

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 mRNA des 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.