

Aus dem Institut für die Biosynthese Neuraler Strukturen  
des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg  
Institutsleiterin Professor Dr. Melitta Schachner

---

# **Funktionelle Analysen der humanen neuronalen Zellerkennungsmoleküle L1 und CHL1**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem  
Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**Christian Bernreuther**

aus Borås/Schweden

Hamburg, 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Sprecher:

Referent:

Korreferent:

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>A. Einleitung</b>                                                                               | 1  |
| 1. Vorbemerkungen                                                                                  | 1  |
| 2. Neuritenwachstum beeinflussende Faktoren                                                        | 1  |
| 2.1. Lösliche Wachstumsfaktoren                                                                    | 2  |
| 2.2. Moleküle der extrazellulären Matrix                                                           | 2  |
| 2.3. Moleküle der Zelloberfläche                                                                   | 3  |
| 2.3.1. Cadherine                                                                                   | 4  |
| 2.3.2. Integrine                                                                                   | 4  |
| 3. Die Ig-Superfamilie                                                                             | 5  |
| 3.1. Die NCAM-Familie                                                                              | 7  |
| 3.2. Die DCC-Familie                                                                               | 8  |
| 4. Die L1-Familie                                                                                  | 8  |
| 4.1. Struktur und Expressionsmuster                                                                | 8  |
| 4.2. Interaktionsmuster und Signaltransduktion                                                     | 10 |
| 5. CHL1 und dessen humanes Ortholog CALL                                                           | 12 |
| 6. Die Rolle von Molekülen der L1-Familie in Krankheit und bei der Regeneration                    | 13 |
| 7. Zielsetzung                                                                                     | 14 |
| <b>B. Material und Methoden</b>                                                                    | 15 |
| 1. Plasmide                                                                                        | 15 |
| 2. Bakterienstämme                                                                                 | 16 |
| 3. Eukaryontische Zelllinien                                                                       | 16 |
| 4. Medien, Zusätze, Puffer, Lösungen, Oligonukleotide                                              | 16 |
| 4.1. Medien                                                                                        | 16 |
| 4.1.1. Nährmedien und Zusätze für die Bakterienzellkultur                                          | 16 |
| 4.1.2. Nährmedien und Zusätze für die eukaryontische Zellkultur                                    | 17 |
| 4.2. Puffer und Lösungen                                                                           | 19 |
| 4.2.1. Puffer und Lösungen für die Behandlung von DNA                                              | 19 |
| 4.2.2. Puffer und Lösungen für Agarosegele                                                         | 19 |
| 4.2.3. Puffer und Lösungen für Zellkultur, Transfektion und Proteinaufreinigung                    | 19 |
| 4.2.4. Puffer, Lösungen und Zusammensetzung der Gele für die<br>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 20 |
| 4.2.5. Lösungen für Proteinfärbungen                                                               | 21 |

---

|           |                                                                                                   |           |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.6.    | Puffer und Lösungen für 2-D Gelelektrophorese und Western Blot.....                               | 22        |
| 4.2.7     | Puffer für die Herstellung von Hirnhomogenat der Maus.....                                        | 23        |
| 4.3.      | Oligonukleotide.....                                                                              | 24        |
| <b>5.</b> | <b>Chemikalien, Enzyme und Materialien.....</b>                                                   | <b>24</b> |
| <b>6.</b> | <b>Mikrobiologische Methoden.....</b>                                                             | <b>26</b> |
| 6.1.      | Bakterienanzucht.....                                                                             | 26        |
| 6.2.      | Messung der optischen Dichte.....                                                                 | 26        |
| <b>7.</b> | <b>DNA-Techniken.....</b>                                                                         | <b>26</b> |
| 7.1.      | Isolierung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA.....                                | 26        |
| 7.1.1.    | Plasmid-Isolierung mit Qiagen-Säulen.....                                                         | 26        |
| 7.1.2.    | Ethanolfällung von DNA.....                                                                       | 26        |
| 7.1.3.    | Reinigung von DNA durch Phenolextraktion.....                                                     | 27        |
| 7.1.4.    | DNA-Aufreinigung mit dem PCR-Purification Kit.....                                                | 27        |
| 7.1.5.    | Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick-Gel-Extraction Kit.....                            | 27        |
| 7.1.6.    | Konzentrationsbestimmung von DNA.....                                                             | 27        |
| 7.2.      | Klonierungstechniken.....                                                                         | 28        |
| 7.2.1.    | Restriktionsspaltung.....                                                                         | 28        |
| 7.2.2.    | Agarosegelelektrophorese.....                                                                     | 28        |
| 7.2.3.    | Auswertung der Agarosegelelektrophorese.....                                                      | 29        |
| 7.2.4.    | Behandlung mit der alkalischen Phosphatase CIP.....                                               | 29        |
| 7.2.5.    | Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase.....                                            | 29        |
| 7.2.6.    | Transformation.....                                                                               | 30        |
| 7.2.7.    | Sequenzierung von DNA.....                                                                        | 31        |
| 7.2.8.    | Die Polymerase-Kettenreaktion.....                                                                | 31        |
| <b>8.</b> | <b>Techniken der eukaryontischen Zellkultur.....</b>                                              | <b>32</b> |
| 8.1.      | Vorbemerkungen.....                                                                               | 32        |
| 8.2.      | Passagieren von Zellen.....                                                                       | 33        |
| 8.3.      | Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur.....                                                  | 33        |
| <b>9.</b> | <b>Stabile Calciumphosphattransfektion und Produktion von Proteinen in<br/>CHO-K1-Zellen.....</b> | <b>34</b> |
| 9.1.      | Vorbemerkungen.....                                                                               | 34        |
| 9.2.      | Transfektion.....                                                                                 | 34        |
| 9.3.      | Selektion stabiler Klone mit dem Glutamin-Synthetase-Amplifikations-System.....                   | 35        |
| 9.4.      | Produktion von Proteinen in CHO-K1-Zellen.....                                                    | 36        |

|                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>10. Techniken der Proteinbiochemie.....</b>                                                       | <b>37</b> |
| 10.1. Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-System.....                                    | 37        |
| 10.2. Aceton-Fällung.....                                                                            | 37        |
| 10.3. Aufreinigung von F <sub>c</sub> -gekoppelten Fusionsproteinen mit Protein A.....               | 37        |
| 10.3.1. Vorbemerkungen.....                                                                          | 37        |
| 10.3.2. Präzipitation von F <sub>c</sub> -enthaltenden Fusionsproteinen mit Protein A-Sepharose..... | 38        |
| 10.3.3. Aufreinigung größerer Mengen von Überstand mit Protein A-Sepharose.....                      | 38        |
| 10.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....                                                       | 39        |
| 10.4.1. Vorbemerkungen.....                                                                          | 39        |
| 10.4.2. Durchführung.....                                                                            | 39        |
| 10.5. Anfärbung von Polyacrylamidgelen.....                                                          | 40        |
| 10.5.1. Coomassiefärbung.....                                                                        | 40        |
| 10.5.2. Silberfärbung.....                                                                           | 40        |
| 10.6. Western Blot.....                                                                              | 41        |
| 10.6.1. Vorbemerkungen.....                                                                          | 41        |
| 10.6.2. Durchführung.....                                                                            | 41        |
| 10.7. Präparation von Hirnhomogenat.....                                                             | 42        |
| <b>11. Primärzellkultur von Körnerzellen aus dem Cerebellum der Maus.....</b>                        | <b>43</b> |
| 11.1. Vorbemerkungen.....                                                                            | 43        |
| 11.2. Beschichtung von Coverslips und 96-well-plates.....                                            | 43        |
| 11.3. Präparation von Körnerzellen aus dem Cerebellum der Maus.....                                  | 43        |
| 11.4. Bestimmung des Neuritenwachstums nach .....                                                    | 44        |
| <b>12. 2-D-gelelektrophoretische Auftrennung von Zellysaten stimulierter N2A-Zellen.....</b>         | <b>45</b> |
| 12.1. Vorbemerkungen.....                                                                            | 45        |
| 12.2. Kultivierung der N2A-Zellen.....                                                               | 46        |
| 12.3. Stimulation und Lyse der Zellen.....                                                           | 46        |
| 12.4. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension).....                                                | 46        |
| 12.5. SDS-PAGE (2. Dimension).....                                                                   | 47        |
| 12.6. Western Blot.....                                                                              | 47        |
| <b>C. Ergebnisse.....</b>                                                                            | <b>48</b> |
| <b>1. Konstruktion des für das Fusionsprotein hCHL1-Fc kodierenden Plasmids.....</b>                 | <b>48</b> |
| 1.1. Ausgangslage und Ziel.....                                                                      | 48        |
| 1.2. Klonierungsstrategie.....                                                                       | 48        |

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2. Produktion des Fusionsproteins in CHO-K1-Zellen.....</b>                                        | <b>52</b> |
| 2.1. Vorbemerkungen.....                                                                              | 52        |
| 2.2. Charakterisierung des gereinigten Fusionsproteins.....                                           | 53        |
| 2.2.1. Nachweis des aufgereinigten Fusionsproteins hCHL1-Fc durch SDS-PAGE.....                       | 53        |
| 2.2.2. Nachweis des Fusionsproteins hCHL1-Fc im Westernblot.....                                      | 54        |
| <b>3. Neuritenwachstumsexperimente.....</b>                                                           | <b>55</b> |
| 3.1. Vorbemerkungen.....                                                                              | 55        |
| 3.2. Ergebnisse.....                                                                                  | 56        |
| 3.2.1. Der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum.....                                         | 56        |
| 3.2.2. Konzentrationsabhängigkeit der hCHL1-Fc vermittelten Stimulation des<br>Neuritenwachstums..... | 60        |
| 3.3.3. Vergleich der Wirksamkeit von hCHL1-Fc in löslicher und beschichteter Form....                 | 61        |
| 3.3.4. Vergleich der Wirksamkeit von hCHL1-Fc mit der Wirksamkeit anderer<br>Moleküle.....            | 62        |
| <b>4. Ergebnisse der Stimulation von N2A-Zellen mit Ak 557.B6.....</b>                                | <b>63</b> |
| 4.1. Vorbemerkungen.....                                                                              | 63        |
| 4.2. Ergebnisse.....                                                                                  | 63        |
| <b>D. Diskussion.....</b>                                                                             | <b>65</b> |
| 1. Stimulation des Neuritenwachstums durch hCHL1-Fc.....                                              | 65        |
| 2. Untersuchung der Signaltransduktion von L1 mit der<br>2-D Polyacrylamidgelelektrophorese.....      | 71        |
| <b>E. Zusammenfassung.....</b>                                                                        | <b>74</b> |
| <b>F. Literatur.....</b>                                                                              | <b>75</b> |
| <b>G. Danksagung.....</b>                                                                             | <b>86</b> |
| <b>H. Lebenslauf.....</b>                                                                             | <b>87</b> |
| <b>I. Erklärung.....</b>                                                                              | <b>88</b> |

## **A. Einleitung**

### **1. Vorbemerkungen**

Das zentrale Nervensystem (ZNS) von Säugetieren enthält mehr als  $10^{12}$  Neurone, die untereinander eine Vielzahl synaptischer Verbindungen eingehen. Während ein Motoneuron des Rückenmarks ungefähr 10.000 Kontakte ausbildet, empfangen die Purkinje-Zellen des Kleinhirns rund 150.000 Verknüpfungen verschiedenster Nervenzellen. Eine der größten Herausforderungen in der Neurobiologie ist das Verständnis der molekularen Mechanismen, die zielgerichtetes neuronales Wachstum und die Entwicklung spezifischer synaptischer Verbindungen im zentralen und peripheren Nervensystem (PNS) ermöglichen. Diese hohe Spezifität beruht sowohl auf Aktivitäts-abhängigen Veränderungen synaptischer Verbindungen, die mit funktionellen Änderungen neuronaler Schaltkreise zu korrelieren scheinen, von denen angenommen wird, daß sie durch mit der kognitiven Funktion des Gehirns verbundene Mechanismen bewirkt werden (Schubert, 1991), als auch auf Aktivitäts-unabhängigen Mechanismen. Dabei kommt während der Entwicklung, aber auch im gereiften Nervensystem im Rahmen von Regeneration und Lernen der Zellerkennung und -kommunikation höchste Bedeutung zu. Neurone bilden während der Differenzierung Axone und Dendriten aus und gehen über diese synaptische Verbindungen mit anderen Neuronen, Zellen sensorischer Organe und Muskelzellen ein, wobei die Interaktion mit verschiedenen Gliazellen für das Überleben und die Funktion der Neuronen von ebenso großer Bedeutung ist. An diesen Interaktionen sind verschiedene Faktoren beteiligt, die sich gut am Beispiel des Wachstumskegels verdeutlichen lassen.

