konstrukte auf Autoaktivierung im Yeast two-hybrid System

Die pAS2-Köderkonstrukte enthielten die durchlaufenden Leserahmen zur Expression von Fusionsproteinen, welche aus den intrazellulären Domänen von P0, S- bzw. L-MAG und der Bindedomäne des Gal4-Proteins (AS 1-147) bestanden. Die entsprechenden Plasmidkarten und die Karten aller weiteren Konstrukte sind im Anhang dargestellt. Bevor die Ködervektoren zur Durchmusterung einer cDNS-Bank eingesetzt werden konnten, mußten die Fusionsproteine auf Autoaktivierung der Reporterenzyme und auf Toxizität geprüft werden. Dazu wurden die Ködervektoren zusammen mit dem leeren Beutevektor pGAD10 in den Hefestamm CG1945 transformiert und auf die Transformanten selektiert. Die P0- und S-MAG-Transformanten zeigten kein Wachstum auf dem Histidinmangelmedium und keine Aktivierung der β -Galaktosidase. Das pAS2-L-MAG-Konstrukt zeigte starkes Wachstum auf dem Histidinmangelmedium und auch eine Autoaktivierung der β -Galaktosidase. Selbst bei einer Konzentration von 15 mM 3-AT konnte diese Aktivierung nicht unterdrückt und daher der L-MAG-Köder nicht im konventionellen Yeast two-hybrid System eingesetzt werden.

Zur Überprüfung der Expression der Fusionsproteine wurden Lysate der transformierten Hefezellen gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot mit

Hilfe eines anti-Gal4-Antikörpers analysiert. Sowohl das S-MAG- als auch das P0-Fusionsprotein konnten auf Höhe der erwarteten Molekulargewichte detektiert und damit zur Durchmusterung der entsprechenden cDNS-Banken eingesetzt werden (Abbildung 4, Spur 1 bzw. 2).

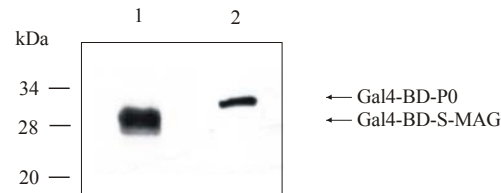


Abbildung 4: Expressionskontrolle der Fusionsproteine im Yeast two-hybrid System. Lysate der mit den Köderplasmiden transformierten Hefezellen wurden per SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot mit anti-Gal4-Antikörpern analysiert. Die Fusionsproteine Gal4-BD-S-MAG (Spur 1) und Gal4-BD-P0 (Spur 2) konnten im erwarteten Molekulargewichtsbereich detektiert werden.

1.2 Herstellung der cDNS-Bank aus bovinem Ischiasnerv

Zur Durchmusterung mit dem P0-Köder mußte eine cDNS-Bank aus geeignetem Gewebe hergestellt werden. Da P0 über 50% der Gesamtproteinmenge des Myelins im peripheren Nervensystem ausmacht, wurde als RNS-Quelle boviner Ischiasnerv genutzt. Die Herstellung der cDNS-Bank erfolgte wie im Abschnitt IV 2.4 beschrieben. Die primäre Genbank hatte eine Komplexität von $3,44 \times 10^5$ unabhängigen Transformanten. Zur Überprüfung der durchschnittlichen Größe der insertierten cDNS wurde die Plasmid-DNS von 20 willkürlich ausgewählten Kolonien isoliert und mit *EcoRI* verdaut. Nur 50% der Plasmide enthielten insertierte cDNS mit Größen von 300-1.000 bp, die übrigen waren leer.

1.3 Durchmusterung der Ischiasnerv cDNS-Bank mit dem P0-Köder

Die Hefetransformation erfolgte nach dem unter Abschnitt IV 3.1.1 beschriebenen Protokoll. Es konnte eine Transformationseffizienz von 8×10^3 cfu/ μ g erreicht werden. Bei eingesetzten 400 μ g Bankplasmid ergaben sich $3,2 \times 10^6$ unabhängig

transformierte Hefekolonien. Nach 9 Tagen Wachstum auf dem Histidinmangelmedium wurden 32 potentiell positive Klone isoliert.

Nach Segregation auf SD-CHX-Platten wurde die Spezifität der Interaktion überprüft. Alle 32 Positiven zeigten auch mit anderen Köderplasmiden Wachstum auf Histidinmangelmedium. Keine der Kolonien reagierte im β -Galaktosidaseassay positiv. Die Sequenzierung von sieben der 32 falsch positiven Klone ergab das folgende Ergebnis: Drei Plasmide kodierten für mitochondriale, drei für ribosomale Proteine und eines für ein Zinkfinger-Protein. Derartige Proteine sind als falsch positive im Yeast two-hybrid System bekannt (siehe Internetadresse: www.fccc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html).

1.4 Durchmusterung der Ratten-Hirn-cDNS-Bank mit dem S-MAG-Köder

Zur Suche nach intrazellulären Bindungspartnern von S-MAG wurde eine Rattenhirn-cDNS-Bank durchmustert (Clontech, RL4000AB). Die als Bakterienglycerolstock bezogene Bank wurde zunächst wie im Abschnitt IV 2.5 beschrieben amplifiziert. Insgesamt 3×10^6 unabhängige Kolonien wurden bei der Hefetransformation erhalten. 28 Histidin-prototrophe Klone konnten nach 9 Tagen Wachstum auf Histidinmangelmedium isoliert werden. Keine der Kolonien zeigte Blaufärbung im β -Galaktosidase-Test. Durch Überprüfung der Spezifität der Interaktion konnten alle 28 isolierten Kolonien als falsch positive Bindungspartner identifiziert werden. Die Sequenzanalyse von fünf Klonen ergab zwei mitochondriale und drei ribosomale Proteine. Beide Proteingruppen sind für falsch positive Interaktionen im Yeast two-hybrid System bekannt.

2 Suche nach Bindungspartnern mit dem Ras Recruitment System

Der Einsatz des konventionellen Yeast two-hybrid Systems zur Detektion intrazellulärer Bindungspartner von Zelladhäsionsmolekülen wie MAG und P0 hatte keinen Erfolg. Während die lange Isoform von MAG aufgrund der Autoaktivierung

des Systems nicht eingesetzt werden konnte, führte die Durchmusterung von cDNS-Banken mit P0 und S-MAG zu keinen positiven Klonen. Möglicherweise benötigen Zelladhäsionsproteine ihre natürliche Umgebung, um mit anderen Proteinen wechselwirken zu können.

Im RRS erfolgt der Nachweis einer Interaktion direkt an der Plasmamembran, also dort, wo zytoplasmatische Domänen von Transmembranmolekülen *in vivo* lokalisiert sind. Daher wurde dieses System zur Suche nach Bindungspartnern von NCAM und L-MAG eingesetzt.

2.1 Darstellung der L-MAG- und NCAM-Konstrukte und Test auf Einsetzbarkeit im RRS

Die Herstellung der Plasmidkonstrukte ist im Anhang detailliert beschrieben. Zur Überprüfung der Nutzbarkeit im RRS wurden die Köderkonstrukte zusammen mit dem mGAP-Konstrukt und dem leeren Beutevektor in den Hefestamm *cdc25-2* kotransformiert und das Hefewachstum bei der restriktiven Temperatur untersucht. Der L-MAG-Köder zeigte keine Autoaktivierung und konnte daher zur Durchmusterung einer cDNS-Bank eingesetzt werden. Die Transformation der *cdc25-2*-Hefezellen mit pADH-NCAM140IC oder pADH-NCAM180IC ermöglichte Wachstum bei 36°C. Verantwortlich für den Kurzschluß des Systems sind vermutlich vier Cysteinreste im intrazellulären Teil von NCAM nahe der Transmembrandomäne. Little *et al.* konnten zeigen, daß diese Reste palmitoyliert werden und daß die Modifikation zur Verankerung in der Plasmamembran führt (Little et al., 2001). Es wurden daher trunkierte NCAM-Köder hergestellt, denen die cysteinreiche Sequenz fehlte. Die verkürzten Konstrukte förderten kein Wachstum bei der restriktiven Temperatur und konnten daher zur Durchmusterung einer cDNS-Bank eingesetzt werden.

Zur Kontrolle der Expression der Konstrukte wurden Lysate der transformierten Hefezellen im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die mRas-Fusionsproteine im Western-Blot mit Hilfe von anti-Ras-Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 5).

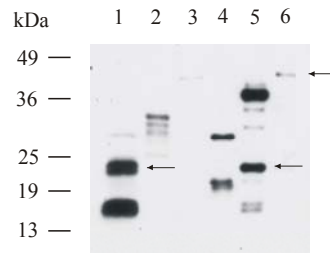


Abbildung 5: Expressionskontrolle der Fusionsproteine im RRS. Lysate der mit den Köderplasmiden transformierten Hefezellen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot mit anti-Ras-Antikörpern detektiert. Die Fusionsproteine mRas(61)-L-MAG (Spur 1), mRas(61)-NCAM140tr. (Spur 5) und mRas(61)-NCAM180tr. (Spur 6) konnten im erwarteten Molekulargewichtsbereich nachgewiesen werden (Pfeile).

2.2 Durchmusterung der RRS-cDNS-Bank mit dem L-MAG-Köder

Die Amplifikation der Mäusehirn-cDNS-Bank (Stratagene Katalognummer 975307) erfolgte wie unter Abschnitt IV 2.5 beschrieben. Zur Durchmusterung wurde der cdc25-2-Hefestamm sequentiell transformiert (IV 3.1.3), zuerst mit dem pADH-L-MAG-Köder und dem mGAP-Konstrukt als Kotransformation und anschließend mit der cDNS-Bank. Bei eingesetzten 90 µg Bankplasmid und einer erreichten Effizienz von $7,3 \times 10^4$ cfu/µg wurden insgesamt $6,6 \times 10^6$ unabhängige Transformanten durchmustert. Bis zum 10. Tag wurden 362 Kolonien isoliert und die Galaktoseabhängigkeit des Wachstums untersucht. In Abbildung 6 ist das Ergebnis eines solchen differentiellen Wachstumstests gezeigt.

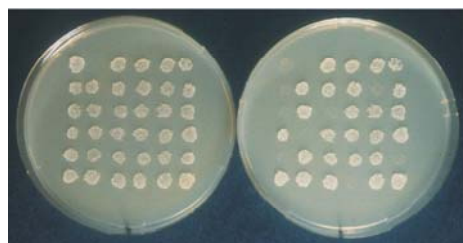


Abbildung 6: Galaktoseabhängigkeitstest. Potentiell positive Klone wurden auf Galaktose- (links) und Glukoseplatten (rechts) replikaplattiert und für vier Tage bei 36°C inkubiert. Kolonien, welche bei dieser restriktiven Temperatur ausschließlich Wachstum auf den Gal-Platten zeigten, wurden weiter untersucht.

Von den 362 Kolonien zeigten 61 galaktoseabhängiges Wachstum. Aus diesen Kolonien wurde die Plasmid-DNS isoliert, in *E.coli* Bakterien transformiert und auf Chloramphenicol-Platten auf die Genbankplasmid-tragenden Bakterien selektioniert. Nach Isolation der Beutevektoren wurden die Insertgrößen durch *EcoRI*-/*XhoI*-Verdau bestimmt. Identische Klone wurden anhand des Fragmentmusters eines *RsaI*-Verdau identifiziert (Abbildung 7). Einzelne Vertreter der so erhaltenen Gruppen wurden sequenziert. Insgesamt 52 Klone kodierten für Cdc25-Homologe, welche mit Abstand die häufigsten falsch positiven Klone im RRS darstellen. 7 Kolonien enthielten die katalytische Untereinheit der PKA und zwei mitochondriale Sequenzen. Keiner der erhaltenen Klone konnte als wahrer Interaktionspartner bestätigt werden.

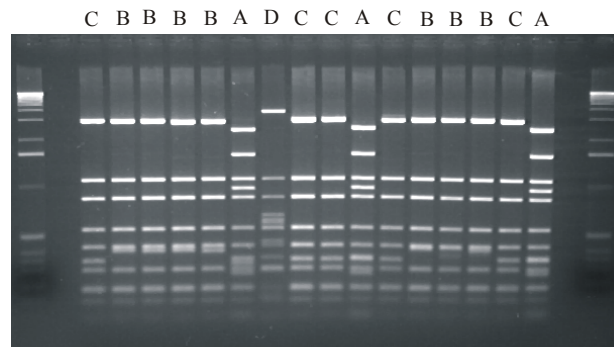


Abbildung 7: Erzeugung von typischen Fragmentmustern durch *RsaI*-Verdau. Die bakteriell amplifizierte Genbankplasmid-DNS wurde mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten und die so erzeugten Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Proben, die das gleiche Muster erzeugten, konnten auf diese Weise in Gruppen (A-D) zusammengefaßt und nur einzelne Vertreter repräsentativ weiter untersucht werden.

2.3 Durchmusterung der RRS-cDNS-Bank mit dem NCAM140tr.-Köder

$4,7 \times 10^6$ unabhängige Transformanten wurden mit dem trunkierten NCAM140-Köder durchmustert. Von den 395 auf Gal-Platten bei 36°C erhaltenen Kolonien zeigten 71 differentielles Wachstum im Galaktoseabhängigkeitstest. Sequenzanalysen identifizierten sämtliche Klone als Cdc25-Homologe oder die katalytische Untereinheit der PKA.

2.4 Durchmusterung der RRS-cDNS-Bank mit dem NCAM180tr.-Köder

578 der insgesamt $3,4 \times 10^6$ durchmusterten Transformanten zeigten Wachstum auf Galaktoseplatten bei 36°C. Bei 97 dieser Klone war das Wachstum Galaktose-abhängig. Nahezu alle putativ positiven Klone enthielten Genbankplasmid-DNS, die für Cdc25-Homologe kodierte. Weiterhin wurden die katalytische Untereinheit von PKA und mitochondriale Sequenzen gefunden.

Auch der Versuch, durch Einsatz der intrazellulären Domänen von L-MAG und NCAM im RRS zytoplasmatische Bindungspartner zu identifizieren, schlug fehl. Die Gründe hierfür sind bisher nicht bekannt. Möglicherweise sind bestimmte posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen für Interaktionen dieser Proteine essentiell. Auch besteht die Möglichkeit, daß sich L-MAG bzw. NCAM in speziellen Mikrodomänen der Plasmamembran aufhalten müssen, um mit anderen Proteinen wechselwirken zu können. Eine detaillierte Diskussion dieser Problematiken ist in Abschnitt VI 1 gegeben.

3 Untersuchung der NCAM-Calmodulin-Interaktion

Bei Untersuchungen einer potentiellen Interaktion von Spectrin mit NCAM wurde Calmodulin als Negativkontrolle im Biacoresystem eingesetzt. Interessanterweise führte die Injektion der intrazellulären Domänen von NCAM über eine Calmodulinoberfläche zu positiven Signalen. Diese neue NCAM-Interaktion sollte genauer analysiert werden. Dazu wurden zunächst größere Mengen der intrazellulären Domänen von NCAM bakteriell exprimiert und aufgereinigt.

3.1 Expression der intrazellulären Domänen von NCAM

Zur Expression der intrazellulären Domänen von NCAM wurden der pQE30- bzw. der pET28a-Vektor benutzt. Die Darstellung der Konstrukte und die entsprechenden Plasmidkarten sind im Anhang aufgelistet. Mit Hilfe der Histidinmarkierung am

N-Terminus wurden die exprimierten Oligopeptide über die Bindung an Nickelbeads aus dem Lysat der Bakterien unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Die Integrität und Reinheit der exprimierten Konstrukte wurde durch Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamidgels überprüft. NCAM180IC konnte als Bande bei ca. 75 kD und die kürzere Domäne NCAM140IC bei ca. 20 kD detektiert werden. Um NCAM140IC im Biacoresystem auf der Affinitätsmatrix über eine S-S-Brücke gerichtet immobilisieren zu können, wurde eine Cysteinmutante hergestellt, in der drei der vier Cysteinreste durch Serinreste ausgetauscht worden waren. Lediglich das membrannahes Cystein wurde nicht mutiert. Das NCAM140IC Δ 3 $\times$ Cys-Oligopeptid wanderte im SDS-Gel ebenfalls bei ca. 20 kD.

3.2 Oberflächenplasmonresonanz-Analysen

„Biomolekulare Interaktionen“ können durch Messung der Änderung des Brechungsindizes einer Proteinoberfläche durch Bindung eines Interaktionspartners, der im Pufferstrom über diese Matrix geleitet wird, untersucht werden. Dieses Biacoresystem wurde zur Charakterisierung der Interaktion von NCAM mit Calmodulin verwendet.

Die Proteinsequenz von Calmodulin ist über alle Spezies hinweg stark konserviert. Aus Spinat isoliertes Calmodulin unterscheidet sich von seinen Orthologen allerdings durch die Existenz eines Cysteinrestes in der Nähe seines N-Terminus, über den es im Biacoresystem durch Ausbildung einer S-S-Brücke auf der CM5-Chipoberfläche gerichtet immobilisiert werden konnte. Abbildung 8 zeigt das daraus resultierende Sensorgramm. NCAM140IC und NCAM180IC zeigen unter nativen Bedingungen eine starke, kalziumabhängige und spezifische Bindung an die Calmodulinoberfläche. Die Berechnung der Dissoziationskonstanten ergibt $7,8 \times 10^{-8}$ M für NCAM140IC und $3,2 \times 10^{-8}$ M für NCAM180IC. Weder die intrazelluläre Domäne von L1, noch die von CHL1 interagierten im Biacoresystem mit dem immobilisierten Calmodulin.

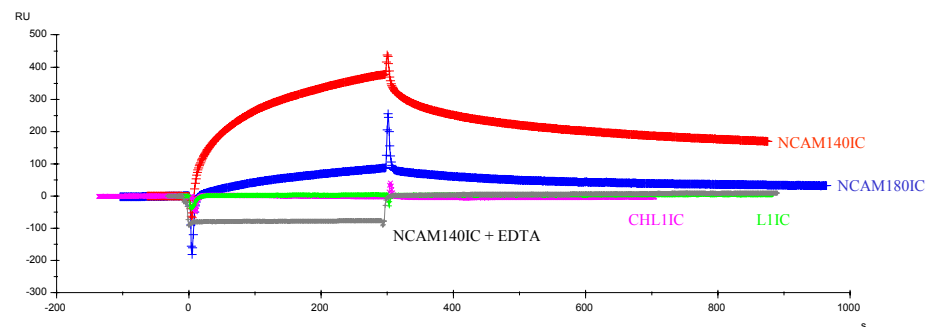


Abbildung 8: Sensorgramm der Interaktion verschiedener intrazellulärer Domänen mit immobilisiertem Calmodulin. Spinat-Calmodulin wurde über den Cysteinrest gerichtet an eine CM5-Oberfläche gekoppelt und die intrazellulären Domänen verschiedener Zelladhäsionsmoleküle unter nativen Bedingungen in An- bzw. Abwesenheit von Kalzium über die Sensoroberfläche geleitet. Das Sensorgramm besteht prinzipiell aus zwei Kurven: Der aufsteigenden Assoziationskurve, welche die Bindung der im Pufferstrom übergeleiteten Proteine an die Oberfläche widerspiegelt und der fallenden Dissoziationskurve, welche die Ablösung der gebundenen Moleküle beschreibt.

Zur Eingrenzung der Calmodulinbindungsstelle im NCAM wurden Peptide synthetisiert (Dr. Heukeshoven, UKE), welche die intrazelluläre Domäne von NCAM140 in drei Teile unterteilten: Ein N-terminales Peptid, welches ein putatives inverses 14-8-5-1-Calmodulinbindungsmotiv enthielt (Rhoads and Friedberg, 1997), ein mittleres und ein C-terminales Peptid (Abbildung 9). Keines der Peptide zeigte eine Interaktion mit der Calmodulinsensoroberfläche. Auch die gleichzeitige Applikation aller drei Peptide im Pufferstrom lieferte keine Signale.

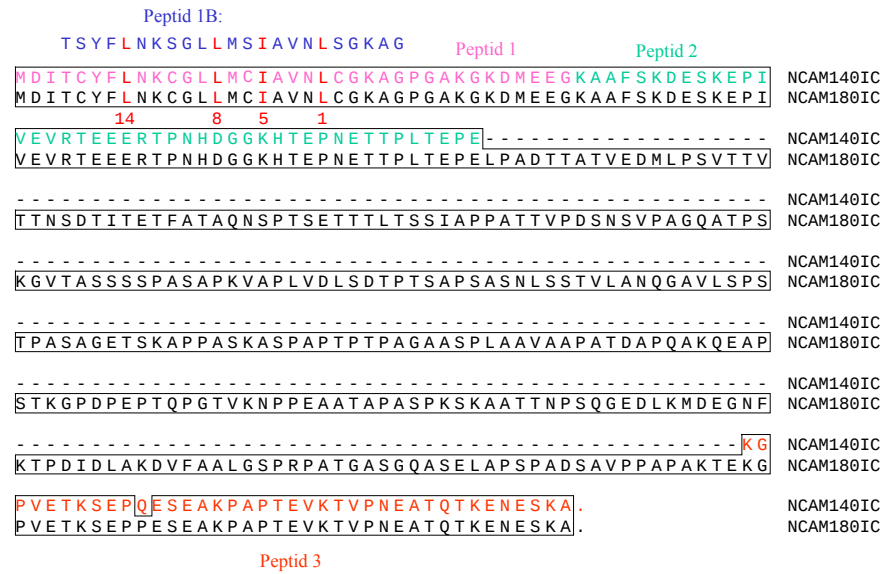


Abbildung 9: Vergleich der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180. Durch alternatives Spleißen enthält NCAM180 ein Exon mehr als NCAM140. Dieses Exon kodiert für 261 Aminosäuren. Die vier synthetisierten Peptide sind eingezeichnet. Im Peptid 1B waren zur Verbesserung der Löslichkeit alle vier Cysteinreste durch Serine ersetzt worden. Die Ziffern 14, 8, 5 und 1 markieren ein potentiell inverses Calmodulinbindungsmotiv.

Eine 15minütige Vorbehandlung der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 durch Inkubation mit 10 mM DTT und anschließende Dialyse resultierte in einer verstärkten Bindung an die Calmodulinmatrix im Biacoresystem (Abbildung 10). Möglicherweise neigen die intrazellulären Domänen von NCAM in Lösung zur Ausbildung von Strukturen, die ihre Zugänglichkeit für Proteininteraktionen einschränken. Das Aufbrechen derartiger Konformationen würde daher zu einer stärkeren Wechselwirkung mit Calmodulin führen.

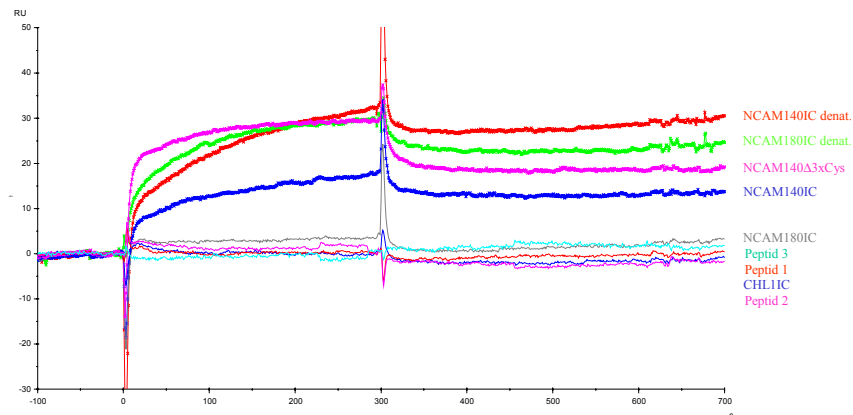


Abbildung 10: Sensorgramm der Interaktion von CaM mit NCAM und NCAM-Peptiden. Die bakteriell exprimierten intrazellulären Domänen von NCAM wurden in Anwesenheit von Kalzium über einen Calmodulin-gekoppelten Chip injiziert. Die mit *denat.* beschrifteten Proben waren vor der Injektion 15 Minuten mit 10 mM DTT inkubiert und dialysiert worden.

Aufgrund der extrem schlechten Löslichkeit von Peptid 1 wurde ein weiteres N-terminales Peptid hergestellt, in welchem die vier Cystein- durch Serinreste ausgetauscht waren. Dieses Peptid 1B war deutlich besser löslich und konnte in höherer Konzentration im Pufferstrom über die Affinitätsmatrix gegeben werden. Auch dieses Peptid zeigte keine Interaktion mit der CaM-Oberfläche.

Der Versuch, durch Kopplung der intrazellulären Domäne von NCAM an die CM5-Matrix die CaM-NCAM-Interaktion vice versa zu untersuchen, brachte keinen Erfolg. Das über eine Aminkopplung immobilisierte NCAM zeigte keine Wechselwirkung mit dem darübergeleiteten Calmodulin. Durch bakterielle Expression und Aufreinigung eines NCAM140-Oligopeptides, in dem bis auf den membrannahen Cysteinrest alle weiteren Cystein- durch Serinreste ausgetauscht worden waren, sollte eine gerichtete, besser zugängliche Kopplung über eine S-S-Brücke erreicht werden. Auch das auf diese Weise immobilisierte NCAM140ICΔ3xCys interagiert nicht mit dem im Pufferstrom applizierten Calmodulin.

3.3 CaM-Bindungsassay

Die positiven Ergebnisse der Biacorexperimente konnten mit Hilfe eines Bindungsassays verifiziert werden. Kovalent an Agarosebeads gekoppeltes Calmodulin wurde zur Präzipitation der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 genutzt. Als Kontrolle diente, wie auch im Biacoresystem, die intrazelluläre Domäne von CHL1.

Abbildung 11 zeigt die kalziumabhängige Präzipitation der intrazellulären Domäne von NCAM180 mit den CaM-Beads bei verschiedenen Detergenzkonzentrationen, während CHL1-IC auch bei der geringsten NP40-Konzentration keine Bindung zeigte.

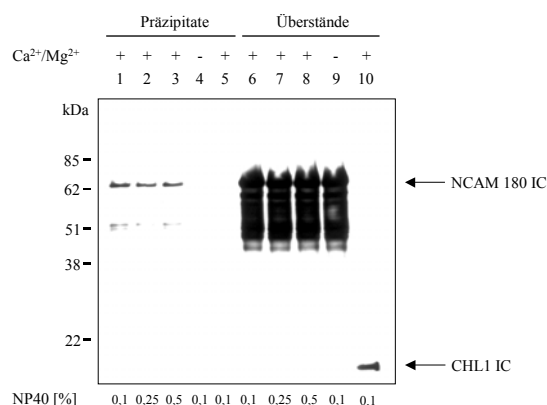


Abbildung 11: CaM-Bindungsassay mit der intrazellulären Domäne von NCAM180. Western-Blot der Präzipitate (Spur 1-5) und Überstände (Spur 6-10) der CaM-Beads nach Inkubation mit den intrazellulären Domänen von NCAM und CHL1 in An- oder Abwesenheit von Kalzium und Magnesium. Die intrazelluläre Domäne von NCAM180 präzipitierte mit den CaM-Beads nur in Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$. CHL1-IC zeigte keine Bindung an CaM (Spur 5).

Spur 1-4: NCAM180IC. Spur 5: CHL1IC. Spur 6-10: Überstände von 1-5. Die Detektion erfolgte mit einem gegen die RGS-Markierung gerichteten Antikörper.

Der Versuch, die intrazelluläre Domäne von NCAM140 mit den CaM-Beads zu präzipitieren, schlug zunächst fehl. Die bakteriell exprimierte intrazelluläre Domäne

von NCAM140 neigt in Lösung zur Multimerisierung. Erst eine 15minütige Präinkubation mit 10 mM DTT ermöglichte im darauffolgenden Bindungsassay eine kalziumabhängige Bindung an Calmodulin (Abbildung 12).

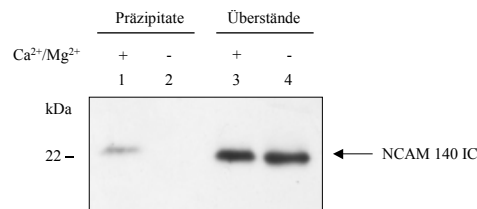


Abbildung 12: CaM-Bindungsassay mit der intrazellulären Domäne von NCAM140. Nach 15minütiger Vorbehandlung mit 10 mM DTT konnte NCAM140IC kalziumabhängig mit CaM-Beads präzipitiert werden. Die Präzipitation erfolgte bei einer Detergenzkonzentration von 0,5%. NCAM140IC wurde mit einem anti-RGS-Antikörper detektiert.

Auch das mutierte NCAM140 Δ 3 $\times$ Cys-Oligopeptid konnte mit den CaM-Beads präzipitiert werden, zumindest die drei in diesem Konstrukt zu Serinresten mutierten Cysteine schienen für die Calmodulinbindung also nicht essentiell zu sein (Daten nicht gezeigt). Der Versuch, die Calmodulinbindungsstelle durch Kompetitionsversuche einzugrenzen schlug fehl: Die Präzipitation der drei bakteriell exprimierten intrazellulären Domänen NCAM140, NCAM140 Δ 3 $\times$ Cys oder NCAM180 konnte durch die Zugabe eines mehrfachen molaren Überschusses der Peptide 1B, 2 und 3 nicht inhibiert werden.

3.4 Überprüfung der NCAM-CaM-Interaktion im Ras Recruitment System

Oberflächenplasmonresonanzversuche hatten gezeigt, daß die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 kalziumabhängig und spezifisch mit Calmodulin interagieren. Diese Ergebnisse konnten in einem Bindungsassay unter Einsatz von Calmodulinbeads bestätigt werden. Um die direkte Bindung von Calmodulin und NCAM im RRS untersuchen zu können, wurden Calmodulin-Beuteplasmide hergestellt (siehe Anhang) und auf eine Interaktion mit den

entsprechenden trunkierten NCAM-Konstrukten geprüft. Mit keinem der verkürzten NCAM-Konstrukte konnte eine Interaktion mit Calmodulin detektiert werden. In diesen NCAM-Ködern fehlte das N-terminale putative 14-8-5-1-Calmodulinbindungsmotiv. Sollte dieses Motiv die Bindungsdomäne darstellen, so könnte mit den trunkierten NCAM-Fusionsproteinen keine CaM-Wechselwirkung nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde ein mutiertes NCAM-Köderplasmid hergestellt, welches für die vollständige intrazelluläre Domäne von NCAM140 kodierte, in der aber die Cystein- zu Serinresten mutiert worden waren. Auch mit diesem pADH-NCAM140 Δ Cys-Köder zeigte das pYes-CaM-Beutekonstrukt keine Interaktion.

3.5 Untersuchung der Verteilung von Calmodulin und NCAM in primären Hippocampusneuronen

Zur Untersuchung der Kodistribution von NCAM und Calmodulin wurden 2-4 Tage in Zellkultur gehaltene primäre Hippocampusneurone verwendet. Die genaue Durchführung der Versuche ist in Abschnitt IV 4.5 bzw. IV 5.1 beschrieben. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis dieser Experimente. NCAM und Calmodulin akkumulieren nach der Antikörperbehandlung in „*clustern*“ entlang der Axone, aber auch an Kontaktstellen und Neuritenverzweigungen. Neurone, die vor der Antikörperapplikation fixiert wurden, in denen also die native Verteilung untersucht wurde, zeigten ebenfalls Bereiche, in denen die Verteilung von NCAM mit der von Calmodulin überlappte. Diese Bereiche beschränkten sich allerdings auf Kontakt- und Verzweigungsstellen. In keinem Fall wurden „*cluster*“ entlang von Axonen detektiert (Daten nicht gezeigt).