### **2. Neuritenwachstum beeinflussende Faktoren**

Der Wachstumskegel ist eine hochspezialisierte Struktur an der Spitze eines elongierten Axons, die dafür verantwortlich ist, das Axon an sein Ziel zu führen, um die richtige synaptische Verbindung zu etablieren. Er besteht aus beweglichen, fingerförmigen Filopodien mit sich zwischen ihnen spannenden, ebenfalls beweglichen Lamellipodien. Mit diesen Strukturen tastet der Wachstumskegel während des Auswachsens permanent die Umgebung ab, reagiert dabei auf unterschiedliche Signale und bestimmt so Richtung und Geschwindigkeit des Neuritenwachstums. Dafür exprimiert der Wachstumskegel Rezeptoren für die Moleküle der näheren und weiteren Umgebung, die über Ligand/Rezeptor-Interaktionen, durch Interaktionen mit dem Zytoskelett oder verschiedene Formen der Signaltransduktion dessen Motilität beeinflussen. Die das Neuritenwachstum beeinflussenden Moleküle sind dabei entweder löslich oder unlöslich und wachstumsfördernd oder –hemmend, wobei dasselbe Molekül unter verschiedenen Bedingungen,

abhängig z.B. vom Bindungspartner, wachstumsfördernd oder –hemmend wirken kann und verschiedene Moleküle sowohl in löslicher, als auch in unlöslicher Form wirken.

Diese das axonale Wachstum beeinflussenden Moleküle lassen sich in drei Hauptgruppen einteilen:

1. lösliche trophische Faktoren und chemotrope Moleküle, die über größere Distanzen einen Einfluß auf den Wachstumskegel ausüben bzw. axonales Wachstum permissiv erst ermöglichen oder als Apoptosefaktoren über den programmierten Zelltod regulierend auf verschiedene Prozesse wirken bzw. die Apoptose verhindern.

2. Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Laminin, Fibronectin, Tenascin, Restrictin, Kollagen und Thrombospondin, die ebenfalls fördernd oder hemmend auf das Neuritenwachstum einwirken.

3. Moleküle der Zelloberfläche

Im folgenden wird kurz auf lösliche Moleküle und die extrazelluläre Matrix eingegangen, bevor die für diese Arbeit wichtigen Moleküle der Zelloberfläche beschrieben werden.

### **2.1. Lösliche Wachstumsfaktoren**

Nerve Growth Factor (NGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-3 und andere Moleküle bilden die Gruppe der Neurotrophine (Maisonpierre et al., 1990). Obwohl Versuche in vitro zeigten, daß Axone von Spinalganglienzellen in Richtung eines NGF-Gradienten wachsen (Gundersen und Barrett, 1980), scheint die eigentliche Funktion der löslichen Wachstumsfaktoren nicht die Initiation und Stimulation axonalen Wachstums zu sein, sondern eher die Förderung der Zelldifferenzierung und die Verhinderung der Apoptose (Vogel und Davis, 1991). Moleküle dieser Gruppe vermitteln ihre Signaltransduktion zumindest zum Teil über Rezeptoren der trk-Rezeptorfamilie, d.h. über Moleküle mit zytoplasmatischer Tyrosinkinase-Domäne (Raffioni et al., 1993).

### **2.2. Moleküle der extrazellulären Matrix**

Die Moleküle der extrazellulären Matrix wie Laminin, Fibronectin, Tenascin, Restrictin, Kollagene, Proteoglykane, Phosphacan und Neurocan haben zum einen strukturbildende Aufgaben, indem sie Teil eines unlöslichen Gerüsts bilden, zum anderen übernehmen sie verschiedenste Funktionen in der Vermittlung zielgerichteten Neuritenwachstums in Entwicklung und Regeneration (Juliano und Haskill, 1993) und sind an der wichtigen Interaktion zwischen Neuronen und Glia in ZNS und PNS beteiligt.

Auf Laminin, einem Molekül von kreuzförmiger Struktur, das aus drei Polypeptidketten besteht, und Fibronectin wurden verschiedene funktionelle Domänen für Zelladhäsion und

Neuritenwachstum identifiziert, für Fibronectin z.B. in der 10. FNIII-Domäne das RGD-Motiv, das an der Zelladhäsion beteiligt ist (Pierschbacher und Ruoslahti, 1984), für Laminin die E8-Domäne (Graf et al., 1987) sowie drei spezifische Domänen für die Stimulation des Neuritenwachstums (Liesei, 1991). Laminin ist außerdem an der Formation synaptischer Verbindungen beteiligt und wird im synaptischen Spalt gefunden (Nakic et al., 1996). Es ist eines der in vitro am stärksten Neuritenwachstum stimulierenden Moleküle. Rezeptoren für Laminin und Fibronectin, die deren Signale weiterleiten, sind die weiter unten beschriebenen Integrine.

Restrictin und Tenascin sind zwei verwandte Moleküle der extrazellulären Matrix, die aus vier verschiedenen strukturellen Einheiten aufgebaut sind. In verschiedenen Versuchen wurde gezeigt, daß beide Proteine sowohl adhäsive, als auch repulsive Wirkungen auf primäre Neuronen haben können (Pesheva et al., 1993; Spring et al., 1989). Für Tenascin konnte eine Stimulation des Neuritenwachstums nachgewiesen werden (Wehrle-Haller und Chiquet, 1993). Andererseits wurde eine verringerte Expression von Tenascin an Stellen gefunden, an denen sich Nervenäste verzweigen (Martini und Schachner, 1991). Beide Moleküle interagieren mit Molekülen der Zelloberfläche. Sowohl für Restrictin (Brümmendorf et al., 1993), als auch für Tenascin-R (Rathjen et al., 1991) wurde eine Interaktion mit F3/F11/Contactin, einem Mitglied der L1 Familie von Zelladhäsionsmolekülen, nachgewiesen.

Heparin-bindende Proteoglykane der extrazellulären Matrix können mit zahlreichen anderen Heparin-bindenden Molekülen wie Zellerkennungsmolekülen, Zelloberflächenenzymen und Wachstumsfaktoren interagieren und deren Bindung an Rezeptoren als Corezeptoren vermitteln und so an der Signaltransduktion beteiligt sein (Klagsbrun und Baird, 1991). Die beiden extrazellulären Proteoglykane des Gehirns, Phosphacan und Neurocan, binden an neuronales NCAM und NgCAM, zwei Moleküle aus der Ig-Superfamilie (Friedländer et al., 1994; Milev et al., 1994).

Moleküle der extrazellulären Matrix übernehmen also vielfältige Aufgaben in der Formation und Aufrechterhaltung des Nervensystems, leiten Neuritenwachstum, interagieren mit Molekülen der Zelloberfläche und vermitteln intrazelluläre Signaltransduktion.

### **2.3. Moleküle der Zelloberfläche (Zelladhäsionsmoleküle)**

Im Nervensystem unterscheidet man folgende Hauptklassen von Molekülen der Zelloberfläche:

1. Cadherine
2. Integrine
3. Moleküle der Immunglobulin (Ig-) Superfamilie

Zelladhäsionsmoleküle übernehmen vielfältige Funktionen in der Entwicklung des Nervensystems, die über Interaktionen mit Molekülen der extrazellulären Matrix, löslichen Faktoren und Molekülen an der Oberfläche anderer Zellen vermittelt werden. Dabei werden die Zelladhäsionsmoleküle in verschiedenen zeitlichen und örtlichen Mustern exprimiert und beeinflussen über Neuritenwachstum, Zellmigration, -überleben und Synapsenformation die Entwicklung des reifen Nervensystems.

### **2.3.1 Cadherine**

Die Cadherine gehören zu den Molekülen der Zelloberfläche, die Neuritenwachstum stimulieren. Diese schon in frühen Experimenten zu gewebsspezifischer Zellseparation gefundenen Moleküle sind durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Mechanismus der Zelladhäsion und eine Trypsinresistenz in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  definiert und wurden ursprünglich nach ihrer vorherrschenden geweblichen Expression in E-Cadherine (Epithel), P-Cadherine (Placenta) und die im Nervensystem am häufigsten exprimierten N-Cadherine eingeteilt, später kamen T-Cadherine und R-Cadherine (Retina) hinzu (Takeichi, 1990). Mit Ausnahme des T-Cadherins, das über Glykosylphosphatidylinositol in der Membran verankert ist, sind Cadherine transmembranöse Glykoproteine, die ein Molekulargewicht zwischen 120 und 140 kD haben, fünf Cadherinspezifische extrazelluläre Wiederholsequenzen (EC-1 bis EC-5) besitzen und eine ausgesprochene Übereinstimmung in der kurzen zytosolischen Domäne zeigen, über die sie mit Cateninen interagieren, welche sowohl mit den Actinfilamenten in Verbindung stehen, als auch die Signaltransduktion vermitteln (Gumbiner, 1993). Die adhäsive Funktion wird bei N-Cadherin über die HAV-Sequenz vermittelt, die sich in der EC-1-Domäne befindet. Cadherine werden während der Entwicklung unterschiedlich stark exprimiert und sind mit ihrer adhäsiven Funktion an Gewebseparation, Morphogenese und Aufrechterhaltung der Gewebsstruktur beteiligt. Für N-Cadherin konnte eine Stimulation des Neuritenwachstums gezeigt werden, während Antikörper gegen N-Cadherin hemmenden Einfluß hatten (Bixby und Zhang, 1990).

### **2.3.2 Integrine**

Die heterodimeren, transmembranösen Integrine scheinen die wichtigsten Rezeptoren zu sein, mit denen Zellen Verbindungen mit der extrazellulären Matrix eingehen, sie interagieren jedoch auch mit transmembranösen Glycoproteinen der Ig-Superfamilie. Sie werden, basierend auf den unterschiedlichen  $\alpha$ - und den gemeinsamen  $\beta$ - Untereinheiten, in Familien eingeteilt (Bixby und Harris, 1991), wobei im Nervensystem den Integrinen mit einer  $\beta_1$ -Untereinheit eine besondere Bedeutung zukommt. Integrine sind, wie viele der anderen Zelladhäsionsmoleküle auch, aus sich wiederholenden, homologen Sequenzen aufgebaut. Diese bilden einen globulären, Protease-resistenten Kopf, der mit der Transmembrandomäne über einen Stiel verbunden ist.

Mit ihrer extrazellulären Domäne interagieren Integrine mit verschiedenen Molekülen der extrazellulären Matrix und erkennen dabei unterschiedliche Sequenzen wie die RGD-Sequenz des Fibronectins, Vitronectins und anderer Adhäsionsmoleküle sowie die DGEA-Sequenz des Typ I-Kollagens und EILDV des Fibronectins. Dabei ist die Spezifität gering, Integrine erkennen meist mehrere Liganden, und Zellen exprimieren oft mehrere verschiedene Integrine. Integrine interagieren aber auch mit Molekülen der Ig-Superfamilie und vermitteln so Zell-Zell-Adhäsion, was für L1 und den RGD-spezifischen Fibronectin-Rezeptor VLA-5 gezeigt wurde (Ruppert et al., 1995). Integrine sind an das Zytoskelett gebunden. Während für Integrine in Fibroblasten und Thrombozyten ausführliche Untersuchungen vorliegen (Damsky und Werb, 1992), die zeigen, daß Integrine als Fokus für die Adhäsion von Zytoskelettkomponenten wie Actinin und Talin fungieren, die die weitere Signaltransduktion vermitteln, ist über die Signaltransduktion in neuronalen Zellen noch wenig bekannt, der Einfluß von  $\alpha\beta_1$ -Integrinen auf das Neuritenwachstum weist aber auf deren Bedeutung hin (Felsenfeld et al., 1994).