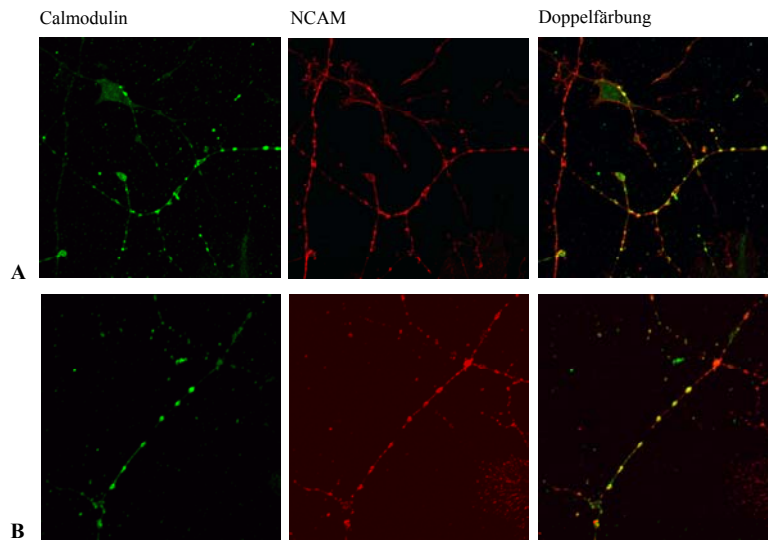


Abbildung 13A+B: Kolokalisation von Calmodulin und NCAM in primären Hippocampusneuronen. Lebende primäre Hippocampusneurone wurden mit einem anti-NCAM-Antikörper, dann mit einem gegen diesen gerichteten Sekundärantikörper inkubiert und anschließend fixiert. Nach Permeabilisierung wurde die Calmodulinverteilung mit einem anti-CaM-Antikörper detektiert. Die Doppelfärbung zeigt „cluster“ von NCAM und Calmodulin.

3.6 Calmodulin und die Proteolyse von NCAM

NCAM existiert nicht nur membrangebunden, sondern auch als lösliches Protein im Extrazellulärraum. Bisher ist nicht für alle löslichen NCAM-Formen bekannt, auf welchem Wege sie entstehen und wie ihre Bildung reguliert wird. Aufgrund der Tatsache, daß Calmodulin an der Modulation der Proteolyse verschiedener Transmembranproteine wie L-Selectin, TNF-alpha, TrkA und APP beteiligt ist (Diaz-Rodriguez et al., 2000), sollte daher im folgenden die Frage geklärt werden, ob die oben beschriebene Interaktion von Calmodulin mit NCAM bei der Freisetzung von löslichem NCAM eine regulative Funktion einnimmt und welche Proteasen bei diesem Prozeß eine Rolle spielen. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Inhibitionsstudien durchgeführt, bei denen ein spezifischer Calmodulininhibitor, CGS9343B (Kooperation mit Novartis Pharma, Schweiz) und diverse Proteaseinhibitoren eingesetzt wurden.

3.6.1 CaM-Inhibitionsstudien an isolierten N2A-Plasmamembranen

Probstmeier *et al.* konnten zeigen, daß eine 110 kD schwere, lösliche NCAM-Form durch die Inkubation von Mäusehirnmembranen in RPMI-Medium bei 37°C entsteht und daß diese Isoform spezifische Interaktionen mit ECM-Molekülen eingehen kann (Probstmeier *et al.*, 1989). Für die Inhibitionsstudien wurde zunächst überprüft, ob die obigen Versuche auch an kultivierten Zellen reproduziert werden können, da Zellplasmamembranen einfach und in großer Menge zu gewinnen sind. N2A-Zellen sind Neuroblastomazellen und exprimieren endogen alle drei membrangebundenen NCAM-Isoformen. Die Inkubation isolierter N2A-Plasmamembranen in RPMI-Medium bei 37°C führte ebenfalls zur Freisetzung eines einzigen NCAM-Fragmentes, welches im SDS-Gel bei ca. 110 kD wanderte (Abbildung 14A+B, Spur 1). Der Einfluß von Calmodulin auf die NCAM110-Bildung ist in Abbildung 14A gezeigt. Die Inkubation der Membranen in Anwesenheit von 1 µM Calmodulin und 1 mM CaCl₂ erhöhte die Menge freigesetzten NCAM110s stark (Spur 3), während die Erhöhung der Kalziumkonzentration allein keinen Einfluß zeigte (Spur 2). Die Applikation eines spezifischen CaM-Inhibitors bewirkte keine Veränderung der NCAM110-Menge, EDTA hemmte die Bildung des NCAM110 in geringem Maße (Spur 4+5).

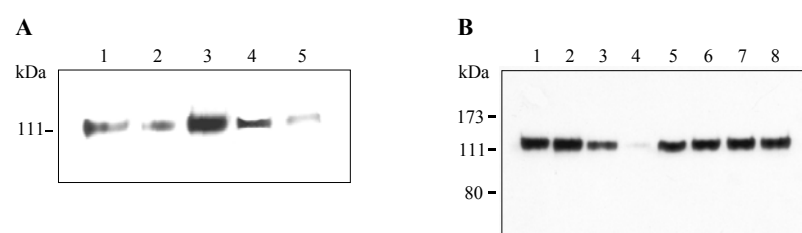


Abbildung 14: Bildung von NCAM110 aus isolierten N2A-Zellmembranen. Plasmamembranen von N2A-Zellen wurden isoliert und 2 Stunden bei 37°C in RPMI-Medium inkubiert. Die Membranüberstände wurden gefällt und per SDS-PAGE aufgetrennt. Im darauf folgenden Western-BFlot wurde NCAM110 mit einem polyklonalen anti-NCAM-Antikörper detektiert. **A:** Einfluß von Calmodulin. Spur 1: N2A-Membranüberstand; 2: 1 mM CaCl₂; 3: 1 mM CaCl₂ und 1 µM CaM; 4: 50 µM CaM-Inhibitor; 5: 5 mM EDTA. **B:** Einfluß verschiedener Proteaseinhibitoren. Spur 1: N2A-Membranüberstand; 2: 1 mM CaCl₂ und 1 µM CaM; 3: 5 mM EDTA; 4: 10 mM 1,10-Phenantrolin; 5: 0,1 µM GM6001; 6: Boehringer Complete™; 7: 1 µM Leupeptin; 8: 50 µM CaM-Inhibitor.

Die verstärkte NCAM110-Freisetzung durch Applikation von exogenem Calmodulin kann mehrere Ursachen haben. Entweder führt die direkte Assoziation mit dem intrazellulären Teil von NCAM140/180 zu einer Konformationsänderung, welche die Proteolyse begünstigt, oder Calmodulin aktiviert auf anderem Wege, direkt oder indirekt, die verantwortliche Protease. Zur Aufklärung der Natur der Proteasen und der proteolytischen Mechanismen, die zur Bildung des NCAM110 führen, wurden spezifische Proteaseinhibitoren eingesetzt (Abbildung 14B). 1,10-Phenanthrolin, ein Metalloproteaseinhibitor, hemmt die NCAM110-Bildung nahezu komplett (Spur 4), wohingegen Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren (Leupeptin, Boehringer Complete™) keinerlei Einfluß zeigten (Spur 6+7). EDTA, ein Chelator divalenter Ionen, reduzierte die aus den N2A-Plasmamembranen freigesetzte NCAM110-Menge nur zu einem geringen Anteil (Spur 3). GM6001, ein spezifischer Matrixmetalloproteaseinhibitor, hemmte die *in vitro*-Proteolyse von NCAM nicht (Spur 5).

Die Regulation der NCAM-Proteolyse erfordert möglicherweise weitere zytoplasmatische Komponenten, die bei Versuchen an isolierten Plasmamembranen nicht präsent sind. Daher wurde im folgenden untersucht, ob NCAM110 im Zellkulturüberstand von N2A-Zellen detektierbar ist und welchen Einfluß Calmodulin- und Proteaseinhibitoren in dieser *in vivo* Situation besitzen.

3.6.2 CaM- und Proteaseinhibitionsstudien in Zellkultur

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener CaM- und Proteaseinhibitoren auf die NCAM-Proteolyse wurden N2A-Zellen in „6well“-Schalen bis zu einer 60-70%igen Konfluenz kultiviert. Daraufhin wurden pro Vertiefung 800 µl, mit den entsprechenden Inhibitoren supplementiertes, serumfreies Medium appliziert und die Zellen ü.N. inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, die Proteine des Überstandes mit Hilfe einer Acetonfällung präzipitiert und in SDS-Probenpuffer gelöst. Die Zellen wurden mit Ripa-Puffer (1% NP-40) lysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Auf die Konzentration der Zellysate normierte Mengen der Proteine des Überstandes wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im Western-Blot detektiert.

Eine einzige, NCAM-reaktive Bande bei ca. 110 kD konnte in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden (Abbildung 15). Die Inkubation der Zellen in Anwesenheit des spezifischen CaM-Inhibitors CGS9343B, der die NCAM-Freisetzung aus isolierten Membranen nicht beeinflusste, hemmte die Bildung des NCAM110 *in vivo* stark.

Viele von Calmodulin regulierte Prozesse werden über die CaMKII vermittelt. Um zu überprüfen, ob die NCAM-Proteolyse über diesen Signaltransduktionsweg kontrolliert wird, wurde ein spezifischer CaMKII-Inhibitor, KN-62 eingesetzt. Die Hemmung der CaMKII hatte keine Wirkung auf die Menge der löslichen NCAM-Form (Abbildung 15, Spur 4), auch Cystein- (Leupeptin) und Serinproteaseinhibitoren (Aprotinin) zeigten keinen Einfluß (Abbildung 15, Spur 5+6). Keine der Substanzen war nach zellmorphologischen Kriterien (Lichtmikroskop) bei den verwendeten Konzentrationen für die N2A-Zellen toxisch. 1,10-Phenanthrolin konnte in diesem Versuch nicht eingesetzt werden, da sich die Zellen bei der für eine effiziente Inhibition notwendigen Konzentration ablösten (Daten nicht gezeigt).

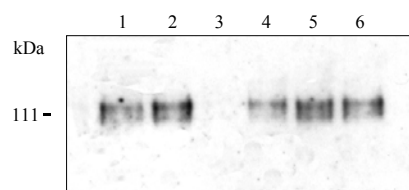


Abbildung 15: NCAM110 im Überstand kultivierter N2A-Zellen. N2A-Zellen wurden ü.N. in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren inkubiert. Die Proteine des Zellkulturüberstandes wurden präzipitiert und per SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot wurde NCAM110 mit einem polyklonalen anti-NCAM-Antikörper detektiert. Spur 1+2: N2A-Zellkulturüberstand; 3: 10 μ M CaM-Inhibitor; 4: 10 μ M CaMKII-Inhibitor; 5: 1 μ M Leupeptin; 6: 10 mg/ml Aprotinin.

Aufgrund der Tatsache, daß N2A-Zellen alle drei Hauptisoformen von NCAM exprimieren, ist es nicht möglich, aus obigen Ergebnissen den Ursprung des 110 kD schweren, löslichen NCAM-Fragmentes zu bestimmen. Für diesen Zweck wurden

daher CHO-Zellen benutzt, welche endogen kein NCAM exprimieren. Durch transiente Transfektion dieser Zellen mit Expressionskonstrukten der einzelnen NCAM-Isoformen sollte daher untersucht werden, ob und inwieweit die drei Isoformen auf unterschiedlichen proteolytischen Wegen gespalten werden. Hierzu wurden CHO-Zellen mit pcDNA3-NCAM120, -140 oder -180 transfiziert, 24 Stunden später mit Versene abgelöst und auf der doppelten Fläche ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit serumfreiem Medium in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Inhibitoren ü.N. inkubiert. Die gefällten Proteine des Zellkulturüberstandes wurden auf die jeweiligen Konzentrationen der lysierten Zellen normiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und NCAM im Western-Blot detektiert. Abbildung 16 zeigt den Vergleich der unterschiedlichen NCAM-Isoformen.

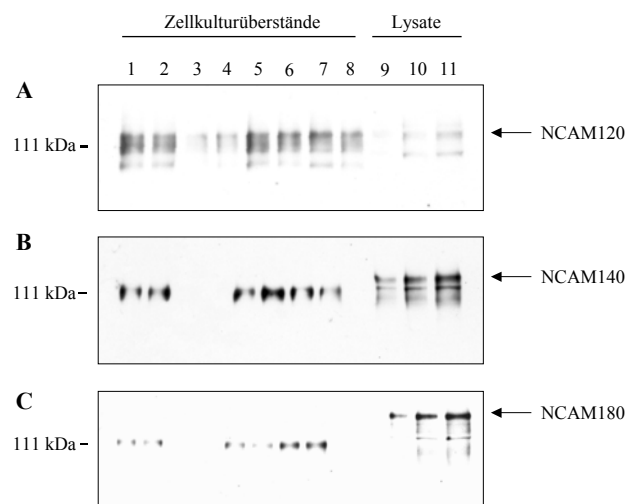


Abbildung 16: NCAM110 im Überstand transfizierter CHO-Zellen. CHO-Zellen wurden transient mit pcDNA3-Konstrukten der einzelnen NCAM-Isoformen transfiziert und in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren ü.N. in serumfreiem Medium inkubiert. Lösliches NCAM des Zellkulturüberstandes wurde im Western-Blot mit einem polyklonalen anti-NCAM-Antikörper detektiert. **A:** NCAM120 transfiziert; **B:** NCAM140 transfiziert; **C:** NCAM180 transfiziert. Spur 1+2: Ohne Inhibitor; 3+4: 10 µM CGS9343B; 5: 1 µM KN-62; 6: 10 µM KN-62; 7: 1 µM Leupeptin; 8: 10 mg/ml Aprotinin; 9-11: 5 µl, 10 µl und 20 µl Zellysat zur Expressionskontrolle.

Im Zellkulturmedium der NCAM140- und NCAM180-exprimierenden CHO-Zellen war eine einzige NCAM-immunreaktive 110 kD schwere Bande nachweisbar

(Abbildung 16B+C, Spur 1+2). Die Supplementierung des Mediums mit 10 μ M CGS9343B führte zur vollständigen Hemmung der NCAM110-Bildung (B+C, Spur 3+4). Der CaMKII-Inhibitor KN-62 beeinflusste die Proteolyse nicht (B+C, Spur 5+6). Auch Cystein- und Serinproteaseinhibitoren zeigten keinen Effekt auf die Menge proteolytisch freigesetzten NCAMs (B+C, Spur 7+8).