### 3. Die Ig-Superfamilie

Die Antikörper sind das ursprünglich entdeckte Beispiel für Moleküle, die mehrere Ig-Domänen enthalten (Edelmann, 1969). NCAM war das erste neurale Zelladhäsionsmolekül dieser Familie, das voll charakterisiert wurde (Hoffmann et al., 1982). Die Analyse der Proteinsequenz zeigte eine evolutionäre Verwandtschaft zwischen NCAM und Immunglobulinen (Hemperly et al., 1986), was durch strukturelle Analyse bestärkt wurde (Thomsen et al., 1996). Derartige Beobachtungen bilden die Grundlage der Hypothese, daß die Duplikation und Diversifikation von Genen, die für eine begrenzte Anzahl an Molekülen kodieren, zur Erschaffung großer Familien geführt hat, die Schlüsselrollen im Immunsystem, der Entwicklung des Nervensystems und anderer Gewebe spielen. Mit weit über 100 zugehörigen Molekülen stellt die Ig-Superfamilie die größte bekannte Familie verwandter Moleküle dar. Im Gegensatz zu den Antigenerkennungsmolekülen des Immunsystems, die in paariger Form auftreten, kommen die Moleküle zur Zellerkennung nicht in paariger Form vor und ermöglichen so zusätzliche Interaktionen durch Paarung von Domänen zwischen den Molekülen (Becker et al., 1989). Moleküle der Ig-Superfamilie werden nach Vorhandensein und Organisation ihrer Domänen, auf Grund ihrer Sequenzhomologien und ihrer Verankerung in der Plasmamembran in verschiedene Familien eingeteilt (Brümmendorf und Rathjen, 1996). Gemeinsames Motiv der Ig-Superfamilie ist die Ig-Domäne. Diese besteht aus 70 – 110 Aminosäuren, die zwei  $\beta$ -Faltblattstrukturen bilden, die einen hydrophoben Kern einschließen und enthält außerdem meist zwei charakteristische Cysteinreste im Abstand von 55 – 75 Aminosäuren, die über Disulphidbrücken die Struktur stabilisieren (Williams et al., 1989). 10 – 15

Aminosäuren C-terminal des ersten Cysteinrestes befindet sich ein Tryptophanrest, der ebenso wie die übrigen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin hochkonserviert ist. Man unterscheidet verschiedene Arten von Ig-Domänen nach ihrer Homologie mit den variablen oder konstanten Ig-Domänen der Immunglobuline und teilt sie in die Typen V, C1 und C2 ein (Williams und Barclay, 1988). Vor kurzer Zeit wurde als weiterer Typ noch der I-Typ vorgeschlagen, der sich durch Homologie mit dem Protein Telokin auszeichnet (Vaughan und Bjorkman, 1996), zu dem auch einige Domänen der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1 gehören würden. Zellerkennungsmoleküle des Nervensystems enthalten Ig-Domänen des Typs V und C2 (Brümmendorf und Rathjen, 1994). Bei Molekülen, die nur eine Ig-Domäne enthalten wie P0 und Thy1 sind diese vom Typ V, während Moleküle mit mehreren Ig-Domänen oft sowohl solche des Typs V, als auch C zeigen. Moleküle der NCAM- sowie der L1-Familie enthalten nur Domänen des Typs C2. Ig-Domänen sind sowohl an homophilen, als auch heterophilen Interaktionen beteiligt und erfüllen so wichtige Funktionen in Zelladhäsion und Neuritenwachstum (Lemmon et al. 1989; Horstkorte et al., 1993; Appel et al., 1993). Die meisten neuronalen Zellerkennungsmoleküle der Ig-Superfamilie enthalten außerdem noch Fibronectinsequenzen des Subtyps III (FNIII-Domänen) (Main et al., 1992). Diese, den Ig-Domänen des Subtyps C2 sehr ähnlichen, Sequenzen, haben eine Länge von ungefähr 90 Aminosäuren, bestehen ebenfalls aus zwei gegenüberliegenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen und enthalten konservierte Tryptophan- und Tyrosinreste, werden aber nicht über Disulphidbrücken stabilisiert und zeigen eine andere Topologie (Brümmendorf und Rathjen, 1993). Die FNIII-Domänen sind an Interaktionen mit der extrazellulären Matrix beteiligt (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987) sowie an der Beeinflussung des Neuritenwachstums (Appel et al., 1993). Ein weiterer Domäentyp, der zusammen mit Ig-Domänen auftritt, wird von der epidermal growth factor-Sequenz (EGF-Domäne) gezeigt. EGF-Domänen bestehen aus 35 – 40 Aminosäuren, enthalten sechs Cysteinreste und sollen ebenfalls an der Beeinflussung neuronalen Wachstums beteiligt sein. So zeigten Experimente mit Tenascin-R die EGF-Domänen des Moleküls als verantwortlich für den repulsiven Effekt des Moleküls auf Neurone und den neuronalen Wachstumskegel (Xiao et al., 1996).

Die Ig-Superfamilie kann nach obigen Kriterien in Familien untergliedert werden, von denen im Nervensystem die L1-, NCAM- und DCC-Familien sowie die Semaphorine (Messerschmidt et al., 1995), Myelin-associated Glycoprotein (MAG) (Arquint et al., 1987), P0 (Greenfield et al., 1973), die Familie der Moleküle mit Tyrosin-Kinase Aktivität (receptor-type protein tyrosine kinase, RPTK) (Barbacid, 1995), die Familie der Moleküle mit Tyrosin-Phosphatase Aktivität (protein tyrosin phosphatase, PTP) (Walton und Dixon, 1993) und die Familie der Moleküle, die Leucin-

reiche Wiederholungssequenzen enthalten (leucin rich repeats, LRR) (Keith und Gay, 1990) von Bedeutung sind.

Von der große Gruppe der neuronalen, der Ig-Superfamilie angehörenden, Moleküle, enthalten die Moleküle folgender drei Familien zusätzlich FNIII-Domänen.

1. Die L1-Familie
2. Die NCAM-Familie
3. Die DCC-Familie

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Molekülen der L1-Familie, so daß die anderen beiden Familien im folgenden nur kurz beschrieben werden.

### **3.1. Die NCAM-Familie**

Die Moleküle der NCAM-Familie bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die fünf Ig-Domänen gefolgt von zwei FNIII-Domänen enthält, die entweder über Phosphatidylinositol in der Zellmembran verankert (NCAM-120) oder durch eine Transmembrandomäne mit einer cytosolischen Domäne unterschiedlicher Größe verbunden ist (NCAM-140 bzw. NCAM-180). Ein einziges Gen kodiert für die Mitglieder dieser Familie. Durch alternatives Spleißen entstehen die drei Hauptisoformen NCAM-120, NCAM-140 und NCAM-180 (Cunningham et al., 1987), durch weitere, seltenere Spleißvorgänge weitere 18 Isoformen (Santoni et al., 1989). Eine durch alternatives Spleißen beeinflusste Sequenz ist das zehn Aminosäuren umfassende VASE-Peptid in der vierten Ig-Domäne von NCAM, das vor allem in NCAM-Isoformen der reiferen Neurone, außer in Neuronen des olfaktorischen Traktes, die sich durch lebenslange Regenerationsfähigkeit auszeichnen, exprimiert wird (Small und Akeson, 1990). Es führt zu stärkerer homophiler Affinität der betroffenen Zellen, aber geringerer Steigerung des Neuritenwachstums (Chen et al., 1994; Walsh et al., 1992). Die unterschiedliche Steigerung des Neuritenwachstums wird durch verschiedene Bindungsfähigkeit an L1 und andere NCAM-Moleküle vermittelt (Lahrtz et al., 1997). An den NCAM-Isoformen werden noch posttranslationelle Modifikationen vorgenommen. So werden Serin- und Threoninreste der cytoplasmatischen Domäne phosphoryliert und Asparaginreste glykosyliert (Cunningham et al., 1987). Wie viele neurale Zellerkennungsmoleküle kann NCAM das HNK-1 Kohlenhydrat-Epitop tragen (Schachner und Martini, 1995), das Zelladhäsion fördert und an Laminin bindet (Keilhauer et al., 1985). Ungewöhnlich ist aber die Möglichkeit aller NCAM-Isoformen, Bindungen mit Polysialinsäure (PSA) einzugehen, welche die adhäsiven Funktionen des NCAM abschwächt, während der das Neuritenwachstum fördernde Effekt verstärkt wird (Schachner und Martini, 1995; Rutishauser, 1993). Die Expression der verschieden gespleißten Isoformen von NCAM unterliegt

einer Regulation, die von Zeit, Gewebe- und Zelltyp abhängt (Jørgensen, 1995), und deren Bedeutung schon bei der unterschiedlichen Expression des VASE-Peptids angedeutet wurde.

### **3.2. Die DCC-Familie**

Die Moleküle der DCC (deleted in colorectal cancer)-Familie von neuronalen Zelladhäsionsmolekülen enthalten eine extrazelluläre Domäne, die aus vier Ig-Domänen gefolgt von 6 FNIII-Domänen besteht. DCC wird überwiegend im Gehirn exprimiert und zeigte in Experimenten mit PC12-Zellen eine Stimulation des Neuritenwachstums (Pierceall et al., 1994).

## **4. Die L1-Familie**

### **4.1. Struktur und Expressionsmuster**

Die Moleküle der L1-Familie (Tab.1.) sind durch die extrazelluläre L1-Kassette charakterisiert, die aus 6 Ig-Domänen gefolgt von vier FNIII-Domänen besteht (Holm et al., 1996), wobei die Sequenzübereinstimmung zwischen den Molekülen der L1-Familie in bezug auf die letzte FNIII-Domäne geringer ist als für die übrigen Domänen. Große Unterschiede zeigen sich in der membrannahen Region proximal der L1-Kassette bei Molekülen mit zytoplasmatischer Domäne. Diese Region kann eine komplette fünfte FNIII-Domäne enthalten (L1, NrCAM), eine halbe FNIII-Domäne (CHL1, CALL) oder eine PAT-reiche Region (Neurofascin) (Holm et al., 1996). Die L1-Kassette mit folgender membrannaher Region ist entweder mit der Membran über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker verbunden oder sie besitzt eine Transmembrandomäne mit folgender zytoplasmatischer Domäne, wodurch zwei Subgruppen der L1-Familie definiert werden (Tab.1.) (Brümmendorf und Rathjen, 1993). Wie in der NCAM-Familie kommt es auch in der L1-Familie zur Expression verschiedener Isoformen der einzelnen Moleküle durch alternatives Spleißen, wie z.B. der drei Isoformen von CALL durch alternatives Spleißen der extrazellulären Domäne (Wei et al., 1998) oder zweier verschiedener Isoformen von L1, die durch alternatives Spleißen eines der RSLE-Sequenz entsprechenden Teils der zytoplasmatischen Domäne entstehen. In der Subgruppe der über GPI verankerten Moleküle konnten bisher keine alternativen Spleißvorgänge nachgewiesen werden. Die Moleküle der L1-Familie sind stark glykosyliert (bis zu 20% des Molekulargewichts) und exprimieren das HNK-1 Epitop (Schachner, 1989). Die meisten Moleküle der L1-Familie werden im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert und sind nicht auf Neuronen beschränkt, auch Subgruppen von Gliazellen können Moleküle der L1-Familie exprimieren. Dabei werden zahlreiche neurale Zelladhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche koexprimiert, wobei auch mehrere Moleküle der L1-Familie zusammen exprimiert werden können. Es ergibt sich ein zelltypspezifisches, zeitlich und örtlich reguliertes Expressionsmuster. L1,

NrCAM und Neurofascin werden in der Maus von Motoneuronen in frühen foetalen Stadien (Tag 11-14) exprimiert (Moscoso und Sanes, 1995).

| L1-Familie                      |                                                       |                                    |                   |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| Moleküle mit Transmembrandomäne | Organismus                                            | Moleküle mit GPI-Anker (F3-Gruppe) | Organismus        |
| CALL/hCHL1                      | Mensch                                                | F3/F11/CNTN1                       | Maus/Huhn/Mensch  |
| CHL1                            | Maus                                                  | BIG-1/PANG                         | Ratte/Maus        |
| L1/NILE                         | Maus, Mensch/Ratte                                    | BIG-2                              | Ratte             |
| L1.1                            | Zebrafisch<br>Goldfisch                               | TAG-1/Axonin-1/TAX-1               | Ratte/Huhn/Mensch |
| L1.2                            | Zebrafisch                                            |                                    |                   |
| NrCAM/BRAVO                     | Maus, Ratte<br>Mensch, Huhn                           |                                    |                   |
| Neuroglian                      | Drosophila<br>Grashüpfer<br>Manduca<br>Coenorhabditis |                                    |                   |
| Neurofascin/ABGP                | Huhn, Maus/Ratte                                      |                                    |                   |

Tabelle 1. Einteilung der L1-Familie  
 ABGP = ankyrin-binding glycoprotein, BIG = brain derived immunoglobulin, CALL = cell adhesion L1-like molecule, CHL1 = close homolog of L1, CNTN = contactin, NgCAM = neuron-glia cell adhesion molecule, NrCAM= NgCAM-related molecule, NILE = NGF inducible large external glycoprotein, PANG = plasmacytoma-associated neuronal glycoprotein, TAG = transiently expressed axonal surface glycoprotein, TAX = humanes TAG-1/axonin-1

L1 wird bis ins Erwachsenenalter hinein exprimiert, während NrCAM und Neurofascin zu späteren foetalen Stadien herabreguliert werden, wobei Neurofascin später wieder exprimiert wird. NrCAM und Neurofascin werden auch von Zellen der Oligodendroglia exprimiert, während L1 im ZNS auf Neuronen beschränkt ist, allerdings in Schwann-Zellen vor dem Beginn der Myelinisierung bzw. unter Bedingungen der Regeneration vorkommt (Martini und Schachner, 1988). Dorsale Spinalganglienzellen exprimieren L1, NrCAM und Neurofascin in frühen foetalen Stadien. Hier werden L1 und NrCAM bis ins Erwachsenenalter exprimiert, während Neurofascin

herabreguliert wird (Moscoso und Sanes, 1995). CHL1 wird ebenfalls erstmals zu Beginn des Neuritenwachstums während der frühen Gehirnentwicklung exprimiert. Im Gegensatz zu L1 wird es aber auch in Subpopulationen der Oligodendroglia des ZNS exprimiert (Hillenbrand et al., 1999). Mehrere Moleküle der L1-Familie werden auch außerhalb des Nervensystems exprimiert (Brümmendorf und Rathjen, 1994). L1 ist in Zellen der hämopoetischen Zellreihe und proliferierenden epithelialen Zellen der intestinalen Krypten (Thor et al., 1987) sowie in den Zellen mehrerer peripherer Tumoren nachweisbar.