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Regulation der NCAM-Proteolyse möglicherweise von der Lokalisation innerhalb bestimmter Membranmikrodomänen, den „*rafts*“ abhängt, wurden CHO-Zellen mit einem mutierten NCAM140 Δ Cys-Konstrukt transfiziert, in welchem alle Cystein- gegen Serinreste ausgetauscht waren. Es konnte in anderen Studien gezeigt werden, daß die daraus resultierende Verhinderung der Palmitoylierung der Cysteinreste zum Ausschluß von NCAM140 aus „*rafts*“ führte (Niethammer et al., eingereicht). Die mit dem mutierten NCAM140 transfizierten CHO-Zellen zeigten dasselbe Proteolyseverhalten, wie die mit dem Wildtyp-NCAM140 transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Inkubation der NCAM120-transfizierten CHO-Zellen lieferte ein etwas anderes Bild. Die 110 kD Bande wurde von weiteren Banden überlagert (Abbildung 16A, Spur 1+2). Neben einer ca. 120 kD schweren Bande erschienen zwei kleinere Banden bei ca. 100 kD. Keiner der applizierten Proteaseinhibitoren hatte Auswirkung auf die Intensität der NCAM-immunreaktiven Banden. NCAM120, die GPI-verankerte Isoform von NCAM, besitzt keine intrazelluläre Domäne. Eine direkte Interaktion mit Calmodulin ist daher nicht möglich, dennoch inhibierte der Calmodulinantagonist die Proteolyse des NCAM120 stark (Abbildung 16A, Spur 3+4). Es muß daher andere Proteine geben, die calmodulinabhängig an der Regulation der Proteolyse von NCAM120 beteiligt sind. Auch in die Spaltung von NCAM120 ist die CaMKII nicht involviert, da der Inhibitor KN-62 ebenfalls keine Wirkung zeigte (A, Spur 5+6).

3.6.3 NCAM-Proteolyse in TACE-defizienten Fibroblasten

Im Zellkulturmedium von N2A- und NCAM-transfizierten CHO-Zellen konnte ein ca. 110 kD schweres NCAM-Fragment nachgewiesen werden, dessen Bildung mit Hilfe

eines Calmodulininhibitors unterdrückt werden konnte. Verantwortlich für die Proteolyse von NCAM ist eine membrangebundene Metalloprotease, da NCAM110 auch aus mit Bicarbonat behandelten, isolierten N2A-Plasmamembranen freigesetzt wurde (Daten nicht gezeigt) und die Bildung von löslichem NCAM mit 1,10-Phenanthrolin inhibierbar war. Verschiedene Transmembranproteine werden calmodulinabhängig von einer spezifischen Metalloprotease, dem „*TNF- α converting enzyme*“ (TACE), gespalten (Diaz-Rodriguez et al., 2000). Zur Aufklärung der Funktionen dieses Enzyms waren TACE-defiziente Mäuse hergestellt worden, welche einen ausgeprägten Phänotyp besitzen und den embryonalen Tag 18 nicht überlebten (Peschon et al., 1998). Aus Ohren entnommene Fibroblasten dieser TACE^{-/-}-Mäuse wurden durch retrovirale Transformation immortalisiert und stellen ein gutes Modell zur Untersuchung des Einflusses von TACE auf die proteolytische Spaltung von Transmembranproteinen dar (Arribas and Massague, 1995; Mohler et al., 1994). Eine TACE-exprimierende Kontrollzelllinie desselben genetischen Hintergrundes wurde durch stabile Transfektion der TACE^{-/-}-Zellen mit TACE geschaffen. Zur Überprüfung der Einsetzbarkeit obiger Fibroblasten-Zelllinien für die Untersuchung des NCAM-„*sheddings*“ wurde zunächst die Expression von NCAM analysiert. Sowohl die TACE-defizienten (TACE^{-/-}) als auch die TACE-transfizierten Fibroblasten (TACE^{-/-}+TACE) exprimierten endogen die NCAM140-Isoform (Abbildung 17, Spur 2+4).

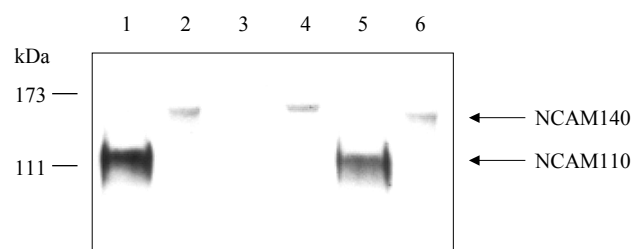


Abbildung 17: NCAM110 im Überstand von TACE^{-/-}- und TACE^{-/-}+TACE-Fibroblasten. TACE-defiziente (Spuren 3+4) bzw. stabil mit TACE transfizierte (Spuren 1, 2, 5, 6) TACE^{-/-}-Fibroblasten wurden ü.N. in serumfreiem Medium inkubiert und NCAM des Zellkulturüberstandes (Spuren 1, 3, 5) und der lysierten Zellen (Spuren 2, 4, 6) per Western-Blot analysiert. NCAM110 ist nur im Überstand der TACE-transfizierten Zellen detektierbar. Der Calmodulininhibitor CGS9343B hat keinen Einfluß auf die Menge des aus TACE-transfizierten Fibroblasten freigesetzten NCAM110s (Spuren 5 + 6).

Durch Vergleich der löslichen NCAM-Fragmente im Zellkulturüberstand der beiden Zelllinien sollte der Einfluß von TACE auf die NCAM-Proteolyse untersucht werden. Im Medium der TACE-exprimierenden Fibroblasten war lösliches NCAM110 nachweisbar, im Überstand der TACE-defizienten Fibroblasten konnte kein NCAM detektiert werden (Spur 1 bzw. 3). Zur Überprüfung der Calmodulinabhängigkeit der TACE-vermittelten NCAM140-Proteolyse wurden die TACE-transfizierten TACE^{-/-}-Fibroblasten in Anwesenheit des CaM-Inhibitors inkubiert. CGS9343B zeigte keinen Einfluß auf die Menge des gebildeten NCAM110-Fragmentes (Spur 1 versus 5).

VI Diskussion

1 Suche nach Bindungspartnern mit konventionellem Yeast two-hybrid und Ras Recruitment System

Zur Suche nach zytoplasmatischen Bindungspartnern verschiedener Zelladhäsionsmoleküle wurde zum einen das konventionelle Yeast two-hybrid System und zum anderen ein neues, auf der Lokalisierung eines funktionellen Ras-Proteins über eine Protein-Protein-Interaktion an der Plasmamembran beruhendes Hefesystem, eingesetzt.

Da das P0-Protein spezifisch von Zellen des peripheren Nervensystems exprimiert wird, sollte für den Gebrauch von P0 als Köder im klassischen Yeast two-hybrid System zunächst eine cDNS-Bank aus mRNS bovinen Ischiasnervs generiert werden. Obgleich diese Bank mit einer Anzahl von $3,44 \times 10^5$ unabhängigen Transformanten vermutlich nicht sämtliche Proteine des Ischiasnervs repräsentierte, wurde sie zur Durchmusterung mit P0 eingesetzt. Für den Einsatz eines S-MAG-Köders wurde eine Gesamthirn-cDNS-Bibliothek verwendet. Bei der Durchmusterung der entsprechenden cDNS-Bibliotheken konnten keine Interaktionspartner identifiziert werden. L-MAG, die längere Isoform des Myelin-assoziierten Glykoproteins, konnte im konventionellen Yeast two-hybrid System nicht als Köder eingesetzt werden, da es autoaktivierend wirkte und somit das System kurzschloß.

Frühere Untersuchungen unter Verwendung der verschiedenen intrazellulären Domänen von NCAM im konventionellen Yeast two-hybrid System hatten ebenfalls keinen Erfolg bei der Entdeckung neuer Bindungspartner (Diplomarbeit M. Vogelsang, ETH Zürich). Die Gründe für das Versagen des klassischen Yeast two-hybrid Systems zur Identifizierung von Interaktionspartnern dieser Proteine der Immunglobulin-Superfamilie sind bisher nicht aufgeklärt worden. Ein grundsätzliches Problem, insbesondere beim Einsatz zytoplasmatischer Domänen von Transmembranproteinen im konventionellen Yeast two-hybrid System ist allerdings, daß der Nachweis einer Interaktion im Zellkern der Hefezelle erfolgt. Zum einen

können die Fusionsproteine toxisch auf die Hefezellen wirken. Zum anderen ist für das Zustandekommen vieler Interaktionen die unmittelbare Umgebung der beteiligten Bindungspartner essentiell. So entscheiden der pH-Wert, Kalzium- und andere Ionenkonzentrationen, sowie nicht zuletzt die Anwesenheit dritter modulatorischer Proteine über die Ausbildung einer Bindung. Es ist bekannt, daß manche Interaktionen, die normalerweise im Zytoplasma oder an der Plasmamembran stattfinden, im konventionellen Yeast two-hybrid System nicht detektiert werden können (Colas and Brent, 1998). Auffällig ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß unter der Vielzahl von Publikationen, die den erfolgreichen Einsatz des Systems beschreiben, nur extrem wenige Autoren Zelladhäsionsmoleküle als Köder verwendeten.

Aufgrund der oben angeführten Gründe war der Einsatz des Ras Recruitment Systems ein vielversprechender Ansatz zur Suche nach intrazellulären Bindungspartnern von Zelladhäsionsproteinen wie NCAM und MAG. Dieses System bietet gegenüber dem klassischen die Möglichkeit, Protein-Protein-Interaktionen in der direkten Nähe der Plasmamembran zu untersuchen. Der Nachweis einer Interaktion erfolgt durch Rekrutierung eines permanent aktiven Ras-Köderfusionsproteins durch Bindung eines Beuteproteins, welches in der Plasmamembran verankert ist (Broder et al., 1998).

Bei der Überprüfung der Einsetzbarkeit der Köderfusionsproteine waren die NCAM-Konstrukte in der Lage, das System kurzzuschließen. Verantwortlich hierfür sind vermutlich vier palmitoylierbare Cysteinreste, welche eine Membranlokalisation des NCAM-mRas(61)-Fusionsproteins ohne die Notwendigkeit eines membran-gebundenen Interaktionspartners bewirkten. Die in Hefezellen exprimierten intrazellulären Domänen von NCAM werden also, wahrscheinlich durch die Palmitoylierung der Cysteinreste, zur Plasmamembran transportiert und in dieser verankert. Diese Beobachtung erklärt, warum der Einsatz der vollständigen intrazellulären Domänen von NCAM im klassischen Yeast two-hybrid System keinen Erfolg haben konnte, da die Verankerung des NCAM-Köders in der Plasmamembran die eigentliche Nachweisreaktion, also die transkriptionelle Aktivierung im Hefekern, verhinderte. Für P0 ist ebenfalls bekannt, daß es an Cys¹⁵³ innerhalb der intrazellulären Domäne palmitoyliert wird (Bizzozero et al., 1994). Möglicherweise

führt auch hier diese Modifikation zur Verankerung in der Plasmamembran und damit zur Verhinderung der, für eine Interaktion im konventionellen System notwendigen, Kernlokalisation.

Die Köderkonstrukte der trunkierten intrazellulären NCAM-Domänen, in denen die cysteinreiche Sequenz nicht vorhanden war, konnten zur Durchmusterung von RRS-cDNS-Bibliotheken eingesetzt werden. Die Experimente führten jedoch, genauso wie die Suche mit einem L-MAG-Köder nicht zur Identifikation neuer Bindungspartner. Mehrere Erklärungsansätze sind hierfür denkbar: Die Fähigkeit mancher Transmembranproteine zur Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen hängt von ihrer Lokalisation innerhalb bestimmter Subkompartimente der Plasmamembran ab. Die Palmitoylierung der vier intrazellulären Cysteinreste im NCAM140 und NCAM180 (Little et al., 1998) bewirkten *in vivo* den Transport in sogenannte „*lipid rafts*“, cholesterolreiche Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran, die als Signalplattformen angesehen werden (Simons and Ikonen, 1997). Erst die Lokalisation in diesen Mikrodomänen befähigt NCAM140, durch die Nähe zu anderen Effektorproteinen zur Mitwirkung an verschiedenen Signaltransduktionskaskaden (Niethammer et al., eingereicht). Solche „*lipid rafts*“ existieren zwar ebenfalls innerhalb der Hefe (Bagnat et al., 2000), die mRas(61)-Fusionsproteine der intrazellulären Domänen verbleiben im RRS jedoch im Zytoplasma der Hefezelle und sind daher nicht in „*rafts*“ lokalisiert. Auch MAG wird *in vivo* palmitoyliert (Pedraza et al., 1990). Zwar befindet sich der auf diese Weise modifizierte Cysteinrest nicht innerhalb der zytoplasmatischen Domäne, sondern in der Transmembranregion, dennoch ist auch MAG *in vivo* in „*rafts*“ lokalisiert (Dr. Ralf Kleene, ZMNH, persönliche Mitteilung), was vermutlich auf die Palmitoylierung zurückzuführen ist. Inwieweit die „*raft*“-Lokalisation für die Funktionalität von MAG und für seine Fähigkeit, mit anderen Proteinen Bindungen einzugehen, benötigt wird, ist bisher ungeklärt. Es wäre allerdings eine Möglichkeit, die das Versagen der Hefesysteme zur Identifizierung neuer intrazellulärer Bindungspartner der eingesetzten Zelladhäsionsmoleküle erklären könnte.

Weiterhin ist denkbar, daß für eine Interaktion von Zelladhäsionsmolekülen mit intrazellulären Bindungspartnern möglicherweise mehr als nur die zytoplasmatische

Domäne notwendig ist. Es ist wahrscheinlich, daß die dreidimensionale Struktur der intrazellulären Domänen durch die der Transmembran- und der extrazellulären Domänen mitbestimmt wird und daß die resultierende Konformation für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen entscheidend ist. Der Erfolg des Einsatzes der isolierten zytoplasmatischen Domänen in two-hybrid Systemen wäre unter diesen Voraussetzungen fraglich.

2 NCAM-Calmodulin-Interaktion

Mit Hilfe des Biacoresystems konnte eine Interaktion der intrazellulären Domänen von NCAM mit Calmodulin festgestellt werden. Die Bindung war kalziumabhängig und spezifisch, die intrazellulären Domänen der Zelladhäsionsmoleküle L1 und CHL1 zeigten unter denselben Bedingungen keine Bindung. Die Wechselwirkung zwischen NCAM und Calmodulin konnte in einer Bindungsstudie mit Hilfe von Agarosebeads, auf dessen Oberfläche Calmodulin kovalent gekoppelt war, verifiziert werden. Die intrazellulären Domänen von NCAM wurden mit diesen Calmodulinbeads kalziumabhängig und spezifisch präzipitiert.

Viele strukturell diverse Proteine binden Calmodulin mit Hilfe bestimmter Bindungsmotive (Rhoads and Friedberg, 1997). Gekennzeichnet sind diese Motive durch eine hohe positive Nettoladung und ein starkes helikales, hydrophobes Moment. Kalziumabhängige Interaktionen verschiedener Proteine (Calcineurin, CaMKII, IP₃-Rezeptor) werden durch das sogenannte 1-5-8-14-Motiv vermittelt. Anhand von Konformationsstudien konnte gezeigt werden, daß die konservierten hydrophoben bzw. aromatischen Aminosäuren an den Positionen 1, 5, 8 und 14 der Bindungssequenz die Domäne in den zwei globulären Regionen des kalziumgebundenen Calmodulins verankern. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus des Calmodulins können CaM-Bindungsmotive auch invers auftreten (Hall et al., 1996).

Die Aminosäuresequenzen von NCAM140 und -180 enthalten ein 14-8-5-1-Motiv innerhalb der intrazellulären Domäne nahe der Transmembranregion, allerdings ist die

Nettoladung über diese Domäne nur +1 (Abbildung 9). Das putative Calmodulinbindungsmotiv liegt in der Region derjenigen vier Cysteinreste, von denen in Mutationsstudien gezeigt wurde, daß sie palmitoyliert werden können (Little et al., 1998). Diese Palmitoylierung ist für die Lokalisation in „rafts“ essentiell (Niethammer et al., 2001, eingereicht). Auch andere calmodulinbindende Proteine akkumulieren in „rafts“. Für NAP-22, einem überwiegend im Hirn exprimierten, von seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften dem GAP-43 ähnlichen Molekül, konnte gezeigt werden, daß seine Lokalisation in „rafts“ auf bisher ungeklärte Weise durch Calmodulin reguliert wird (Maekawa et al., 1999).