## **4.2. Interaktionsmuster und Signaltransduktion**

L1 als Prototyp der Moleküle der L1-Familie ist an Zelladhäsionsvorgängen und der Stimulation von Neuritenwachstum beteiligt. Zur Erfüllung dieser Aufgabe besitzt es die Fähigkeit der homophilen Interaktion, die höchstwahrscheinlich eine signifikante Rolle bei der Formation von Axon-Faszikeln spielt (Lemmon et al., 1989) sowie der heterophilen Interaktion, für die mehrere mögliche Partner identifiziert wurden wie Tag-1, F3, DM1-GRASP, Integrine ( $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 1$ ), Neuracan und Phosphacan (Brümmendorf und Rathjen, 1994; Montgomery et al., 1996; Ruppert et al., 1995).

Für die homophile Interaktion nutzt das L1-Molekül mehrere Domänen, wobei die Funktionen der Domänen bei Zelladhäsion und Stimulation des Neuritenwachstums überlappen, aber auch eine gewisse regionale Spezialisierung zeigen. Dabei sind für das Neuritenwachstum mehr Domänen an der Funktion beteiligt als für die Zelladhäsion (Appel et al., 1993), und L1 ist immer zumindest ein Teil des Rezeptorkomplexes (Appel et al., 1993). Für die Stimulation des Neuritenwachstums wurde außerdem eine beteiligte Region zwischen den FNIII-Domänen 2 und 3 identifiziert (Appel et al., 1995). Die Fähigkeit auch löslicher L1-Fragmente, Neuritenwachstum zu stimulieren, zeigte, daß L1 second messenger Systeme aktivieren kann (von Bohlen und Halbach et al., 1992), wobei noch nicht geklärt ist, wie die Bindung eines Liganden durch L1 intrazelluläre Signale stimuliert. Es wird vermutet, daß L1 als Molekül mit einer die Membran nur einmal durchquerenden Transmembrandomäne nur durch Dimerisierung bzw. Formation von Multi-Protein-Komplexen mit weiteren transmembranösen Molekülen (cis-Interaktion) intrazelluläre Signale erzeugen kann. Als mögliche Bindungspartner wurden der FGF-Rezeptor, GPI-verankerte Moleküle, DM1-GRASP, Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTP) und L1 vorgeschlagen. Für den FGF-Rezeptor (FGFR) wurde eine L1-FGFR-Heterodimerisierung als initiales Signal der Transduktionskaskade nach L1-L1-Trans-Interaktion gefunden (Doherty und Walsh, 1996), wobei die CAM-homologe Domäne (CHD) zwischen den ersten beiden Ig-Domänen des FGFR mit der FGFR-CHD-bindenden Sequenz der vierten FNIII-Domäne des L1 interagiert. Dies führt zu der Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne des FGFR, wodurch die Phospholipase  $C_\gamma$  ( $PLC_\gamma$ ) aktiviert

wird, die Phosphatidylinositol in Diacylglycerin (DAG) und Inositolphosphat spaltet. DAG führt zu einer Steigerung des Calcium-Influsses in die Zelle, wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Kinase II aktiviert wird. Ein Modell für die Initiation der Signaltransduktion von L1 ist auch die Formation eines Heterodimers mit TAG-1/Axonin-1 oder F3/F11. F3 kann durch Assoziation mit der Non-Rezeptor-Tyrosinkinase p59<sup>lyn</sup> Veränderungen der Tyrosinphosphorylierung bisher ungeklärter Moleküle hervorrufen (Cervello et al., 1996). Neben Tyrosinphosphorylierung durch Rezeptor- und Non-Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen wurden auch Rezeptor- und Non-Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTP bzw. PTP) als Heterodimerisierungspartner identifiziert. So wurde RPTP $\beta$  als potentieller Bindungspartner von F3 (Peles et al., 1995) identifiziert, während Phosphacan, eine alternativ gespleißte Form des RPTP $\beta$ , mit L1 und NCAM interagieren kann (Maurel et al., 1994). Mehrere Zelladhäsionsmoleküle könnten durch Dephosphorylierung von Tyrosinresten die Signaltransduktion beeinflussen, wobei die Substrate der Phosphatasen noch weitgehend unbekannt sind und ihre Identifikation wichtige Hinweise auf die Bedeutung dieses Transduktionsweges geben wird. Ein weiterer möglicher Kandidat für eine Heterodimerisierung mit L1 ist DM1-GRASP (DeBernardo und Chang, 1996). Wahrscheinlich ist für L1 auch die Formation eines Homodimers in cis-Interaktion (Shapiro et al., 1995). Obwohl die meisten der obigen Homo- und Heterodimerisierungsmuster noch nicht direkt demonstriert wurden, ergeben sie plausible Modelle der Initiation der Signaltransduktion, wenn man berücksichtigt, daß Dimerisierung ein bekannter Vorgang bei Molekülen der Ig-Superfamilie im Immunsystem ist (Reth, 1992).

Die zytoplasmatische Domäne von L1 ist Substrat mehrerer Kinasen und Phosphatasen. So phosphoryliert die Serin-Kinase Casein Kinase II (CKII) den Serinrest Ser<sup>1181</sup>, der C-terminal der alternativ spleißbaren RSLE-Sequenz liegt (Wong et al., 1995). Sie wird am stärksten im sich entwickelnden Gehirn exprimiert (Girault et al. 1990). Die Serin/Threonin-Kinase p90<sup>rsk</sup>, die das in der KRSK-Sequenz nahe der Transmembrandomäne gelegene Ser<sup>1152</sup> phosphoryliert, ist hierüber wahrscheinlich auch an der Stimulation des Neuritenwachstums beteiligt (Wong et al., 1996). Auch wurde gezeigt, daß die cis-Interaktion zwischen L1 und NCAM, die über an L1 N-glycosidisch gebundene oligomannosidische Glycane vermittelt wird und die das Neuritenwachstum beeinflußt, mit der Serin- und Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von L1 verknüpft ist (Heiland et al., 1998). Die Bedeutung und Regulation der Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne von L1 ist allerdings noch weitgehend ungeklärt, ebenso die Frage, ob und inwieweit Second Messenger-Systeme umgekehrt zur Stimulation der Zelladhäsionsmoleküle führen können.

Es sind noch weitere Interaktionen der zytoplasmatischen Domäne von L1 bekannt, die an der Stimulation des Neuritenwachstums beteiligt sind. L1 assoziiert direkt über eine in der C-terminalen

Hälfte der zytoplasmatischen Domäne gelegene Aminosäuresequenz (NEDGSFIGQY) mit Ankyrin, einem Spektrin-bindenden Protein (Davis und Bennett, 1994), so daß L1 über seine zytoplasmatische Domäne mit einem Spectrin-Ankyrin-Netzwerk verbunden ist. Auch kann L1 über eine membrannahe Sequenz (KRSKGGK) mit Actin in Wechselwirkung treten (Dahlin-Huppe et al., 1997). Da die Bindung extrazellulärer Liganden an  $\beta$ 1-Integrine deren Bindung an das Actin-Zytoskelett induziert (Felsenfeld et al., 1996), besteht die Möglichkeit, daß auch die Bindung des L1 an das Zytoskelett über Bindung an extrazelluläre Liganden reguliert wird und so das Neuritenwachstum beeinflusst. Für Neurofascin wurde gezeigt, daß Tyrosinphosphorylierung dessen Bindungsfähigkeit für Ankyrin signifikant verringerte, so daß auch hier Regulationsmöglichkeiten zu sehen sind (Garver et al., 1996).

Es bestehen also viele bekannte Interaktionsmöglichkeiten, sowohl in der Homo- und Heterodimerisierung von L1, als auch in der Signaltransduktion über Second Messenger-Systeme, die ihrerseits Einfluß auf die Aktivität von L1 haben können, und in der Interaktion mit dem Zytoskelett, deren individuelle Bedeutung für die Stimulation des Neuritenwachstums noch Gegenstand der Forschung ist. Dabei sind insbesondere im Bereich der Funktion und Regulation der Tyrosinkinasen und -phosphatasen noch viele Fragen ungeklärt.

## **5. CHL1 und dessen humanes Ortholog CALL**

CHL1 (close homologue of L1) ist ein Molekül aus der L1-Familie von Zelladhäsionsmolekülen. Es besteht aus 6 extrazellulären Ig-Domänen vom C2-Typ, gefolgt von 4.5 FNIII-Domänen, einer Transmembrandomäne und der folgenden, C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (Holm et al., 1996). Die unvollständige fünfte Ig-Domäne unterscheidet es von den anderen Molekülen der L1-Familie. In der zweiten Ig-Domäne enthält CHL1 die RGD-Sequenz, die auch in L1 gefunden wird, hier allerdings in der sechsten Ig-Domäne (Hlavin und Lemmon, 1991). In der sechsten Ig-Domäne enthält CHL1 eine DGEA-Sequenz, die nicht in anderen Molekülen der L1-Familie gefunden wird. Die zytoplasmatische Domäne ist in der gesamten L1-Familie hochkonserviert, wobei CHL1 im Gegensatz zu den anderen Molekülen der L1-Familie mit einer Transmembrandomäne nicht die RSLE-Sequenz enthält, die wie oben beschrieben dort Gegenstand alternativen Spleißens ist und nur in Neuronen exprimiert wird. CHL1 besitzt zahlreiche N- und O-glykosidisch gebundene Glykane. Es wurde gezeigt, daß N-glykosidisch gebundene Kohlenhydrate ca. 20% des Molekulargewichts von CHL1 ausmachen. Außerdem trägt CHL1 das HNK-1-Kohlenhydrat. Wie L1 wird auch CHL1 erst zu Beginn des Neuritenwachstums in der Gehirnentwicklung exprimiert. Es zeigt mit L1 überlappende, aber auch von L1 verschiedene Expressionsmuster. Im Gegensatz zu L1 wird es in gewissen Subpopulationen von Astrozyten und Oligodendrozyten im ZNS exprimiert (Hillenbrand et al., 1999).

CHL1 verstärkt weder homophile noch heterophile Adhäsion mit L1, stimuliert aber das Neuritenwachstum sowohl in löslicher, als auch in substratgebundener Form (Hillenbrand et al., 1999). In vitro-Versuche zeigten, daß CHL1 das Überleben von Cerebellum- und Hippocampuszellen durch Hemmung der Apoptose förderte (Chen et al., 1999). Erst kürzlich wurde gezeigt, daß CHL1 in der Ratte bei Regenerationsprozessen sowohl im peripheren Nervensystem, als auch im zentralen Nervensystem von Neuronen vermehrt exprimiert wird (Zhang et al., 2000; Chaisuksunt et al., 2000).

CALL, das „cell adhesion L1-like molecule“, ist das humane Ortholog von CHL1 (Wei et al., 1998). Die Proteine sind zu 84% identisch, die zytoplasmatische Domäne betreffend sogar zu 97%. Die CALL-Struktur entspricht der des CHL1. Es gibt drei Isoformen, die durch alternatives Spleißen der extrazellulären Domäne entstehen. Wie CHL1 wird CALL in allen Teilen des sich entwickelnden Gehirns, dem Rückenmark und einigen peripheren Ganglien exprimiert und ist auch im Erwachsenenalter nachweisbar.

## **6. Die Rolle von Molekülen der L1-Familie in Krankheit und bei der Regeneration**

Die Moleküle der L1-Familie bilden eine Untergruppe der großen Ig-Superfamilie neuraler Zelladhäsionsmoleküle, die wichtig für Zell-Zell-Interaktionen in der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems sind. Sie beeinflussen Migration, Neuritenwachstum und -faszikulation, leiten den Wachstumskegel und beeinflussen dessen Motilität und sind an der Synapsenbildung beteiligt. Die Reaktion der Zellen ist abhängig vom zeitlichen und örtlichen Kontext, in dem die Adhäsionsmoleküle auftreten und stimuliert werden. Dabei reicht die Reaktionsbreite von Inhibition bis zur starken Stimulation des Neuritenwachstums und so kann dasselbe Molekül, abhängig vom Kontext, verschiedene Effekte ausüben. Andererseits ergibt sich aus dem Zusammenwirken zahlreicher inhibitorischer und stimulierender Moleküle ein System zur feinen Regulation von Wachstumsvorgängen in Entwicklung und Regeneration. Störungen dieses Systems können zu größeren und subtileren Korrelaten im Nervensystem führen. Mutationen im humanen L1-Gen verursachen eine Reihe klinisch verwandter Erkrankungen, die unter dem Namen CRASH-Syndrom (Corpus callosum Hypoplasie, geistige Retardierung, adduzierte Daumen, spastische Paraplegie und Hydrocephalus) zusammengefaßt werden. Geistige Retardierung, bei einigen Fällen des CRASH-Syndroms die einzige klinische Manifestation, ist in allen Fällen des CRASH-Syndroms vorhanden und reicht von leichter Retardierung bis zu Intelligenzquotienten zwischen 20 und 50 (Fransen et al., 1996). CALL ist möglicherweise Ursache

der geistigen Retardierung beim 3p<sup>-</sup>-Syndrom und Syndromen mit Ringformation des Chromosom 3 (Angeloni et al., 1999). Anstrengungen werden unternommen, um Korrelationen zwischen Polymorphismen des CALL-Gens und dem Intelligenzquotienten nachzuweisen (Angeloni et al., 1999). Experimente mit Knock out-Mäusen deuten darauf hin, daß eine Redundanz der Regulationsmechanismen besteht, und die Funktion fehlender Moleküle zumindest teilweise durch andere Moleküle kompensiert werden kann, wie sich am Beispiel der NCAM-defizienten Mäuse zeigte, die nur geringe phänotypische Unterschiede zu Wildtypmäusen aufwiesen (Cremer et al., 1994). Auch für Regenerationsprozesse ist das Zusammenspiel von Neuritenwachstum stimulierenden sowie von Apoptose verhindernden Molekülen einerseits und Wachstum hemmenden und Apoptose induzierenden Molekülen andererseits von Bedeutung. Wachstum fördernde Moleküle werden von Neuronen und Gliazellen exprimiert und scheinen in Phasen der Entwicklung und Regeneration vorzuherrschen, während sie danach in geringerem Ausmaß nachweisbar sind (Chaisuksunt et al., 2000; Zhang et al., 2000). Im ZNS der Säugetiere kommen eine Reihe inhibitorischer Moleküle vor, die im peripheren Nervensystem sowie im ZNS der Fische und Amphibien, wo es zu besserer Regeneration kommt, in viel geringerem Maße exprimiert werden (Schwab et al., 1993). Dieses komplexe System, in dem es zu Interaktionen von extrazellulären Matrixmolekülen und löslichen Faktoren mit Molekülen der Zelloberfläche, die auch untereinander Wechselwirkungen zeigen, und zu Wechselwirkungen verschiedener Signaltransduktionswege (siehe oben) kommt, reguliert, ob Regeneration gefördert wird oder nicht. In diesem System gibt es zahlreiche therapeutische Ansatzpunkte, die in den nächsten Jahren Gegenstand intensiver Forschung sein werden, um neuronale Regeneration auch im zentralen Nervensystem zu ermöglichen, indem das Gleichgewicht aus inhibitorischen und stimulierenden Faktoren verschoben wird. Die meisten Verletzungen des Rückenmarks mit Querschnittssymptomatik sind beim Menschen kontusioneller Genese. Transsektionen machen einen geringeren Anteil der Verletzungen aus. Experimente an Ratten zeigten, daß bei gequetschtem Rückenmark der Tiere die Regeneration durch Applikation von FGF-Fibrin etwas verbessert werden kann (Cheng et al., 1996), was auf die Möglichkeit der Verbesserung der Regeneration durch Veränderung des obigen Gleichgewichtes deutet.

## **7. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war zum einen, ausgehend von der cDNA für die Isoform II des Zelladhäsionsmoleküls CALL, des humanen orthologen Moleküls von CHL1, die Expression und Aufreinigung eines Fusionsproteins (bestehend aus CALL und der F<sub>c</sub>-Region des humanen IgG<sub>1</sub>) und die Untersuchung des Einflusses des Fusionsproteins auf das Neuritenwachstum von Cerebellumzellen der Maus in primäre Zellkultur. Außerdem sollte das Molekül bei

nachgewiesener biologischer Aktivität für Experimente zur Regeneration des Rückenmarks nach Kontusionsverletzungen sowie für diverse weitere Experimente bereitgestellt werden. Weiterhin wurde die Signaltransduktion von L1 mit Hilfe der 2-D Gelelektrophorese und Westernblot mit dem Antiphosphotyrosin-Antikörper 4G10 untersucht. Untersucht wurde die Stimulation von N2A-Zellen mit dem Anti-L1-Antikörper AK 557.B6.

## B. Material und Methoden

### 1. Plasmide

| Plasmide         | Relevante Eigenschaften                                                                                                                                                                         | Referenz/Herkunft |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| pBlue-CAM(+)     | Cm <sup>r</sup> , lacZ $\alpha$                                                                                                                                                                 | Stratagene        |
| pBlueCAM-PCR     | 196 bp <i>EcoRV</i> - <i>SaI</i> -Fragment des PCR-Produktes zur Einführung einer splice-donor-sequence und <i>BclI</i> -site an der hCHL1- cDNA                                                | diese Arbeit      |
| pCMVSPORT-CALLII | 7.6 kb <i>EcoRI</i> - <i>NotI</i> -Fragment mit hCHL1-Isoform II-cDNA in pCMVSPORT                                                                                                              | M. Lerman         |
| pEE14-Km         | modifizierter pEE14 von Celltech mit splice-acceptor-sequence und cDNA des F <sub>c</sub> des humanen IgG <sub>1</sub> , Ap <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>                                      | A. Nienaber       |
| pEE14-hCHL1-Fc   | 3.5 kb <i>HindIII</i> - <i>BclI</i> -Fragment aus pGem-7-CALL-PCR in pEE14-Km über <i>HindIII</i> - <i>BamHI</i>                                                                                | diese Arbeit      |
| pGem7-ZF(+)      | Ap <sup>r</sup> , lacZ $\alpha$                                                                                                                                                                 | Promega           |
| pGem7-CALLII     | 5.7 kb <i>EcoRI</i> - <i>XhoI</i> -Fragment mit hCHL1-Isoform II-cDNA aus pCMVSPORTCALL in pGEM-7 ZF(+)                                                                                         | diese Arbeit      |
| pGem7-CALLII-PCR | 3.5 kb <i>EcoRI</i> - <i>XhoI</i> -Fragment der gesamten die extrazelluläre Domäne codierenden cDNA mit zusätzlicher splice-donor-sequence und <i>BclI</i> -site in pGem-7-CALL über <i>SaI</i> | diese Arbeit      |

Tabelle 2. Verwendete Plasmide mit relevanten Eigenschaften

## 2. Bakterienstämme

### *E. coli*-Stämme

| Stamm        | Relevante Eigenschaften                                                                                                                                                  | Referenz/Herkunft   |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| DH5 $\alpha$ | F <sup>-</sup> , supE44, $\Delta$ lacU169, [ $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15],<br>hsdR17, recA1, endA1, gyra96, thi-1, relA1,<br>(res <sup>-</sup> , mod <sup>+</sup> ), deoR | Hanahan, 1983       |
| NR 3704      | dam <sup>-</sup>                                                                                                                                                         | M. Kutsche, Hamburg |

Tabelle 3. Verwendete *E. coli*-Stämme mit relevanten Eigenschaften

## 3. Eukaryontische Zelllinien

| Zelllinie | Relevante Eigenschaften                                                         | Referenz/Herkunft |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| CHO-K1    | Fibroblastentumorzelllinie aus dem Ovar<br>des Hamsters (Chinese Hamster Ovary) | ATCC              |
| N2A       | Neuroblastomzelllinie der Maus                                                  | ICN               |

Tabelle 4. Verwendete Zelllinien mit relevanten Eigenschaften

## 4. Medien, Zusätze, Puffer, Lösungen, Oligonukleotide

### 4.1. Medien

#### 4.1.1. Nährmedien und Zusätze für die Bakterienkultur

LB: „Luria Broth“

|                                |                  |               |
|--------------------------------|------------------|---------------|
| E. coli-Vollmedium pro 1000 ml | 10 g             | Bactotrypton  |
|                                | 5 g              | Yeast-Extract |
|                                | 5 g              | NaCl          |
| ad 1000 ml                     | H <sub>2</sub> O |               |

Zusätze zu Nährmedien:

|                      |             |        |       |
|----------------------|-------------|--------|-------|
| - Agar zu Festmedien | pro 1000 ml | 15 g   | Agar  |
| - IPTG zu Festmedien | pro 1000 ml | 238 mg | IPTG  |
| - X-Gal-Medien       | pro 1000 ml | 25 mg  | X-Gal |

- Antibiotika-Konzentrationen für *E. coli*-Medien:

| Substanz        | Abkürzung | Konzentration |
|-----------------|-----------|---------------|
| Ampicillin      | Ap        | 150 µg/ml     |
| Chloramphenicol | Cm        | 50 µg/ml      |
| Kanamycin       | Km        | 25 µg/ml      |

Tabelle 5. Antibiotika als Zusatz zu Kulturmedien

#### 4.1.2. Nährmedien und Zusätze für die eukaryontische Zellkultur

Alle Medien wurden nach Herstellung durch Filtrierung mit Millipore-Filtern der Porengröße 0.22 µm sterilisiert und für 48h bei 37°C inkubiert um die Sterilität zu testen.