Zur Aufklärung der Frage, ob durch die Wechselwirkung mit Calmodulin möglicherweise eine sterische Hinderung die Palmitoylierung und damit die „raft“-Lokalisation von NCAM blockiert, sollten die für die Calmodulinbindung verantwortlichen Aminosäuren eingegrenzt werden. Hierzu wurden Peptide synthetisiert, welche die intrazelluläre Domäne von NCAM in drei Fragmente unterteilen. Die Positionen der Peptide innerhalb der NCAM-Sequenz sind in Abbildung 9 dargestellt. Das N-terminale Peptid 1 enthält das putative, inverse CaM-Bindungsmotiv. Dieses Oligopeptid zeigte eine extrem schlechte Löslichkeit und konnte daher nicht in den Bindungsstudien verwendet werden. Ein verkürztes Peptid, welches zwar das potentielle Bindungsmotiv enthielt, in dem aber die Cystein- durch Serinreste substituiert worden waren, interagiert nicht mit Calmodulin. Auch die anderen beiden Peptide 2 bzw. 3 zeigten im Biacoresystem keine Wechselwirkung mit Calmodulin. Die Möglichkeit, daß die mutierten Cysteinreste für die Wechselwirkung mit Calmodulin notwendig sind, erschien aufgrund der Tatsache, daß ein mutiertes Konstrukt der kompletten intrazellulären Domäne von NCAM140, das NCAM140ICΔ3×Cys, im Biacoresystem mit Calmodulin interagiert (Abbildung 10), als unwahrscheinlich.

Mit Hilfe der Peptide konnte die für die Interaktion mit Calmodulin verantwortliche Sequenz nicht identifiziert werden. Die Peptide zeigten weder Bindungssignale im Biacoresystem, noch ließ sich mit ihnen die Assoziation der intrazellulären NCAM-Domänen an die CaM-Beads inhibieren (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise entspricht die dreidimensionale Struktur der Peptide nicht der für eine

Wechselwirkung notwendigen Konformation. Unter Umständen sind an der Bindung aber auch Aminosäurereste beteiligt, die relativ zur Primärstruktur weit voneinander entfernt liegen. Die Applikation der einzelnen Peptide würde in diesem Fall für eine Bindung nicht ausreichen, doch auch die zeitgleiche Überleitung aller Peptide über die Calmodulinoberfläche lieferte ebenfalls keine Signale im Biacoresystem (Daten nicht gezeigt).

Die NCAM-Calmodulin-Wechselwirkung konnte im Ras Recruitment System weder mit NCAM-Köder- und Calmodulin-Beutekonstrukten, noch vice versa nachgewiesen werden. Die Problematik der Verwendung von Zelladhäsionsmolekülen in Yeast two-hybrid Systemen ist bereits weiter oben ausführlich diskutiert worden.

Der Versuch Calmodulin aus Hirnhomogenat oder aus N2A-Zellysat mit anti-NCAM-Antikörpern kopräzipitieren schlug fehl (Daten nicht gezeigt). Auch die Supplementierung des Zellysates mit einem Überschuß an biotinyliertem Calmodulin brachte keinen Erfolg. Eventuell bewirkt die Interaktion von Calmodulin mit dem intrazellulären Teil von NCAM eine Konformationsänderung, welche die Bindung des anti-NCAM-Antikörpers an die extrazelluläre Domäne verhindert. Ein derartiges „*inside-out signaling*“, bei dem intrazelluläre Konformationsänderungen extrazelluläre Erkennungsprozesse beeinflussen, konnte bei der Untersuchung der Wechselwirkung von L-Selectin und Calmodulin beobachtet werden. Intrazelluläre Punktmutationen innerhalb der CaM-Bindungsstelle, welche die Wechselwirkung von Calmodulin mit L-Selectin blockierten, verhinderten ebenfalls die Erkennung von extrazellulären Epitopen durch einen anti-L-Selectin-Antikörper (Kahn et al., 1998).

L-Selectin ist eines von vielen Proteinen, das durch membrangebundene Proteasen von der Plasmamembran abgespalten und als lösliches Fragment freigesetzt werden kann (Kishimoto et al., 1989). Derartige proteolytische Prozesse werden als „*ectodomain shedding*“ bezeichnet, besitzen zumeist eine physiologische Relevanz und unterliegen daher einer strengen Regulation (Hooper et al., 1997). Kahn et al. konnten zeigen, daß die proteolytische Spaltung von L-Selectin durch eine direkte Interaktion mit Calmodulin gesteuert wird (Kahn et al., 1998). Durch Inhibition der

Calmodulinbindung mit Hilfe von Calmodulinantagonisten, oder durch Mutation der Bindungsstelle konnte eine verstärkte Proteolyse L-Selectins erreicht werden.

Eine generelle Rolle für Calmodulin als Modulator der Oberflächenexpression und Funktionalität verschiedener membrangebundener Proteine wurde von Díaz-Rodríguez et al. vorgeschlagen (Díaz-Rodríguez et al., 2000). Sie konnten zeigen, daß die Applikation von Calmodulinantagonisten zu einem verstärkten „*shedding*“ der membrangebundenen Vorläuferproteine von Wachstumsfaktoren wie TGF- α oder Neuregulin- α 2c, der Rezeptortyrosinkinase TrkA und von β -APP führt.

NCAM wird ebenfalls proteolytisch gespalten, welches die Bildung eines ca. 110 kD schweren, löslichen und funktionellen Fragmentes bewirkt (Probstmeier et al., 1989). Die Größe des freigesetzten NCAM110s entspricht theoretisch einem durch „*ectodomain shedding*“, also durch eine extrazelluläre, membrannahe Proteolyse, entstandenen Produktes. Daher wurde geprüft, ob die nachgewiesene Interaktion von NCAM mit Calmodulin möglicherweise eine regulative Funktion bei dessen Proteolyse spielt. An isolierten N2A-Plasmamembranen konnte gezeigt werden, daß exogen appliziertes Calmodulin die NCAM110-Bildung verstärkt und 1,10-Phenanthrolin, ein Metalloproteaseinhibitor, die NCAM-Proteolyse hemmt. Für die NCAM110-Freisetzung scheint also vermutlich eine membrangebundene Metalloprotease verantwortlich zu sein.

An kultivierten N2A-Zellen konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Inhibition der Calmodulin-NCAM-Bindung mit Hilfe von CGS9343B, einem spezifischen CaM-Antagonisten (Norman et al., 1987), zu einer starken Reduktion des NCAM-„*sheddings*“, also der Freisetzung von NCAM110 in den Zellkulturüberstand, führt. Inwieweit diese Inhibition auf eine direkte Assoziation von Calmodulin mit NCAM bzw. dessen Dissoziation zurückzuführen ist, sollte durch Versuche an CHO-Zellen weiter untersucht werden. Da CHO-Zellen endogen kein NCAM exprimieren, sollte durch Transfektionsversuche die Isoformspezifität des Calmodulineinflusses analysiert werden. Sowohl aus NCAM140- als auch aus NCAM180-transfizierten CHO-Zellen wurde NCAM110 freigesetzt. In Anwesenheit des Calmodulinantagonisten wurde das „*shedding*“ vollständig gehemmt. Denkbar ist, daß eine

direkte Bindung von Calmodulin an die intrazellulären Domänen der beiden Transmembranisoformen zu einer Konformationsänderung führt, welche die extrazelluläre Schnittstelle für eine membrangebundene Protease zugänglich macht. Wird diese Konformationsänderung durch Applikation des Calmodulinantagonisten verhindert, so bewirkt dieses eine Inhibition der proteolytischen Freisetzung des 110 kD schweren Spaltproduktes. Eine derartige Regulation über ein „*inside-out signaling*“ wurde für das „*shedding*“ von L-Selectin beschrieben, allerdings führte die durch einen Calmodulininhibitor bedingte Konformationsänderung dort zu einer verstärkten Sezession löslichen L-Selectins (Kahn et al., 1998).

Im Überstand der NCAM120-transfizierten CHO-Zellen konnten mehrere NCAM-immunreaktive Banden von ca. 100-120 kD detektiert werden. Interessanterweise hatte CGS9343B auch auf deren Bildung einen inhibitorischen Effekt. Aufgrund der Tatsache, daß die GPI-verankerte Isoform NCAM120 keinen intrazellulären Teil besitzt, muß in diesem Fall die Modulation der Proteolyse durch Calmodulin auf einem indirekten Wege stattfinden. Für die calmodulinregulierte Proteolyse membrangebundener Proteine ist eine direkte Wechselwirkung mit Calmodulin nicht zwingend notwendig. So konnte für die Spaltung der Rezeptortyrosinkinase TrkA gezeigt werden, daß die Applikation von Trifluoperazin, einem Calmodulininhibitor, das „*ectodomain shedding*“ von TrkA verstärkte. Versuche mit einer Deletionsmutante, der die komplette intrazelluläre Domäne des Rezeptors fehlte, zeigte jedoch eine unveränderte Sensibilität gegenüber dem Calmodulininhibitor (Diaz-Rodriguez et al., 2000). Es ist daher durchaus denkbar, daß die Spaltung von NCAM120 über einen calmodulinabhängigen Weg reguliert wird, der sich von dem der Transmembranisoformen NCAM140 und -180 unterscheidet. Eine Beteiligung der PI-PLC an der Proteolyse von NCAM120 kann ausgeschlossen werden, da der spezifische Inhibitor U73122 keinen Einfluß auf das „*shedding*“ von NCAM120 hatte (Daten nicht gezeigt).

Verantwortlich für die membrannahe, extrazelluläre Proteolyse vieler Transmembranproteine sind Metalloproteasen der ADAM-Familie. Von einem Mitglied dieser Familie, dem „*TNF- α converting enzyme*“, TACE oder ADAM17 ist bekannt, daß es an der Proteolyse von TNF- α , TGF- α , L-Selectin, APP und dem IL6-

Rezeptor beteiligt ist (Althoff et al., 2000; Black et al., 1997; Peschon et al., 1998). Wie oben bereits beschrieben, wird die Proteolyse von mehreren dieser Transmembranproteine über Calmodulin reguliert. Um die Fragestellung zu untersuchen, ob NCAM möglicherweise ebenfalls ein TACE-Substrat ist, wurden TACE-defiziente Fibroblasten, welche endogen NCAM140 exprimieren, auf ihre Fähigkeit zum NCAM-„*shedding*“ untersucht. Das 110 kD schwere NCAM-Fragment war nicht im Überstand von TACE^{-/-}-Zellen detektierbar. Die mit TACE transfizierten TACE^{-/-}-Zellen generierten NCAM110, seine Bildung wurde allerdings nicht vom Calmodulinantagonisten beeinflusst. Es ist daher anzunehmen, daß es mehrere Proteasesysteme gibt, welche die verschiedenen NCAM-Isoformen auf unterschiedlich regulierten Wegen spalten.

Die vollständige Inhibition der NCAM110-Bildung in den NCAM-transfizierten CHO-Zellen erscheint insofern verwunderlich, als daß zumindest die TACE-vermittelte NCAM140-Proteolyse in Anwesenheit des Calmodulinantagonisten stattfinden sollte. Die beobachtete vollständige Hemmung des NCAM-„*sheddings*“ an NCAM140-transfizierten CHO-Zellen wäre durch eine fehlende Expression von TACE in diesen Zellen erklärbar. Tatsächlich konnten Beer et al. zeigen, daß das „*shedding*“ von L-Selectin in stabil transfizierten CHO-Zellen aufgrund einer extrem geringen Expression der verantwortlichen Protease TACE nur zu einem verschwindend geringen Teil erfolgte (Beer et al., 1999). Vor diesem Hintergrund ließe sich auch das Versagen des TACE-hemmenden GM6001-Inhibitors bei der NCAM-Proteolyse an transfizierten CHO-Zellen erklären. Es ist also wahrscheinlich, daß verschiedene Proteasesysteme für das NCAM-„*shedding*“ verantwortlich sind. Die in CHO-Zellen wirksamen sind calmodulinabhängig und unterscheiden sich daher vom TACE-vermittelten Prozeß.

VII Zusammenfassung

Zur Identifizierung von zytoplasmatischen Interaktionspartnern der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM, P0 und MAG wurden verschiedene Yeast two-hybrid Systeme etabliert und zur Durchmusterung von cDNS-Bibliotheken eingesetzt. Aus mRNS bovinen Ischiasnervs wurde eine cDNS-Genbank hergestellt, die mit einem P0-Köder durchsucht wurde. Die Durchmusterung dieser Bibliothek, sowie die Suche nach Bindungspartnern in einer Mäusehirn-Bank mit einem S-MAG-Köder lieferte keine positiven Ergebnisse.

Der Einsatz eines neuen Systems, des Ras Recruitment Systems, welches gegenüber dem konventionellen Yeast two-hybrid System den Vorteil hat, daß die Nachweisreaktion in direkter Nähe der Plasmamembran stattfindet, führte ebenfalls zu keiner Identifizierung neuer Interaktionspartner. Weder die Durchmusterung einer Rattenhirn-Genbank mit einem L-MAG-Köder, noch die Suche mit Ködern der intrazellulären Domänen von NCAM führte zur Entdeckung zytoplasmatischer Bindungspartner. Die Gründe für das Scheitern beider Systeme sind bisher ungeklärt. Verschiedene Hinweise deuten allerdings darauf hin, daß Transmembranproteine der Ig-Superfamilie möglicherweise in bestimmten Kompartimenten der Plasmamembran lokalisiert sein müssen, um Interaktionen eingehen zu können.

Mit Hilfe von Biacorestudien konnte eine Interaktion zwischen Calmodulin und den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 nachgewiesen werden. Die Bindung war kalziumabhängig und spezifisch. In einem Bindungsassay wurden diese Interaktionen mit Hilfe von Calmodulin-gekoppelten Agarosebeads verifiziert. Calmodulin ist als Modulator des „*sheddings*“ mehrerer Transmembranproteine, wie z.B. L-Selectin, TNF-alpha und TGF-alpha bekannt. Diese extrazelluläre proteolytische Spaltung reguliert nicht nur die Menge des auf der Oberfläche verfügbaren Proteins, sondern erzeugt gleichzeitig lösliche und daher mobile, physiologisch wirksame Fragmente der Transmembranproteine. Auch NCAM existiert in löslicher Form. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Freisetzung eines 110 kD schweren NCAM-Fragmentes aus transfizierten CHO- und

N2A-Zellen calmodulinabhängig ist. Die Applikation eines spezifischen Calmodulininhibitors hemmte dieses NCAM-„*shedding*“ vollständig. Weitere Inhibitionsstudien ergaben, daß für die NCAM110-Freisetzung eine membrangebundene Metalloprotease verantwortlich zu sein scheint.

TACE, eine Metalloprotease der ADAM-Familie, ist ein potentieller Kandidat für das NCAM-„*shedding*“, da bekannt ist, daß sie an der calmodulinregulierten Spaltung verschiedener Transmembranproteine beteiligt ist. Daher wurde untersucht, ob diese membrangebundene Protease auch für die Freisetzung von NCAM110 verantwortlich ist. Durch Vergleich der Proteolyse von NCAM in TACE-defizienten und TACE exprimierenden Fibroblastenzelllinien konnte gezeigt werden, daß NCAM140 durch TACE gespalten wird. Allerdings läßt die Calmodulinunabhängigkeit des Prozesses darauf schließen, daß TACE für das in CHO- bzw. N2A-Zellen beobachtete NCAM-„*shedding*“ nicht hauptverantwortlich ist. Wahrscheinlich existieren also mehrere Proteolysewege für die Spaltung von NCAM.

VII Summary

Two different yeast two-hybrid systems have been established and were used for the search for intracellular binding partners of the neuronal cell adhesion molecules NCAM, P0 and MAG. A cDNA-library was generated from bovine sciatic nerve and screened with a P0-bait. However, no binding partners were identified for P0 and an S-MAG bait by using this approach.