##### a) Medien und Zusätze für die Kultur von N2A-Zellen:

DMEM: „Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium“

DMEM-Pulver wurde von Gibco Life Technologies bezogen und nach Protokoll D im Katalog von Gibco hergestellt (pH-Einstellung auf 7,2, Zugabe von NaHCO<sub>3</sub>)

Zusätze zu DMEM:

- FCS: foetales Kälberserum, hitzeinaktiviert
- P/S Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 units/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin)

##### b) Medien und Zusätze für die Kultur und Selektion von CHO-K1-Zellen:

GMEM-S: „Glasgow modifiziertes

Eagle Medium“ pro 500 ml

|         |                                                                         |
|---------|-------------------------------------------------------------------------|
| 400 ml  | H <sub>2</sub> O bidest, autoklaviert (H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> ) |
| 50 ml   | 10x GMEM ohne Glutamin von Gibco                                        |
| 18,1 ml | Natriumbikarbonat 7.5%                                                  |
| 5 ml    | 100x NEAA (non-essential amino acids) von Gibco                         |
| 5 ml    | 100x G+A (Glutamat + Asparagin)                                         |
| 5 ml    | 100 mM Natriumpyruvat von Gibco                                         |
| 10 ml   | 50x Nukleoside                                                          |
| 5 ml    | P/S (Penicillin + Streptomycin)                                         |
|         | 5000 units/ml                                                           |

Stammlösungen für GMEM-S:

|                              |                                          |
|------------------------------|------------------------------------------|
| - 100x Glutamat + Asparagin: | 600 mg Glutamat                          |
|                              | 600 mg Asparagin                         |
|                              | ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> |
| - 50x Nukleoside:            | 35 mg Adenosin                           |
|                              | 35 mg Guanosin                           |
|                              | 35 mg Cytidin                            |
|                              | 35 mg Uridin                             |
|                              | 12 mg Thymidin                           |
|                              | ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> |

Zusätze zu GMEM-S:

|        |                                                                         |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|
| - FCS: | foetales Kälberserum, hitzeinaktiviert                                  |
| - dFCS | foetales Kälberserum, dialysiert gegen 150 mM NaCl und hitzeinaktiviert |
| - MSX  | L-Methionin-Sulphoximin                                                 |
|        | Stammlösung 100 mM                                                      |
|        | 80 mg MSX                                                               |
|        | ad 4,4 ml GMEM-S                                                        |

**c) Medien und Zusätze für die Kultur von Cerebellumzellen der Maus**

|            |                                          |
|------------|------------------------------------------|
| <u>X1:</u> | serumfreies Medium zur                   |
|            | Kultur der Cerebellumzellen              |
| pro 100ml: | 10 ml 10x BME (Basales Eagle Medium)     |
|            | von Gibco                                |
|            | 1,5 ml Natriumbikarbonat 7.5%            |
|            | 1 ml P/S (Penicillin + Streptomycin)     |
|            | 5000 units/ml                            |
|            | 2 ml BSA 5%                              |
|            | 100 µl Insulin (10 mg/ml)                |
|            | 100 µl l-Thyroxin (4 µM)                 |
|            | 200 µl Transferrin (50 mg/ml)            |
|            | 100 µl Aprotinin (27 TIU/ml)             |
|            | 300 µl Seleniumoxid (10 µM)              |
|            | ad 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> |

## 4.2. Puffer und Lösungen

### 4.2.1. Puffer und Lösungen für die Behandlung von DNA

|                   |            |       |        |
|-------------------|------------|-------|--------|
| <u>TE-Puffer:</u> | DNA-Puffer | 10 mM | Tris   |
|                   |            | 1 mM  | EDTA   |
|                   |            |       | pH 7,5 |

Puffer für Plasmid-Isolierung, Gel-Extraktion, PCR-Aufreinigung:

Es wurden Produkte von Qiagen verwendet. Für die Zusammensetzung der Puffer und Lösungen siehe die entsprechenden Handbücher.

Puffer für Restriktionsverdau, Ligation und die CIP (Calf Intestinal Phosphatase):

Es wurden jeweils die beigefügten Puffer zu den Restriktionsenzymen der entsprechenden Firmen (siehe unter Enzyme) verwendet. Für die Zusammensetzung siehe entsprechende Handbücher / Protokolle.

### 4.2.2. Puffer und Lösungen für Agarosegele

|                    |                                      |        |                       |
|--------------------|--------------------------------------|--------|-----------------------|
| <u>TAE-Puffer:</u> | Elektrophoresepuffer für Agarosegele |        |                       |
|                    |                                      | 40 mM  | Tris                  |
|                    |                                      | 10 mM  | Na-Acetat             |
|                    |                                      | 1 mM   | EDTA                  |
|                    |                                      |        | pH 7,8 (mit Eisessig) |
| <u>BPB:</u>        | Bromphenolblau-Glycerin              |        |                       |
|                    |                                      | 0,04%  | Bromphenolblau        |
|                    |                                      | 49,98% | Glycerin              |
|                    |                                      | 49,98% | TAE                   |

### 4.2.3. Puffer und Lösungen für Zellkultur, Transfektion und Proteinaufreinigung

#### a) Puffer und Lösungen für die Zellkultur

|                          |                                            |        |                                  |
|--------------------------|--------------------------------------------|--------|----------------------------------|
| <u>HBSS<sup>-</sup>:</u> | Hank's balanced salts solution             |        |                                  |
|                          | ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> |        |                                  |
|                          | pro 1000 ml                                | 400 mg | KCl                              |
|                          |                                            | 60 mg  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  |
|                          |                                            | 8,0 g  | NaCl                             |
|                          |                                            | 350 mg | NaHCO <sub>3</sub>               |
|                          |                                            | 48 mg  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|                          |                                            | 1,0 g  | D-Glukose                        |
|                          |                                            | ad 1 l | H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>   |

|             |                                   |         |                                  |
|-------------|-----------------------------------|---------|----------------------------------|
| <u>T/E:</u> | Trypsin/EDTA in HBSS <sup>-</sup> | 0,2%    | Trypsin                          |
|             |                                   | 0,25%   | EDTA                             |
| <u>PBS:</u> | Phosphate Buffered Saline         | 150 mM  | NaCl                             |
|             |                                   | 8,1 mM  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|             |                                   | 1,74 mM | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|             | auf pH 7,4 einstellen mit         |         | HCl                              |

#### b) Puffer und Lösungen für die Calciumphosphat-Transfektion

|                             |                                                                           |        |                                  |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------|
| <u>2x HBS:</u>              | pro 500 ml                                                                | 8,18 g | NaCl                             |
|                             |                                                                           | 5,95 g | Hepes (Sigma)                    |
|                             |                                                                           | 0,2 g  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|                             | in 400 ml H <sub>2</sub> O lösen und pH auf 7.05-7.10 mit NaOH einstellen |        |                                  |
|                             | ad 500 ml                                                                 |        | H <sub>2</sub> O                 |
| <u>15% Glycerin in HBS:</u> |                                                                           | 15 ml  | Glycerin                         |
|                             |                                                                           | 50 ml  | 2x HBS                           |
|                             | ad 100 ml                                                                 |        | H <sub>2</sub> O                 |

#### 2 M CaCl<sub>2</sub>

#### c) Puffer und Lösungen für die Kultur von Cerebellumzellen

|                          |           |                                  |
|--------------------------|-----------|----------------------------------|
| <u>Digestionslösung:</u> | 800 mg    | NaCl                             |
|                          | 37 mg     | KCl                              |
|                          | 99 mg     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|                          | 600 mg    | HEPES                            |
|                          | 35 mg     | NaHCO <sub>3</sub>               |
|                          | ad 100 ml | H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>   |
| <u>Trypsin/DNAse:</u>    | 1%        | Trypsin                          |
|                          | 0,05%     | DNAse                            |
|                          |           | in Digestionslösung              |
| <u>DNAse:</u>            | 0,05%     | DNAse                            |
|                          |           | in Digestionslösung              |

#### 4.2.4. Puffer, Lösungen und Zusammensetzung der Gele für die Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

|                        |              |                                                        |
|------------------------|--------------|--------------------------------------------------------|
| <u>Trenngelpuffer:</u> | 12,1 g (1 M) | Tris                                                   |
|                        | ad 100 ml    | H <sub>2</sub> O dest (H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> ) |

|                                     |              |                                                          |
|-------------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------|
|                                     |              | pH 8,8 mit HCl <sub>konz.</sub> einstellen               |
| <u>Sammelgelpuffer:</u>             | 12,1 g (1 M) | Tris                                                     |
|                                     | ad 100 ml    | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                            |
|                                     |              | pH 6,8 mit 1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> einstellen |
| <u>10% SDS:</u>                     | 10 g         | SDS                                                      |
|                                     | ad 100 ml    | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                            |
| <u>TEMED:</u>                       |              | fertig von BIORAD                                        |
| <u>10% Ammoniumpersulfat (APS):</u> | 0,1 g        | APS                                                      |
|                                     | ad 1 ml      | H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>                           |
| <u>5x Probenpuffer:</u>             | 2,5 ml       | Sammelgelpuffer                                          |
|                                     | 20 ml        | Glycerin                                                 |
|                                     | 8 ml         | 10% SDS                                                  |
|                                     | 2 ml         | β-Mercaptoethanol (β-ME)                                 |
|                                     | 5 ml         | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                            |
| <u>Sammelgel (5%):</u>              | 3,77 ml      | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                            |
|                                     | 320 µl       | Sammelpuffer                                             |
|                                     | 50 µl        | 10% SDS                                                  |
|                                     | 830 µl       | Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29 : 1), 30% (w/v)        |
|                                     | 25 µl        | APS                                                      |
|                                     | 5 µl         | TEMED                                                    |
| <u>Trenngel:</u>                    | 3,92 ml      | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                            |
|                                     | 5,26 ml      | Trenngelpuffer                                           |
|                                     | 140 µl       | 10% SDS                                                  |
|                                     | 4,7 ml       | Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29 : 1), 30% (w/v)        |
|                                     | 70 µl        | APS                                                      |
|                                     | 7 µl         | TEMED                                                    |

#### 4.2.5. Lösungen für Proteinfärbungen

##### a) Lösungen für Coomassie-Färbung

|                            |      |                               |
|----------------------------|------|-------------------------------|
| <u>Fixierungslösung C:</u> | 20%  | Trichloressigsäure            |
| <u>Färbelösung A:</u>      | 0,2% | Coomassie-Brilliant Blue R250 |

|                       |     |            |
|-----------------------|-----|------------|
|                       |     | in Ethanol |
| <u>Färbelösung B:</u> | 20% | Eisessig   |
| <u>Entfärber:</u>     | 20% | Ethanol    |
|                       | 10% | Eisessig   |

#### b) Lösungen für die Silberfärbung

|                              |           |                                                                    |
|------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------|
| <u>Fixierungslösung S:</u>   | 300 ml    | Ethanol                                                            |
|                              | 100 ml    | Eisessig                                                           |
|                              | ad 1 l    | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                                      |
| <u>Inkubationslösung:</u>    | 75 ml     | Ethanol                                                            |
|                              | 17 g      | Natriumacetat                                                      |
|                              | 1,25 ml   | Glutaraldehyd (25% w/v)                                            |
|                              | 0,5 g     | Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O |
|                              | ad 250 ml | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                                      |
| <u>Versilberungslösung:</u>  | 0,5 g     | AgNO <sub>3</sub>                                                  |
|                              | 50 µl     | Formaldehyd (37% w/v)                                              |
|                              | ad 250 ml | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                                      |
| <u>Entwicklungslösung S:</u> | 7,5 g     | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                    |
|                              | 50 µl     | Formaldehyd (37% w/v)                                              |
|                              | ad 300 ml | H <sub>2</sub> O dest                                              |
| <u>Stopplösung:</u>          | 2,5 g     | Glycin                                                             |
|                              | ad 250 ml | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                                      |
| <u>Trocknungslösung:</u>     | 25 ml     | Glycerin (87% w/v)                                                 |
|                              | ad 250 ml | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                                      |

#### 4.2.6. Puffer und Lösungen für 2-D Gelelektrophorese und Western Blot

##### a) Puffer für Western Blot

|                            |          |                               |
|----------------------------|----------|-------------------------------|
| <u>TBS:</u>                | 150 mM   | NaCl                          |
|                            | 50 mM    | Tris                          |
|                            |          | pH 7,4 mit HCl einstellen     |
| <u>Blot Buffer:</u>        | 6 g      | Tris                          |
|                            | 28,8 g   | Glycin                        |
|                            | ad 2 l   | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> |
| <u>Blockierungslösung:</u> | 4g       | Magermilchpulver              |
|                            | ad 100ml | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> |

Entwickler: fertig von Kodak GBX: developer and replenisher,  
cat.no.1900943

Fixierer: fertig von Kodak GBX: fixer and replenisher,  
cat.no.1901875

Film: Kodak scientific imaging film: Biomax ML

#### **b) Puffer und Lösungen für 2-D Gelelektrophorese**

Ripa-Lysierpuffer:

|           |                                               |
|-----------|-----------------------------------------------|
| 50 mM     | Tris                                          |
| 150 mM    | NaCl                                          |
| 2 g       | NP40                                          |
| 1 mM      | Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> |
| 1 mM      | NaF                                           |
| 1 mM      | EDTA                                          |
| 2 mM      | NaVO <sub>4</sub>                             |
| 1 mM      | Pefabloc                                      |
| 1 µg/ml   | Aprotinin                                     |
| 1 µg/ml   | Leupeptin                                     |
| ad 200 ml | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>                 |

Reswelling Buffer:

|       |              |
|-------|--------------|
| 8 M   | Urea         |
| 65 mM | DTT          |
| 0,8%  | Ampholyte    |
| 0,5%  | Triton X-100 |

Equilibration Buffer:

|                 |                               |
|-----------------|-------------------------------|
| 36 g (6 M)      | Urea                          |
| 30 ml           | Glycerin ( 87% w/v)           |
| 15 ml (150 mM)  | 1M Tris pH8                   |
| 100 mg (6,5 mM) | DTT                           |
| 15 ml (1%)      | 10% SDS                       |
| 14,5 ml         | H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> |
| einige Körner   | Bromphenolblau                |