The Ras Recruitment System, a new system which bears the advantage that protein-protein-interactions of interest occur in the cytoplasm near the plasmamembrane, also failed to detect new binding partners. Neither the screening of a rat brain library with an L-MAG bait, nor the screening with baits of the intracellular domains of NCAM discovered any interacting proteins. The reasons for the failure of both two-hybrid systems remain unclear, but several observations suggest that transmembrane proteins of the Ig-superfamily may need to be localized in special compartments within the plasmamembrane for proper function.

By use of the biacore system an interaction of calmodulin with the intracellular domains of NCAM140 and NCAM180 could be detected. The binding was calcium dependent and specific. The interaction could be verified in a binding assay, using calmodulin coupled agarose beads for the precipitation of NCAM intracellular domains. Calmodulin is known as a calcium dependent mediator of diverse processes. One function persists in the regulation of the shedding of transmembrane proteins like L-selectin, TNF-alpha and TGF-alpha. Such a proteolytic cleavage not only modulates the quantity of the proteins at the cell surface but also generates soluble and therefore mobile, physiologically active fragments. NCAM also exists in such soluble forms. In this work it was shown that the release of an 110 kD NCAM fragment from transfected CHO- or N2A-cells is calmodulin dependent. This NCAM shedding could be completely blocked by the application of a specific calmodulin inhibitor. Further experiments suggested that a membrane bound metalloprotease is responsible for the NCAM cleavage.

TACE, a metalloprotease of the ADAM family, is a good candidate for the NCAM shedding. It is known that TACE is involved in the calmodulin-regulated cleavage of several transmembrane proteins. Therefore it was investigated whether this membrane-associated protease also accounts for the release of the NCAM110 fragment. For this purpose the shedding of NCAM was investigated in TACE-deficient versus TACE-transfected fibroblast cell lines. It was demonstrated that the endogenously in these cells expressed NCAM140 isoform is cleaved by TACE. However the calmodulin independency of this process implies that TACE is not the only NCAM cleaving enzyme. Furthermore it can be concluded that the major shedding in CHO- or N2A-cells is performed by proteases distinct from TACE.

VIII Literaturverzeichnis

Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S., and Mullberg, J. (2000). Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur.J.Biochem.* 267, 2624-2631.

Aronheim, A. (1997). Improved efficiency sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives. *Nucleic Acids Res.* 25, 3373-3374.

Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J., and Karin, M. (1997). Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol.Cell Biol.* 17, 3094-3102.

Arquint, M., Roder, J., Chia, L. S., Down, J., Wilkinson, D., Bayley, H., Braun, P., and Dunn, R. (1987). Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 600-604.

Arribas, J. and Massague, J. (1995). Transforming growth factor-alpha and beta-amyloid precursor protein share a secretory mechanism. *J.Cell Biol.* 128, 433-441.

Ausubel, F.M. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York: Greene Publishing Associates, Inc.).

Bachmann, M., Conscience, J. F., Probstmeier, R., Carbonetto, S., and Schachner, M. (1995). Recognition molecules myelin-associated glycoprotein and tenascin-C inhibit integrin-mediated adhesion of neural cells to collagen. *J.Neurosci.Res.* 40, 458-470.

Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, 3254-3259.

Bartsch, U., Kirchhoff, F., and Schachner, M. (1989). Immunohistological localization of the adhesion molecules L1, N-CAM, and MAG in the developing and adult optic nerve of mice. *J.Comp Neurol.* 284, 451-462.

- Bartsch, U., Montag, D., Bartsch, S., and Schachner, M. (1995). Multiply myelinated axons in the optic nerve of mice deficient for the myelin-associated glycoprotein. *Glia* 14, 115-122.
- Becker, C. G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H., and Schachner, M. (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J.Neurosci.Res.* 45, 143-152.
- Beer, S., Oleszewski, M., Gutwein, P., Geiger, C., and Altevogt, P. (1999). Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J.Cell Sci. 112 (Pt 16)*, 2667-2675.
- Beggs, H. E., Baragona, S. C., Hemperly, J. J., and Maness, P. F. (1997). NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC- related tyrosine kinase p59(fyn). *J.Biol.Chem.* 272, 8310-8319.
- Beggs, H. E., Soriano, P., and Maness, P. F. (1994). NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J.Cell Biol.* 127, 825-833.
- Bizzozero, O. A., Fridal, K., and Pastuszyn, A. (1994). Identification of the palmitoylation site in rat myelin P0 glycoprotein. *J.Neurochem.* 62, 1163-1171.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., and Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- alpha from cells. *Nature* 385, 729-733.
- Brackenbury, R., Thiery, J. P., Rutishauser, U., and Edelman, G. M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J.Biol.Chem.* 252, 6835-6840.
- Broder, Y. C., Katz, S., and Aronheim, A. (1998). The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein- protein interactions. *Curr.Biol.* 8, 1121-1124.

Bruckner, G., Grosche, J., Schmidt, S., Hartig, W., Margolis, R. U., Delpech, B., Seidenbecher, C. I., Czaniera, R., and Schachner, M. (2000). Postnatal development of perineuronal nets in wild-type mice and in a mutant deficient in tenascin-R. *J.Comp Neurol.* *428*, 616-629.

Brummendorf, T. and Rathjen, F. G. (1993). Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III- related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J.Neurochem.* *61*, 1207-1219.

Buss, J. E., Solski, P. A., Schaeffer, J. P., MacDonald, M. J., and Der, C. J. (1989). Activation of the cellular proto-oncogene product p21Ras by addition of a myristylation signal. *Science* *243*, 1600-1603.

Colas, P. and Brent, R. (1998). The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol.* *16*, 355-363.

Cole, G. J. and Glaser, L. (1986). A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell- substratum adhesion. *J.Cell Biol.* *102*, 403-412.

Cole, G. J., Loewy, A., Cross, N. V., Akeson, R., and Glaser, L. (1986a). Topographic localization of the heparin-binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J.Cell Biol.* *103*, 1739-1744.

Cole, G. J., Loewy, A., and Glaser, L. (1986b). Neuronal cell-cell adhesion depends on interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature* *320*, 445-447.

Covault, J., Liu, Q. Y., and el Deeb, S. (1991). Calcium-activated proteolysis of intracellular domains in the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. *Brain Res.Mol.Brain Res.* *11*, 11-16.

Cremer, H., Chazal, G., Goridis, C., and Represa, A. (1997). NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol.Cell Neurosci.* *8*, 323-335.

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

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

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

D'Urso, D., Brophy, P. J., Staugaitis, S. M., Gillespie, C. S., Frey, A. B., Stempak, J. G., and Colman, D. R. (1990). Protein zero of peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction. *Neuron* 4, 449-460.

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

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

Ding, Y. and Brunden, K. R. (1994). The cytoplasmic domain of myelin glycoprotein P0 interacts with negatively charged phospholipid bilayers. *J.Biol.Chem.* 269, 10764-10770.

Dityatev, A., Dityateva, G., and Schachner, M. (2000). Synaptic strength as a function of post- versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 26, 207-217.

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

Doherty, P., Fazeli, M. S., and Walsh, F. S. (1995). The neural cell adhesion molecule and synaptic plasticity. *J.Neurobiol.* 26, 437-446.

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

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

Dorries, U., Taylor, J., Xiao, Z., Lochter, A., Montag, D., and Schachner, M. (1996). Distinct effects of recombinant tenascin-C domains on neuronal cell adhesion, growth cone guidance, and neuronal polarity. *J.Neurosci.Res.* 43, 420-438.

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

Eckhardt, M., Bukalo, O., Chazal, G., Wang, L., Goridis, C., Schachner, M., Gerardy-Schahn, R., Cremer, H., and Dityatev, A. (2000). Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J.Neurosci.* 20, 5234-5244.

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

Ekici, A. B., Fuchs, C., Nelis, E., Hillenbrand, R., Schachner, M., Van Broeckhoven, C., and Rautenstrauss, B. (1998). An adhesion test system based on Schneider cells to determine genotype- phenotype correlations for mutated P0 proteins. *Genet.Anal.* 14, 117-119.

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

- Endo, A., Nagai, N., Urano, T., Takada, Y., Hashimoto, K., and Takada, A. (1999). Proteolysis of neuronal cell adhesion molecule by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus. *Neurosci.Res.* 33, 1-8.
- Engel, J. (1991). Domains in proteins and proteoglycans of the extracellular matrix with functions in assembly and cellular activities. *Int.J.Biol.Macromol.* 13, 147-151.
- Fazeli, M. S., Breen, K., Errington, M. L., and Bliss, T. V. (1994). Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci.Lett.* 169, 77-80.
- Fields, R. D. and Itoh, K. (1996). Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19, 473-480.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Filbin, M. T., Walsh, F. S., Trapp, B. D., Pizzey, J. A., and Tennekoon, G. I. (1990). Role of myelin P0 protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344, 871-872.
- Fruttiger, M., Montag, D., Schachner, M., and Martini, R. (1995). Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *Eur.J.Neurosci.* 7, 511-515.
- Fujita, N., Kemper, A., Dupree, J., Nakayasu, H., Bartsch, U., Schachner, M., Maeda, N., Suzuki, K., and Popko, B. (1998). The cytoplasmic domain of the large myelin-associated glycoprotein isoform is needed for proper CNS but not peripheral nervous system myelination. *J.Neurosci.* 18, 1970-1978.
- Giese, K. P., Martini, R., Lemke, G., Soriano, P., and Schachner, M. (1992). Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell* 71, 565-576.

Guenard, V., Montag, D., Schachner, M., and Martini, R. (1996). Onion bulb cells in mice deficient for myelin genes share molecular properties with immature, differentiated non-myelinating, and denervated Schwann cells. *Glia* 18, 27-38.

Guthrie, C. and Fink, G. R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods Enzymol.* 194, 1-932.

Hahn, A. F., Whitaker, J. N., Kachar, B., and Webster, H. D. (1987). P2, P1, and P0 myelin protein expression in developing rat sixth nerve: a quantitative immunocytochemical study. *J.Comp Neurol.* 260, 501-512.

Hall, H., Williams, E. J., Moore, S. E., Walsh, F. S., Prochiantz, A., and Doherty, P. (1996). Inhibition of FGF-stimulated phosphatidylinositol hydrolysis and neurite outgrowth by a cell-membrane permeable phosphopeptide. *Curr.Biol.* 6, 580-587.

Hancock, J. F., Magee, A. I., Childs, J. E., and Marshall, C. J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are ated. *Cell* 57, 1167-1177.

Hoffman, K. B., Larson, J., Bahr, B. A., and Lynch, G. (1998a). Activation of NMDA receptors stimulates extracellular proteolysis of cell adhesion molecules in hippocampus. *Brain Res.* 811, 152-155.

Hoffman, K. B., Martinez, J., and Lynch, G. (1998b). Proteolysis of cell adhesion molecules by serine proteases: a role in long term potentiation? *Brain Res.* 811, 29-33.

Hoffman, K. B., Murray, B. A., Lynch, G., Munirathinam, S., and Bahr, B. A. (2001). Delayed and isoform-specific effect of NMDA exposure on neural cell adhesion molecules in hippocampus. *Neurosci.Res.* 39, 167-173.

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

Hooper, N. M., Karran, E. H., and Turner, A. J. (1997). Membrane protein secretases. *Biochem.J.* 321 (Pt 2), 265-279.

Hope, I. A. and Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46, 885-894.

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

Ibsen, S., Berezin, V., Norgaard-Pedersen, B., and Bock, E. (1983). Quantification of the D2-glycoprotein in amniotic fluid and serum from pregnancies with fetal neural tube defects. *J.Neurochem.* 41, 363-366.

Inuzuka, T., Fujita, N., Sato, S., Baba, H., Nakano, R., Ishiguro, H., and Miyatake, T. (1991). Expression of the large myelin-associated glycoprotein isoform during the development in the mouse peripheral nervous system. *Brain Res.* 562, 173-175.

Iyer, S., Bianchi, R., and Eichberg, J. (2000). Tyrosine phosphorylation of PNS myelin P(0) occurs in the cytoplasmic domain and is maximal during early development. *J.Neurochem.* 75, 347-354.

Jaques, G., Auerbach, B., Pritsch, M., Wolf, M., Madry, N., and Havemann, K. (1993). Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a new tumor marker in small cell lung cancer. *Cancer* 72, 418-425.

Jaramillo, M. L., Afar, D. E., Almazan, G., and Bell, J. C. (1994). Identification of tyrosine 620 as the major phosphorylation site of myelin-associated glycoprotein and its implication in interacting with signaling molecules. *J.Biol.Chem.* 269, 27240-27245.

Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H., Ronnberg, I., and . (1991). Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* 11, 620-627.

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

- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., and Schachner, M. (1990a). Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J.Cell Biol.* 110, 209-218.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., and Schachner, M. (1990b). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J.Cell Biol.* 110, 193-208.
- Kahn, J., Walcheck, B., Migaki, G. I., Jutila, M. A., and Kishimoto, T. K. (1998). Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 92, 809-818.
- Keegan, L., Gill, G., and Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-704.
- Kemler, R. and Ozawa, M. (1989). Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca²⁺-dependent cell adhesion molecule. *Bioessays* 11, 88-91.
- Kirchhoff, F., Hofer, H. W., and Schachner, M. (1993). Myelin-associated glycoprotein is phosphorylated by protein kinase C. *J.Neurosci.Res.* 36, 368-381.
- Kishimoto, T. K., Jutila, M. A., Berg, E. L., and Butcher, E. C. (1989). Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 245, 1238-1241.
- Kolkova, K., Novitskaya, V., Pedersen, N., Berezin, V., and Bock, E. (2000a). 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, 2238-2246.
- Kolkova, K., Pedersen, N., Berezin, V., and Bock, E. (2000b). Identification of an amino acid sequence motif in the cytoplasmic domain of the NCAM-140 kDa isoform essential for its neuritogenic activity. *J.Neurochem.* 75, 1274-1282.

- Kornblihtt, A. R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., and Baralle, F. E. (1985). Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* 4, 1755-1759.
- Krushel, L. A., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., and Crossin, K. L. (1999). NF-kappaB activity is induced by neural cell adhesion molecule binding to neurons and astrocytes. *J.Biol.Chem.* 274, 2432-2439.
- Kursula, P., Tikkanen, G., Lehto, V. P., Nishikimi, M., and Heape, A. M. (1999). Calcium-dependent interaction between the large myelin-associated glycoprotein and S100beta. *J.Neurochem.* 73, 1724-1732.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, C., Watson, J. B., Bloom, F. E., Sutcliffe, J. G., and Milner, R. J. (1987). Neural protein 1B236/myelin-associated glycoprotein (MAG) defines a subgroup of the immunoglobulin superfamily. *Immunol.Rev.* 100, 129-151.
- Lee, M., Brennan, A., Blanchard, A., Zoidl, G., Dong, Z., Tabernero, A., Zoidl, C., Dent, M. A., Jessen, K. R., and Mirsky, R. (1997). P0 is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively. *Mol.Cell. Neurosci.* 8, 336-350.
- Li, C., Tropak, M. B., Gerlai, R., Clapoff, S., Abramow-Newerly, W., Trapp, B., Peterson, A., and Roder, J. (1994). Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature* 369, 747-750.
- Little, E. B., Crossin, K. L., Krushel, L. A., Edelman, G. M., and Cunningham, B. A. (2001). A short segment within the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) is essential for N-CAM-induced NF-kappa B activity in astrocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2238-2243.

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

Ma, J. and Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51, 113-119.

Ma, J. and Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell* 55, 443-446.

Maekawa, S., Sato, C., Kitajima, K., Funatsu, N., Kumanogoh, H., and Sokawa, Y. (1999). Cholesterol-dependent localization of NAP-22 on a neuronal membrane microdomain (raft). *J.Biol.Chem.* 274, 21369-21374.