#### **4.2.7. Puffer für die Herstellung von Hirnhomogenat der Maus**

Lysis-Puffer A:

|       |                 |
|-------|-----------------|
| 20 mM | Tris/Hcl pH 7,5 |
| 150mM | NaCl            |
| 1 mM  | EDTA            |

1mM EGTA

Protease-Inhibitor-Mix (Roche)

Lysis-Puffer B:

1% NP-40

in Lysis-Puffer A

### 4.3. Oligonukleotide

| Name     | Länge | Sequenz (5' → 3')                                       | Verwendung                                                                    |
|----------|-------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| uni      | 17    | GTAAAACGACGGCCAGT                                       | Sequenzierung                                                                 |
| rev      | 17    | CAGGAAACAGTATGAC                                        | Sequenzierung                                                                 |
| T3       | 20    | AATTAACCCCTCACTAAAGGG                                   | Sequenzierung                                                                 |
| T7       | 22    | GTAATACGACTCACTATAGGGC                                  | Sequenzierung                                                                 |
| SP6      | 18    | ATTTAGGTGACACTATAG                                      | Sequenzierung                                                                 |
| CALL-BcS | 51    | ACGTCGACTGATCAACTTACCTGTAG<br>TGGAGATGTCATCATATAAACCAGC | Zur Einführung von<br>BclI und SalI und<br>splice donor in<br>hCHL1 durch PCR |
| CALL-5'V | 25    | AACCTGAATGCAACTACCAAGTAC                                | siehe CALL-BcS                                                                |

Tabelle 6. Verwendete Oligonukleotide

## 5. Chemikalien, Enzyme und Materialien

4G10

Upstate Biotech

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29 : 1), 30% (w/v)

Serva

Agar

Gibco/Life Technologies

Agarose

Gibco/Life Technologies

Ampholyte

Pharmacia Biotech

Ampicillin

Sigma

Aprotinin

Sigma

Asparagin

Sigma

Bactotrypton

Difco

10x BME (Basal Medium Eagle)

Gibco/Life Technologies

Bromphenolblau

Biomol

BSA

Calbiochem

Chloramphenicol

Sigma

|                                             |                         |
|---------------------------------------------|-------------------------|
| CIP, CIP-Puffer                             | Boehringer Mannheim     |
| Coomassie Brilliant Blue R250               | Sigma                   |
| DMEM, Pulver                                | Gibco/Life Technologies |
| DNA Ligase                                  | Boehringer Mannheim     |
| DNAse                                       | Gibco/Life Technologies |
| EDTA                                        | Sigma                   |
| Fetal Calf Serum (FCS)                      | Gibco/Life Technologies |
| Formaldehyd 37% (w/v)                       | Serva                   |
| Humanes IgG <sub>1</sub>                    | Sigma                   |
| Glutamat                                    | Sigma                   |
| Glutaraldehyd 25% (w/v)                     | Serva                   |
| 10x GMEM (Glasgow Modified Eagle Medium)    | Gibco/Life Technologies |
| Hefeextrakt                                 | Gibco/Life Technologies |
| HEPES                                       | Sigma                   |
| Insulin                                     | Serva                   |
| IPTG                                        | Gibco/Life Technologies |
| Kanamycin                                   | Sigma                   |
| Leupeptin                                   | Boehringer-Mannheim     |
| β-Mercaptoethanol                           | Sigma                   |
| MSX (l-Methionin-Sulphoximin)               | Sigma                   |
| Natriumbicarbonat                           | Gibco/Life Technologies |
| Natriumpyruvat                              | Gibco/Life Technologies |
| NEAA (Non-Essential Amino Acids)            | Gibco/Life Technologies |
| Nukleoside                                  | Sigma                   |
| Pefabloc                                    | Boehringer-Mannheim     |
| P/S (Penicillin/Streptomycin) 5000 units/ml | Sigma                   |
| Protein A-Sepharose                         | Pharmacia Biotech       |
| QIAquick-Gel-Extraction Kit                 | Qiagen                  |
| Qiagen Maxi Kit                             | Qiagen                  |
| Qiagen Mini Kit                             | Qiagen                  |
| PCR Purification kit                        | Qiagen                  |
| Restriktionsenzyme und Puffer               | AGS, Boehringer, BRL    |
| Seleniumdioxid                              | Sigma                   |
| Taq-Polymerase                              | Boehringer Mannheim     |

|                          |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| TEMED                    | Biorad                  |
| I-Thyroxin               | Sigma                   |
| Toluidinblau             | Sigma                   |
| Transferrin              | Boehringer Mannheim     |
| Trypanblau               | Sigma                   |
| Trypsin                  | Gibco/Life Technologies |
| X-Gal                    | Sigma                   |
| alle anderen Chemikalien | Merck                   |

## 6. Mikrobiologische Methoden

### 6.1. Bakterienanzucht

Für die Anzucht einer *E. coli*-Kultur werden 5ml LB-Medium in einem Reagenzglas mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Inkubation erfolgt über Nacht (ü/N) im Roller bei 37°C. Für größere Ansätze werden je nach Bedarf 100-250 ml LB-Medium mit einer stationären Vorkultur im Verhältnis  $\frac{1}{500} - \frac{1}{1000}$  beimpft und im Luftschüttler ü/N bei 37°C bebrütet. Die Inkubation von Bakterienausstrichen auf Festmedien erfolgt bei 37°C im Brutschrank.

### 6.2. Messung der optischen Dichte (oD)

Durch Messung der optischen Dichte bei 580 nm kann das Wachstum einer Bakterienkultur von *E. coli* verfolgt werden. Als Referenz dient das unbeimpfte Medium. Eine  $oD_{580}$  von 0,1 entspricht einem Titer von ca.  $2 \times 10^7$  *E. coli* /ml.

## 7. DNA-Techniken

### 7.1. Isolierung, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA

#### 7.1.1. Plasmid-Isolierung mit Qiagen-Säulen

Die QIAGEN-Säulen enthalten modifiziertes Silicagel (Partikelgröße ca. 0,1 mm) mit hoher Oberflächenladungsdichte. Dieses ermöglicht eine maximale Nukleinsäureadsorption und ein spezifisches Eluieren der doppelsträngigen Plasmid-DNA im Kochsalzgradienten. Nach einem alkalischen Aufschluß der Zellen wird das Lysat auf die Säule gegeben und gereinigt. Zuletzt wird die Plasmid-DNA eluiert und mit Isopropanol/Ethanol gefällt. Für die Zusammensetzung der einzelnen Puffer und eine Beschreibung der Handhabung der Säulen siehe die entsprechenden Handbücher.

### **7.1.2. Ethanolfällung von DNA**

- $\frac{1}{10}$  Volumen einer 5 M NaCl-Lösung zur DNA-Lösung geben
- das 2,5 fache Volumen an 96% Ethanol zugeben und gründlich mischen
- 30-60 min. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubieren
- 10 min. bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet in 70% Ethanol waschen
- Überstand quantitativ entfernen
- Pellet für 10 min. bei  $65^{\circ}\text{C}$  trocknen
- DNA in 10 mM Tris, TE oder Wasser aufnehmen

### **7.1.3. Reinigung von DNA durch Phenolextraktion**

Mit Proteinen verunreinigte DNA-Lösungen können durch Phenolextraktion aufgereinigt werden. Für die Calciumphosphat-Transfektion wird besonders reine DNA benötigt.

- die DNA-Lösung wird mit dem halben Volumen an Phenol versetzt
- Lösung vortexen und 3 min. bei 13.000 rpm zentrifugieren
- mit der wässrigen Phase die Phenolisierung gegebenenfalls wiederholen
- Ethanol-Fällung durchführen

### **7.1.4. DNA-Aufreinigung mit dem PCR-Purification Kit**

Das PCR-Purification Kit von Qiagen nutzt das Prinzip der Säulen zur Plasmid-Isolierung. Es ermöglicht eine Aufreinigung von PCR-Produkten, die größer als 100 Basenpaare (bp) sind, sowie eine Konzentrierung von DNA oder Umpufferung bei Restriktionsverdau mit Enzymen, die inkompatible Puffer benötigen. Es stellt somit eine Alternative zur Ethanol-Fällung dar. Für die Zusammensetzung der einzelnen Puffer und eine Beschreibung der Handhabung des PCR-Purification Kit siehe die entsprechenden Handbücher.

### **7.1.5. Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick-Gel-Extraction Kit**

Mit dem QIAquick-Gel-Extraction Kit können, basierend auf dem Prinzip der Säulen zur Plasmid-Isolierung, DNA-Fragmente nach einem Restriktionsverdau direkt aus dem Agarosegel der Agarosegelelektrophorese isoliert werden, um im Ligationsansatz den Anteil der unerwünschten Ligationen zu verringern. Für die Zusammensetzung der einzelnen Puffer und eine Beschreibung der Handhabung des QIAquick-Gel-Extraction Kit siehe die entsprechenden Handbücher.

### **7.1.6. Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der Konzentration der DNA-Lösungen ist für den Einsatz einer angemessenen DNA-Menge bei Ligationen und besonders für die Transfektion nötig. Die Konzentration kann

durch Messen der Absorption bei 260 nm festgestellt werden. Eine DNA-Lösung mit der optischen Dichte 1 hat eine Konzentration von 50 µg/ml. Oligonukleotide haben einen Entsprechungsfaktor von 33 µg/ml, der aber je nach Basenzusammensetzung variieren kann. Die Verunreinigung der DNA mit Protein kann durch Messung des Absorptionsverhältnisses A260/A280 bestimmt werden, da Proteinverunreinigungen bei 280 nm absorbieren. Für reine Einzelstrang-DNA ist das Verhältnis 1,8, für reine Doppelstrang-DNA 2,0.

## **7.2. Klonierungstechniken (Sambrook et al., 1989)**

### **7.2.1. Restriktionsspaltung**

Für eine Restriktionsspaltung werden 0,3-1 µg DNA in TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O eingesetzt. Geeignete Reaktionsbedingungen werden durch Zugabe entsprechender 10fach konzentrierter Restriktionspuffer hergestellt. Im Normalfall wird 1 µg λ-DNA in einer Stunde von einer Enzymeinheit (Unit) gespalten. Es muß darauf geachtet werden, daß die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz unter 5% liegt, damit es nicht zum Verlust der Hydrolyseaktivität kommt. Da die Glycerinkonzentration im Lagerungspuffer der Enzyme 50% beträgt, sollte der Anteil an Restriktionsenzym im Reaktionsgemisch unter 10% liegen. Ansätze mit 2 oder mehr Restriktionsenzymen werden in der Regel gleichzeitig durchgeführt, wenn die Enzyme im selben Reaktionspuffer arbeiten. Ansonsten wird zwischen den Spaltungen der Reaktionspuffer durch Ethanolfällung oder Anwendung des PCR-Purification Kit gewechselt. Ein zu spaltender Ansatz wird 1-2 h bei optimaler Temperatur für das jeweilige Enzym (meistens 37°C) inkubiert. Anschließend werden die Enzyme für 10 min. bei 65°C inaktiviert. Nach Beendigung der Restriktionsspaltung steht der Ansatz für Klonierungen zur Verfügung oder kann nach einer Zugabe von 1/5 Volumen einer Bromphenolblaulösung auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

### **7.2.2. Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA-Molekülen. Agarose dient als Matrix, in der DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die angelegte Gleichspannung und die Agarosekonzentration beeinflusst. Lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente bewegen sich im Agarosegel umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wird eine 0,8-2,5%ige Agaroselösung (abhängig von dem Molekulargewichtsbereich, in dem eine effektive Auftrennung erfolgen soll) in TAE-Puffer aufgeköcht. Nach Abkühlung auf 60°C wird die Agarose in die vorbereitete Gelkammer gefüllt. Ein Taschenformer wird eingesetzt, der nach dem

vollständigen Auspolymerisieren des Gels wieder entfernt wird. Anschließend wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben werden direkt in die Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung und die Laufzeit sind von den gewünschten Trenneffekten abhängig, in der Regel jedoch 70-150 V für ½ bis 1 h. Die Stromstärke sollte unter 100 mA liegen.

### **7.2.3. Auswertung der Agarosegelelektrophorese**

Die Agarosegele werden nach dem Elektrophoreselauf mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) für 30 min. gefärbt und im UV-Durchlicht (302 nm) fotografiert. Durch den Vergleich mit der Länge bekannter DNA-Fragmente (angegeben in Basenpaaren (bp)) kann die Länge von unbekannten DNA-Fragmenten bestimmt werden. In der Regel wird die 1 kb-DNA-Leiter von BRL benutzt, um eine Eichkurve zu erstellen, mit deren Hilfe die Größe unbekannter DNA-Fragmente ermittelt werden kann. Für DNA-Fragmente, deren Länge 20 kb überschreitet, ist die Agarosegelelektrophorese im konstanten Spannungsfeld zur Größenbestimmung nicht geeignet. Für deren Größenbestimmung kann die PFGE (Pulsfeldgelelektrophorese) verwendet werden.