Martini, R., Bollensen, E., and Schachner, M. (1988). Immunocytochemical localization of the major peripheral nervous system glycoprotein P0 and the L2/HNK-1 and L3 carbohydrate structures in developing and adult mouse sciatic nerve. *Dev.Biol.* 129, 330-338.

Martini, R., Mohajeri, M. H., Kasper, S., Giese, K. P., and Schachner, M. (1995a). Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J.Neurosci.* 15, 4488-4495.

Martini, R. and Schachner, M. (1986). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J.Cell Biol.* 103, 2439-2448.

Martini, R., Zielasek, J., Toyka, K. V., Giese, K. P., and Schachner, M. (1995b). Protein zero (P0)-deficient mice show myelin degeneration in peripheral nerves characteristic of inherited human neuropathies. *Nat.Genet.* 11, 281-286.

McKnight, J. L., Kristie, T. M., and Roizman, B. (1987). Binding of the virion protein mediating alpha gene induction in herpes simplex virus 1-infected cells to its cis site requires cellular proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84, 7061-7065.

- Mohler, K. M., Sleath, P. R., Fitzner, J. N., Cerretti, D. P., Alderson, M., Kerwar, S. S., Torrance, D. S., Otten-Evans, C., Greenstreet, T., Weerawarna, K., and . (1994). Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing. *Nature* 370, 218-220.
- Montag-Sallaz, M., Welzl, H., Kuhl, D., Montag, D., and Schachner, M. (1999). Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. *J.Neurobiol.* 38, 234-246.
- Montag, D., Giese, K. P., Bartsch, U., Martini, R., Lang, Y., Bluthmann, H., Karthigasan, J., Kirschner, D. A., Wintergerst, E. S., Nave, K. A., and . (1994). Mice deficient for the myelin-associated glycoprotein show subtle abnormalities in myelin. *Neuron* 13, 229-246.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G., and Kiss, J. Z. (1996). PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 17, 413-422.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
- Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A. and Schachner, M. (2001). Co-signaling of NCAM via lipid rats and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.*, submitted.
- Norman, J. A., Ansell, J., Stone, G. A., Wennogle, L. P., and Wasley, J. W. (1987). CGS 9343B, a novel, potent, and selective inhibitor of calmodulin activity. *Mol.Pharmacol.* 31, 535-540.
- Nybroe, O., Linnemann, D., and Bock, E. (1989). Heterogeneity of soluble neural cell adhesion molecule. *J.Neurochem.* 53, 1372-1378.
- Ono, K., Tomasiewicz, H., Magnuson, T., and Rutishauser, U. (1994). N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13, 595-609.

Orr, H. T., Lancet, D., Robb, R. J., Lopez de Castro, J. A., and Strominger, J. L. (1979). The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B7 contains an immunoglobulin-like region. *Nature* 282, 266-270.

Owens, G. C. and Boyd, C. J. (1991). Expressing antisense P0 RNA in Schwann cells perturbs myelination. *Development* 112, 639-649.

Owens, G. C. and Bunge, R. P. (1991). Schwann cells infected with a recombinant retrovirus expressing myelin-associated glycoprotein antisense RNA do not form myelin. *Neuron* 7, 565-575.

Pedraza, L., Frey, A. B., Hempstead, B. L., Colman, D. R., and Salzer, J. L. (1991). Differential expression of MAG isoforms during development. *J.Neurosci.Res.* 29, 141-148.

Pedraza, L., Owens, G. C., Green, L. A., and Salzer, J. L. (1990). The myelin-associated glycoproteins: membrane disposition, evidence of a novel disulfide linkage between immunoglobulin-like domains, and posttranslational palmitoylation. *J.Cell Biol.* 111, 2651-2661.

Persohn, E., Pollerberg, G. E., and Schachner, M. (1989). Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J.Comp Neurol.* 288, 92-100.

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

Petitjean, A., Hilger, F., and Tatchell, K. (1990). Comparison of thermosensitive alleles of the CDC25 gene involved in the cAMP metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 124, 797-806.

- Pollerberg, E. G., Sadoul, R., Goridis, C., and Schachner, M. (1985). Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development. *J.Cell Biol.* *101*, 1921-1929.
- Poltorak, M., Sadoul, R., Keilhauer, G., Landa, C., Fahrig, T., and Schachner, M. (1987). Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J.Cell Biol.* *105*, 1893-1899.
- Probstmeier, R., Fahrig, T., Spiess, E., and Schachner, M. (1992). Interactions of the neural cell adhesion molecule and the myelin-associated glycoprotein with collagen type I: involvement in fibrillogenesis. *J.Cell Biol.* *116*, 1063-1070.
- Probstmeier, R., Kuhn, K., and Schachner, M. (1989). Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J.Neurochem.* *53*, 1794-1801.
- Ranheim, T. S., Edelman, G. M., and Cunningham, B. A. (1996). Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* *93*, 4071-4075.
- Rao, Y., Zhao, X., and Siu, C. H. (1994). Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. Evidence for isologous interaction. *J.Biol.Chem.* *269*, 27540-27548.
- Regan, C. M. and Fox, G. B. (1995). Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem.Res.* *20*, 593-598.
- Reichardt, L. F. and Tomaselli, K. J. (1991). Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu.Rev.Neurosci.* *14*, 531-570.
- Rhoads, A. R. and Friedberg, F. (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* *11*, 331-340.

- Rothbard, J. B., Brackenbury, R., Cunningham, B. A., and Edelman, G. M. (1982). Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J.Biol.Chem.* 257, 11064-11069.
- Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238, 491-497.
- Rutishauser, U. (1990). Neural cell adhesion molecule as a regulator of cell-cell interactions. *Adv.Exp.Med.Biol.* 265, 179-183.
- Rutishauser, U., Thiery, J. P., Brackenbury, R., Sela, B. A., and Edelman, G. M. (1976). Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 73, 577-581.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., and Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335, 563-564.
- Salzer, J. L., Holmes, W. P., and Colman, D. R. (1987). The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J.Cell Biol.* 104, 957-965.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- Sanes, J. R. (1989). Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu.Rev.Neurosci.* 12, 491-516.
- Schachner, M. (1991). Cell surface recognition and neuron-glia interactions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 633, 105-112.
- Schachner, M. and Bartsch, U. (2000). Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec- 4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 29, 154-165.
- Schachner, M. and Martini, R. (1995). Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *Trends Neurosci.* 18, 183-191.

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

Schnaar, R. L., Collins, B. E., Wright, L. P., Kiso, M., Tropak, M. B., Roder, J. C., and Crocker, P. R. (1998). Myelin-associated glycoprotein binding to gangliosides. Structural specificity and functional implications. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 845, 92-105.

Schneider-Schaulies, J., von Brunn, A., and Schachner, M. (1990). Recombinant peripheral myelin protein P0 confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties. *J.Neurosci.Res.* 27, 286-297.

Shapiro, L., Doyle, J. P., Hensley, P., Colman, D. R., and Hendrickson, W. A. (1996). Crystal structure of the extracellular domain from P0, the major structural protein of peripheral nerve myelin. *Neuron* 17, 435-449.

Sheppard, A., Wu, J., Rutishauser, U., and Lynch, G. (1991). Proteolytic modification of neural cell adhesion molecule (NCAM) by the intracellular proteinase calpain. *Biochim.Biophys.Acta* 1076, 156-160.

Shy, M. E., Arroyo, E., Sladky, J., Menichella, D., Jiang, H., Xu, W., Kamholz, J., and Scherer, S. S. (1997). Heterozygous P0 knockout mice develop a peripheral neuropathy that resembles chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 56, 811-821.

Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.

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

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

- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- Srinivasan, J., Schachner, M., and Catterall, W. A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, 15753-15757.
- Stahl, N., Harry, J., and Popko, B. (1990). Quantitative analysis of myelin protein gene expression during development in the rat sciatic nerve. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 8, 209-212.
- Stanley, P. and Siminovitch, L. (1977). Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins. *Somatic.Cell Genet.* 3, 391-405.
- Stork, O., Welzl, H., Cremer, H., and Schachner, M. (1997). Increased intermale aggression and neuroendocrine response in mice deficient for the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Eur.J.Neurosci.* 9, 1117-1125.
- Streng, K., Brossmer, R., Ihrig, P., Schauer, R., and Kelm, S. (2001). Fibronectin is a binding partner for the myelin-associated glycoprotein (siglec-4a). *FEBS Lett.* 499, 262-267.
- Streng, K., Schauer, R., and Kelm, S. (1999). Binding partners for the myelin-associated glycoprotein of N2A neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* 444, 59-64.
- Takamatsu, K., Auerbach, B., Gerardy-Schahn, R., Eckhardt, M., Jaques, G., and Madry, N. (1994). Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res.* 54, 2598-2603.
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451-1455.
- Tomasiewicz, H., Ono, K., Yee, D., Thompson, C., Goridis, C., Rutishauser, U., and Magnuson, T. (1993). Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (NCAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 11, 1163-1174.

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

Trapp, B. D., Andrews, S. B., Wong, A., O'Connell, M., and Griffin, J. W. (1989). Co-localization of the myelin-associated glycoprotein and the microfilament components, F-actin and spectrin, in Schwann cells of myelinated nerve fibres. *J.Neurocytol.* 18, 47-60.

Trapp, B. D., Itoyama, Y., Sternberger, N. H., Quarles, R. H., and Webster, H. (1981). Immunocytochemical localization of P0 protein in Golgi complex membranes and myelin of developing rat Schwann cells. *J.Cell Biol.* 90, 1-6.

Tropak, M. B. and Roder, J. C. (1997). Regulation of myelin-associated glycoprotein binding by sialylated cis- ligands. *J.Neurochem.* 68, 1753-1763.

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S., and Rothberg, J. M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403, 623-627.

Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S., and Yamamoto, T. (1994). Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. *Nature* 367, 572-576.

Warner, L. E., Hilz, M. J., Appel, S. H., Killian, J. M., Kolodry, E. H., Karpati, G., Carpenter, S., Watters, G. V., Wheeler, C., Witt, D., Bodell, A., Nelis, E., Van Broeckhoven, C., and Lupski, J. R. (1996). Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot- Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* 17, 451-460.

Wiggins, R. C., Benjamins, J. A., and Morell, P. (1975). Appearance of myelin proteins in rat sciatic nerve during development. *Brain Res.* 89, 99-106.

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

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

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

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

Wolfer, D. P., Mohajeri, H. M., Lipp, H. P., and Schachner, M. (1998). Increased flexibility and selectivity in spatial learning of transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *Eur.J.Neurosci.* 10, 708-717.

Wong, M. H. and Filbin, M. T. (1994). The cytoplasmic domain of the myelin P0 protein influences the adhesive interactions of its extracellular domain. *J.Cell Biol.* 126, 1089-1097.

Wong, M. H. and Filbin, M. T. (1996). Dominant-negative effect on adhesion by myelin Po protein truncated in its cytoplasmic domain. *J.Cell Biol.* 134, 1531-1541.

Xiao, Z. C., Ragsdale, D. S., Malhotra, J. D., Mattei, L. N., Braun, P. E., Schachner, M., and Isom, L. L. (1999). Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J.Biol.Chem.* 274, 26511-26517.

Xiao, Z. C., Taylor, J., Montag, D., Rougon, G., and Schachner, M. (1996). Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions and identification of the domain interacting with the neuronal recognition molecule F3/11. *Eur.J.Neurosci.* 8, 766-782.

Xu, M., Zhao, R., Sui, X., Xu, F., and Zhao, Z. J. (2000). Tyrosine phosphorylation of myelin P(0) and its implication in signal transduction. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 267, 820-825.

Yang, H., Xiao, Z. C., Becker, B., Hillenbrand, R., Rougon, G., and Schachner, M. (1999). Role for myelin-associated glycoprotein as a functional tenascin-R receptor. *J.Neurosci.Res.* 55, 687-701.

Zhang, S. M., Marsh, R., Ratner, N., and Brackenbury, R. (1995). Myelin glycoprotein P0 is expressed at early stages of chicken and rat embryogenesis. *J.Neurosci.Res.* 40, 241-250.

IX Anhang

1 Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz (5'-3')	Enzym
1	pGAD10s	TAC CAC TAC AAT GGA TGA	
2	pGAD10as	TGC ACA GTT GAA GTG AAC TT	
3	pAS2-1-s	TCA TCG GAA GAG AGT AG	
4	pAS2-1-as	TAC CAC TAC AAT GGA TG	
5	pAS-MAG-up	GA TGT CGA <i>CAT ATG</i> CAG ACG AGA AGA AAA AAG AAT G	NdeI
6	pAS-L-MAG-dn	GTT <i>GGA TCC</i> ACA GGG CCA GCC CCC AGC G	BamHI
7	pAS-S-MAG-dn	GTT <i>GGA TCC</i> TCT CAG ATC CCA GGC GCT GC	BamHI
8	pAS-P0-up	GT TGT CGA <i>CAT ATG</i> ATC CGG TAC TGC TGG CTG CG	NdeI
9	pAS-P0-dn	GTT <i>GGA TCC</i> TTT GGA AGA CTC CAT CGC	BamHI
10	RRS-MAG-BamHI-up	AGA CCC <i>GGG ATC</i> CAG ACA AGA AGA AAA	BamHI
11	RRS-L-MAG-BamHI-dn	CAG AAT TCG <i>GAT CCA</i> GCT TCC TCA CTT	BamHI
12	RRS-NCAM-NT-up	ATT CCC <i>GGG ATC</i> CTT GAC ATC ACC TGC TAC	BamHI
12a	RRS-NCAM Δ Cys-up	ATT CCC <i>GGG ATC</i> CTT GAC ATC ACC TCC TAC	BamHI
13	RRS-NCAM-INT-up	ATG CCC <i>GGG ATC</i> CTT AAA GAC ATG GAG GAG	BamHI
14	RRS-NCAM-Stop-dn	GCG AAT TCG <i>GAT CCG</i> TCA TGC TTT GCT CTC	BamHI
15	RRS-CaM-Xho-up	ACT GGG <i>ACT CGA</i> GAA ATG GCT GAT CAG CTG ACT	XhoI
16	RRS-CaM-Stop-Xho-dn	GCC CCG <i>CTC GAG</i> TCA TTT TGC AGT CAT CAT	XhoI
17	pYes-s	ATG GGG AGT AGC AAG AGC AAG	
18	pYes-as	ACA TGA TGC GGC CCT CTA GAT GCA	
19	pADH-Ras-s	GTG CGT GAG ATC CGG CAG	
20	pADH-Ras-as	AAA CGA CGG CCA GTG AAT TCG A	

2 Datenbankeinträge

Name	Organismus	Accession Number
NCAM120	Maus	Y00051
NCAM140	Ratte	X06564
NCAM180	Ratte	Kein Eintrag
L-MAG	Ratte	X05301
S-MAG	Ratte	X06554
P0	Ratte	K03242
Calmodulin	Maus	NM009790

3 Plasmide

Die zur Amplifikation in der PCR verwendeten Primer werden entsprechend der Numerierung in Abschnitt IX 2 zitiert.

3.1 Yeast two-hybrid Konstrukte

Die Herstellung der Ködervektoren pAS2-L-MAG-IC und pAS2-S-MAG-IC erfolgte durch PCR an den cDNS-Klonen 1B236-18 (L-MAG) und 1B236-20 (S-MAG) (Lai et al., 1987) mit den Primerkombinationen 5+6 bzw. 5+7 und anschließende Insertion der 310 bp bzw. 195 bp großen Fragmente in das Plasmid pAS2-1 via *NdeI/BamHI* (Abbildung 18). Die P0-IC-DNS wurde durch Amplifikation am cDNS-Klon K03242 mit den Primern 8+9 dargestellt. Das 210 bp große PCR-Produkt wurde nach *NdeI/BamHI*-Verdau in den pAS2-1-Vektor insertiert (Abbildung 18).

Die Überprüfung des richtigen Einbaus der DNS-Fragmente in den pAS2-1-Vektor erfolgte mit den Primern 3+4 und die Sequenzierung von pGAD10-Konstrukten mit den Primern 1+2.

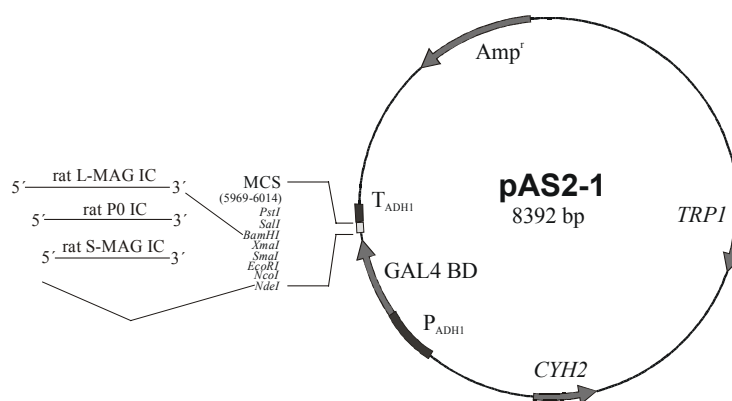


Abbildung 18: Plasmidkarte der Ködervektoren für das konventionelle Yeast two-hybrid System.

Die cDNS der intrazellulären Domänen von S-, L-MAG und P0 wurden via *NdeI* und *BamHI* in pAS2-1 insertiert.

3.2 Ras Recruitment Konstrukte

Die RRS-Vektoren wurden mit Ausnahme des pMyr-Vektors, in den die cDNS-Bank inseriert war, von Dr. A. Aronheim (Israel Institute of Technology, Haifa, Israel) zur Verfügung gestellt. Zur Sequenzierung der pADH-Köderkonstrukte wurden die Primer 19+20, zur Überprüfung der pYes- und pMyr-Beutekonstrukte die Primer 17+18 benutzt. Als „*template*“ für die Herstellung der NCAM-PCR-Fragmente dienten die pcDNA3-Konstrukte der einzelnen Isoformen (IX 4.3). Für das pADH-NCAM140ICΔCys-Konstrukt diente ein mutiertes pcDNA3-NCAM-Konstrukt als „*template*“, welches Dr. M. Delling zur Verfügung stellte. Die PCR-Produkte wurden mit *Bam*HI geschnitten und in den *Bam*HI-geöffneten pADH-Ras(61)-Ködervektor ligiert. Die Primerkombinationen und die Länge der resultierenden DNS-Amplifikate ist in Tabelle 1 gelistet.

Der pADH-L-MAG-IC-Köder wurde durch PCR an pAS2-L-MAG-IC mit der Primerkombination 10+11 und anschließende Insertion der *Bam*HI-verdauten DNS in den *Bam*HI-geöffneten pADH-Ras(61)-Vektor hergestellt.

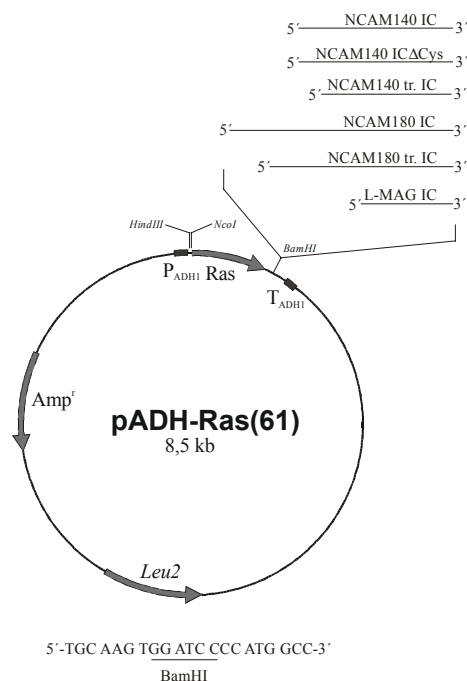


Abbildung 19: Plasmidkarte der Ködervektoren für das RRS. Die PCR-Produkte der intrazellulären Domänen wurde in den BamHI-geöffneten pADH-Ras(61)-Vektor inseriert.

Köderkonstrukt	Primerkombination	Insertlänge
pADH-NCAM140IC	12+14	363 bp
pADH-NCAM140ICΔCys	12a+14	363 bp
pADH-NCAM180IC	12+14	1.173 bp
pADH-NCAM140IC-tr.	13+14	270 bp
pADH-NCAM180IC-tr.	13+14	1.080 bp

Tabelle 1: Darstellung der RRS-NCAM-Köderkonstrukte. Die NCAM-Konstrukte wurden durch Insertion der mit den angegebenen Primern erhaltenen PCR-Produkte dargestellt.

Das pYes(Trp)-mGAP-Konstrukt wurde von A. Aronheim bezogen. Es existiert keine Plasmidkarte. Seine Darstellung ist in der Literatur nur knapp beschrieben (Aronheim, 1997).

Eine PCR mit den Calmodulin-spezifischen Primern 15+16 an einer cDNS-Genbank als „template“ lieferte die 450 bp große Calmodulin-cDNS, welche nach *XhoI*-Verdau in den *XhoI*-geöffneten pYesΔPolyA-Vektor ligiert wurde.

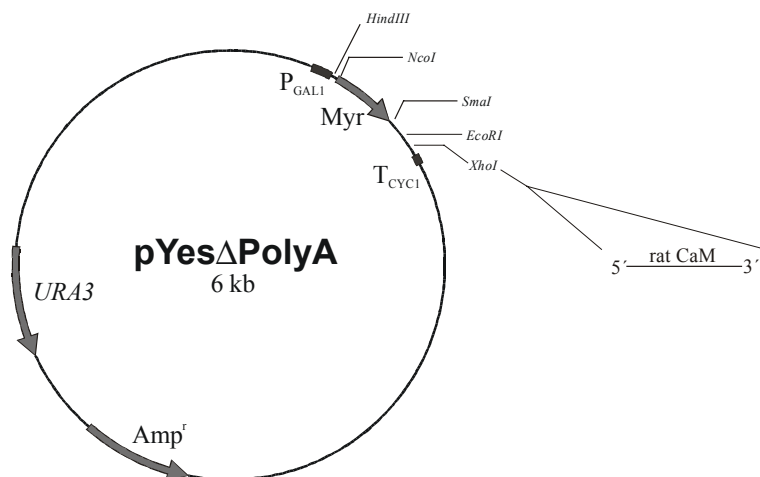


Abbildung 20: Plasmidkarte des pYes-CaM-Konstruktes. Die Insertion der Calmodulin-DNS erfolgte über *XhoI*.

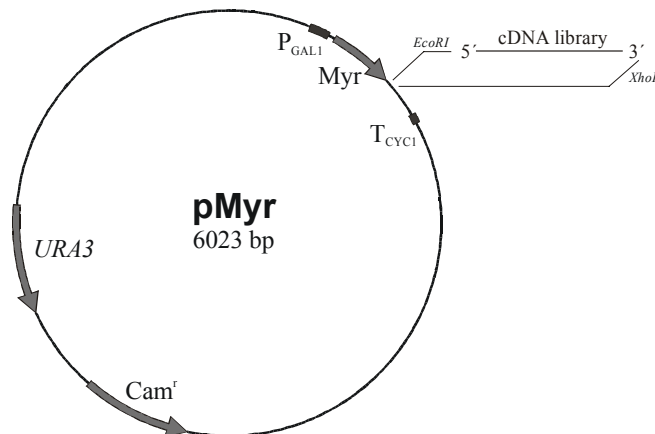


Abbildung 21: Plasmidkarte des pMyr-Beutevektors. Die cDNS-Bank im pMyr-Plasmid wurde von Stratagene bezogen. Die cDNS war über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den pMyr-Vektor ligiert.

3.3 Expressionskonstrukte

pcDNA3-NCAM140 und pcDNA3-NCAM180 wurden freundlicherweise von Dr. P. Maness (University of South Carolina, USA) zur Verfügung gestellt. Das pcDNA3-NCAM120-Konstrukt wurde durch Ausschneiden der NCAM120-DNS aus pMV7-N1 (erhalten von Dr. E. Bock, University of Copenhagen, Denmark) mit *EcoRI* und anschließende Ligation in den *EcoRI*-linearisierten pcDNA3-Vektor hergestellt.

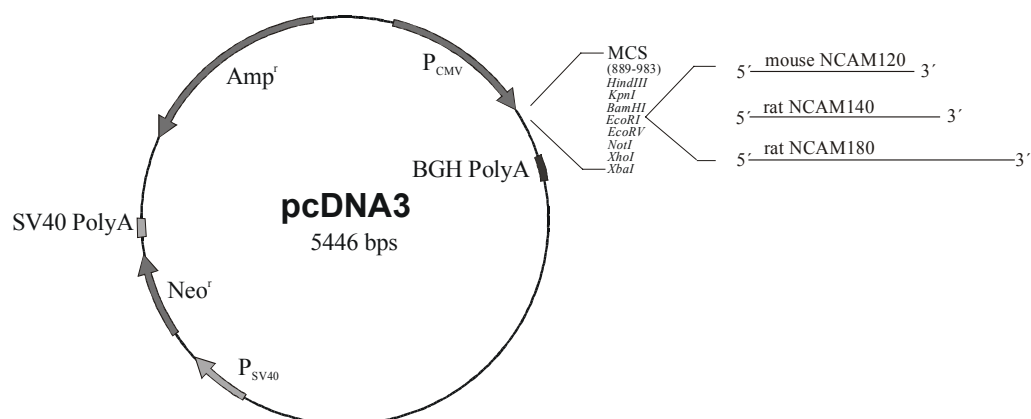


Abbildung 22: Plasmidkarte der pcDNA3-Expressionskonstrukte von NCAM. Die Herkunft der Konstrukte ist im Text beschrieben.

Zur Expression der intrazellulären Domänen von NCAM wurden die Vektoren pQE30 (Qiagen) und pET28a (Novagen) benutzt. Die Konstrukte wurden von Dr. M. Delling hergestellt. Alle DNS-Insertionen erfolgten über *Bam*HI.

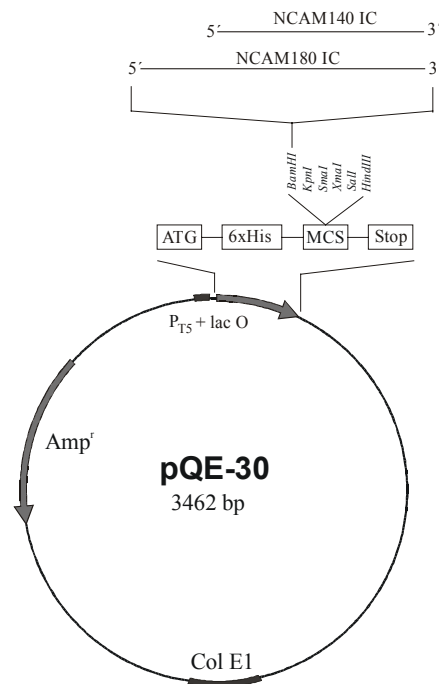


Abbildung 23: Plasmidkarte der pQE-Expressionskonstrukte von NCAM. Zur Expression und Aufreinigung der intrazellulären Domänen von NCAM wurden pQE-30-NCAM-Konstrukte hergestellt.

Vier Cysteinreste innerhalb der intrazellulären Domäne von NCAM können palmitoyliert werden und diese Modifikation führt *in vivo* zur Verankerung in der Plasmamembran. Um diese Verankerung bzw. die Bildung von inter- und intramolekularen S-S-Brücken bei verschiedenen Versuchsansätzen zu verhindern, waren im NCAM140ICΔ3×Cys-Konstrukt drei dieser Cysteinreste zu Serinresten mutiert worden. Der vierte, nahe der Membran lokalisierte Cysteinrest wurde mit dem Ziel, das aufgereinigte Oligopeptid im Biacoresystem über dieses Cystein zu immobilisieren, nicht ausgetauscht worden.

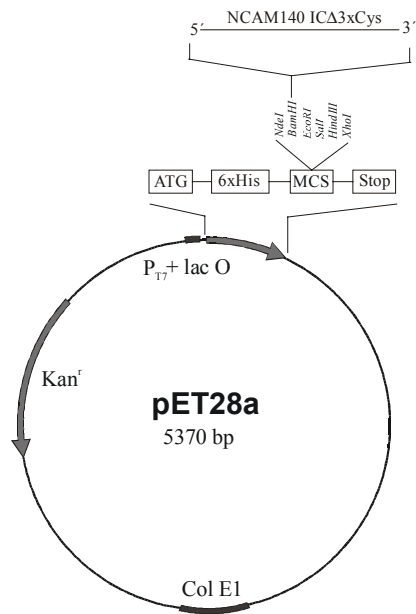


Abbildung 24: Plasmidkarte von pET28a-NCAM140ICD3xCys. Zur Expression und Aufreinigung der intrazellulären Domäne von NCAM140 wurde der pET28a-Expressionsvektor benutzt.

4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Ulrich Bormann, geb. Reimer
Geburtsdatum	23.08.1969
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	verheiratet

Ausbildung

1975 - 1979	Volksschule Stockflethweg (Hamburg)
1979 - 1988	Gymnasium Heidberg (Hamburg)
1989 - 1990	Grundwehrdienst

Akademischer Werdegang

April 1990 - Okt. 1996	Chemiestudium an der Universität Hamburg
Okt. 1996 - Juli 1997	Diplomarbeit in Kooperation mit der Forschungs- abteilung des Krankenhauses Großhansdorf
Dez. 1997 - Sept. 2001	Promotion am Zentrum für Molekulare Neuro- biologie im Institut von Prof. Dr. M. Schachner
Okt. 1998 - Okt. 2000	Aufbaustudium Molekularbiologie an der Universität Hamburg

Abschlüsse

Juni 1988	Allgemeine Hochschulreife
März 1993	Diplomvorprüfung für Studierende der Chemie, Note „gut“
Aug. 1996	Diplomprüfung am Fachbereich Chemie, Hamburg, Note „sehr gut“
Juli 1997	Abgabe der Diplomarbeit, Note „sehr gut“
Nov. 2000	Abschlußprüfung Aufbaustudium Molekularbiologie, Note „sehr gut“

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. M. Schachner möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die nette Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. G. Gercken danke ich für die freundliche Begleitung der externen Promotion und die Begutachtung dieser Doktorarbeit.

Besonderer Dank gebührt meinem Laborkollegen Markus Delling, der mit seinen konstruktiven Ideen und Vorschlägen die Richtung dieser Arbeit entscheidend mitgeprägt hat.

Allen Kolleginnen und Kollegen, deren namentliche Erwähnung den Platz dieser Seite sprengen würde, danke ich für die tolle Atmosphäre, die den manchmal beschwerlichen Weg zum Titel bedeutend erleichterte.

Dank gilt ebenso Ralf Kleene für das Korrekturlesen der Arbeit und seinen Beistand in der Endphase der Dissertation.

Christian Schulze gebührt Dank für die Anfertigung der Biacore-Analysen.

Vladimir Sytnyk sowie Galina und Alexander Dityatev möchte ich für die Durchführung der Versuche an hippocampalen Primärneuronen danken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei den vielen guten Freunden, die mit mir durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit gegangen sind und mir Mut und Dampf gemacht haben.

Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für ihre zurückhaltende Geduld auf dem Weg zum Dokortitel.

Der größte Dank aber gilt meiner Frau Sabine, die mit ihrer verständnisvollen, aber auch unnachahmlich direkten Art eine großartige Unterstützung während der gesamten Promotionsphase war.

Erklärung

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

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

Hamburg, den 15. Oktober 2001

Ulrich Bormann