### **7.2.4. Behandlung mit der alkalischen Phosphatase CIP (Calf Intestinal Phosphatase)**

Durch die Behandlung linearer Vektor-DNA mit der CIP werden die 5'-Phosphatgruppen abgespalten. Da die T4-DNA-Ligase nur 5'-Phosphatenden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wird durch die Behandlung gespaltener Vektor-DNA mit CIP die Religierung des Vektors in der Ligationsreaktion vermieden. Somit steigt der Anteil rekombinanter Plasmide im Ansatz.

- ca. 10 µl Vektor-DNA mit geeignetem Restriktionsenzym spalten, Inaktivierung des Enzyms
- linearisierte Vektor-DNA 2x mit je 2,5 u CIP für je 30 min. in CIP-Puffer inkubieren
- CIP durch Inkubation bei 70°C für 15 min. inaktivieren und durch Phenolextraktion, Anwendung des PCR-Purification Kit oder Agarosegelelektrophorese abtrennen

Danach steht die DNA für Klonierungen zur Verfügung.

### **7.2.5. Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase**

Durch Restriktion gewonnene DNA-Fragmente, die durch die Ligasereaktion miteinander verknüpft werden sollen, werden in einem geeigneten Verhältnis miteinander vermischt. Bei der Ligation eines Vektors mit einer Insert-DNA sollte das molare Verhältnis 1:2 bis 1:3 betragen. In einem kleinen Reaktionsvolumen mit hoher DNA-Konzentration läuft die Ligase-Reaktion am besten ab.

- es wird aufgereinigte DNA (PCR-Purifikation Kit, Ethanolfällung oder Gelextraktion) verwendet
- die Salzkonzentration wird mit 10fachem Ligationspuffer eingestellt
- Zugabe eines entsprechenden Volumens ATP (10 mM in H<sub>2</sub>O mit NaOH neutralisiert)
  - eine ATP-Konzentration von 1mM bevorzugt die Verknüpfung von überstehenden Enden

- bei Ligationen mit glatten Enden sollte die ATP-Konzentration 0,1 mM nicht überschreiten
- Zugabe von T4-DNA-Ligase
  - für eine Ligation überstehender Enden reichen 0,1 u aus
  - für glatte Enden wird 1 u eingesetzt
- für die Inkubation ergeben sich folgende Möglichkeiten
  - ü/N bei 17°C
  - 3-4 h bei Zimmertemperatur
  - ü/N in einer mit 30°C warmem H<sub>2</sub>O gefüllten Thermoskanne bei 4°C

Das Ligationsgemisch kann direkt zur Transformation verwendet werden.

### 7.2.6 Transformation

*E. coli* besitzt kein natürliches Transformationssystem. Durch die Calciumchloridmethode, die wahrscheinlich auf der Inaktivierung membrangebundener Nukleasen, der Komplexierung negativer Ladungen und der Erhöhung der Zellpermeabilität beruht, wird es *E. coli* ermöglicht, Plasmid-DNA passiv aufzunehmen. Durch die Verwendung plasmidkodierter Antibiotikaresistenzen ist es trotz der relativ niedrigen Rate von  $10^7$  *E. coli*-Transformanden pro µg DNA (dies entspricht einer Transformationsrate von  $10^{-5}$ , d.h. jede 100.000. Zelle nimmt das Plasmid auf) möglich, Klone zu isolieren, die das entsprechende Plasmid aufgenommen haben.

#### a) Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

- eine Stationärkultur des zu transformierenden Stammes wird 1:50 in LB verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen
- die Zellen werden für 5 min. bei 6.000 rpm und 0°C zentrifugiert
- das Pellet wird im halben Ausgangsvolumen kaltem CaCl<sub>2</sub> (50 mM) resuspendiert
- Inkubation bei 0°C für 30 min.
- 5 min. bei 5.000 rpm und 2-4°C zentrifugieren
- das Pellet wird in  $\frac{1}{10}$  des Ausgangsvolumens CaCl<sub>2</sub> (50mM) aufgenommen und in 100 µl Portionen zur Transformation verwendet oder bei –20°C eingefroren

#### b) Transformation

- zu 100 µl der kompetenten *E. coli* wird der Ligationsansatz (10-50 µl) gegeben und gemischt
- 30 min. bei 0°C und anschließend 2 min. im Wasserbad bei 42°C inkubieren
- Ansatz auf 1ml mit LB auffüllen
- Inkubation des Transformationsansatzes für mindestens 30 min. bei 37°C
- Zentrifugation und Aufnahme des Pellets im Rücklauf

- auf entsprechende Selektionsplatten (Festmedium LB) ausstreichen und ü/N bei 37°C im Brutschrank inkubieren

### c) Charakterisierung rekombinanter Plasmide

Eine Vorselektion geschieht durch die Kultur der Bakterien in antibiotikahaltigen Medien nach der Transformation, wobei die Antibiotika nach den Resistenzen gewählt werden, für die die erwünschten Plasmide kodieren. Außerdem besteht die Möglichkeit, durch einen Restriktionsverdau des Ligationsansatzes vor der Transformation mit einem Enzym, das nur den religierten, nicht aber den rekombinanten Vektor schneidet, die Effizienz zu erhöhen, da linearisierte Plasmid-DNA um einige Zehnerpotenzen schlechter transformierbar ist. Bei der Klonierung von DNA in pBlue und pGem wird durch Insertion der Fremd-DNA in die multiple Klonierungsstelle des Vektors das lacZ $\alpha$ -Gen zerstört, das für eine funktionsfähige  $\beta$ -Galactosidase in speziellen *E. coli*-Stämmen wie DH5 $\alpha$  notwendig ist. Durch die Inaktivierung des lacZ $\alpha$ -Gens unterbleibt in rekombinanten Klonen die Umsetzung von X-Gal, so daß Kolonien dieser Klone auf X-Gal-haltigem Medium weiß bleiben, während die Kolonien nicht-rekombinanter Klone blau gefärbt sind. Plasmid-tragende *E. coli*-Zellen, die durch Selektion identifiziert worden sind, müssen weiter charakterisiert werden. Dazu wird eine Plasmidisolierung durchgeführt und die gewonnene Plasmid-DNA einer Restriktionsanalyse unterzogen. Durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen läßt sich feststellen, ob die Ligation gelungen ist. Bei kurzen DNA-Fragmenten ist eventuell eine Sequenzierung notwendig.

#### 7.2.7. Sequenzierung von DNA

Es wurde das ABI PRISM System von Perkin Elmer verwendet, das auf der zyklischen fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Sequenzierung von DNA basiert. Es handelt sich hierbei um eine Adaption der Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977). Hierbei werden, ausgehend von einem Oligonukleotid-Primer, mit Hilfe der AmpliTaq DNA-Polymerase, einer Mutante der Taq-Polymerase, nach Art der PCR Kopien neusynthetisiert, die dem Matrizenstrang komplementär sind (Sears et al. 1992). Bei dieser enzymatischen Neusynthese werden neben den vier Desoxynukleotiden auch Fluoreszein-markierte Didesoxynukleotide (ddNTP) in die wachsende DNA-Kette eingebaut, die bei Anregung mit einem Argon-Laser eine jeweils charakteristische Fluoreszenz zeigen. Der Einbau eines ddNTP bewirkt einen Kettenabbruch, da der Polymerase keine OH-Gruppe an der 3'-Position des Pentoseringes zur Verfügung steht. Die Auswertung geschieht im Polyacrylamidgel mit Hilfe einer Photodiode, die sich auf Höhe des Argon-Lasers befindet und die charakteristische Fluoreszenzemission der passierenden DNA-Moleküle mißt.

Die Rohdaten wurden in dieser Arbeit mit der DNA Sequence Analysis Software von Perkin Elmer ausgewertet.

### 7.2.8. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der exponentiellen Amplifikation von definierten DNA-Bereichen. Sie basiert auf einer enzymatischen Duplikation einer DNA-Sequenz durch eine hitzestabile Polymerase, z.B. Taq-Polymerase. Nach der Hitzedenaturierung der DNA können sich zwei Oligonukleotide, die Primer, die jeweils komplementär zu dem (+)-Strang des einen Endes bzw. zu dem (-)-Strang des anderen Endes des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes sind, bei der anschließenden Abkühlung des Ansatzes an die DNA-Matrize anlagern. Die Polymerase erstellt durch Primer-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Danach erfolgt durch eine erneute Hitzedenaturierung eine Trennung der neu synthetisierten Stränge und der Zyklus beginnt von vorn. Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen dieses Zyklus erreicht man eine vieltausendfache Amplifikation des definierten DNA-Bereiches. Die Erhitzung und Abkühlung übernehmen hierbei vollautomatische Geräte. Durch Modifikationen der Primer lassen sich Manipulationen der DNA durchführen, wie die Erzeugung von Mutationen oder die Einführung neuer Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Experimente wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Komponenten des Reaktionsansatzes:

|                                       |                     |        |
|---------------------------------------|---------------------|--------|
| Matrizen-DNA (1:100 verdünnte DNA aus |                     | 0,5 µl |
|                                       | Plasmid-Isolierung) |        |
| Primer 1                              | (5 pmol/µl)         | 2 µl   |
| Primer 2                              | (5 pmol/µl)         | 2 µl   |
| dNTP's                                | (jeweils 5 mM)      | 2 µl   |
| PCR-Puffer                            | (10x von Gibco)     | 3 µl   |
| MgCl <sub>2</sub>                     | (15 mM)             | 3 µl   |
| H <sub>2</sub> O                      |                     | 17 µl  |
| Taq-Polymerase (5u/µl)                |                     | 0,5 µl |

Der Ansatz wurde in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll behandelt:

1. 94°C für 1:30 min.
2. 94°C für 0:45 min.
3. 55°C für 1:00 min.
4. 72°C für 0:45 min
5. Fortfahren bei 2. und 29x Wiederholung dieses Zyklus

## 8. Techniken der eukaryontischen Zellkultur (Lee, 1991)

### 8.1. Vorbemerkungen

Die eukaryontischen Zellen in dieser Arbeit wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlendioxidspannung in dem für die entsprechende Zelllinie angemessenen Medium kultiviert, d.h. CHO-K1 Zellen in GMEM, N2A-Zellen in DMEM und Zerebellum-Zellen in X1, jeweils mit wechselnden Zusätzen. Die verwendeten Zelllinien wurden sämtlich als Monolayer in Kulturflaschen verschiedener Größe kultiviert. Die verwendeten Medien, Zusätze und Lösungen wurden vor Verwendung mit Millipore-Filtern der Größe 0,22 µm sterilisiert und vor Verwendung 48 h bei 37°C inkubiert, um die Sterilität zu testen. Alle Manipulationen an offenen Medien und Lösungen wurden unter einer sterilen Arbeitsbank vorgenommen.

### 8.2. Passagieren von Zellen

Zellen werden fast bis zur Konfluenz kultiviert. Das Passagieren dient dem Aufteilen der Zellen einer Kulturflasche auf mehrere, eventuell größere Flaschen. Dabei sollte das Produkt des Verhältnisses der Grundfläche der Ausgangsflasche zur Zielflasche und dem Anteil der transferierten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen der Ausgangsflasche  $\frac{1}{2}$  -  $\frac{1}{5}$  betragen.

- das gesamte Medium der zu passagierenden Kultur wird abgezogen
- die verbliebenen, adhärenen Zellen werden zweimal mit HBSS<sup>-</sup> gewaschen
- Übersichtung der Zellen mit der geringsten möglichen Menge T/E und Inkubation für 2 min bei 37°C.
- die Zellen werden durch Schlagen der Flaschenkante an die Arbeitsbank von der Grundfläche abgelöst
- Zugabe von ca. 7 ml des verwendeten Mediums und Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min.
- das Medium wird abgezogen und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert.
- je nach gewünschter Verdünnung wird die Suspension auf entsprechende Flaschen mit vorgewärmtem Medium verteilt

### 8.3. Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkultur

Die Zellzahl kann mit der verbesserten Neubauer-Kammer bestimmt werden. Die Zellen werden wie bei der Passage abgelöst und in Medium verdünnt. Zur Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen können zu 25 µl der Suspension 25 µl Trypanblau zugegeben werden, welches die nicht lebenden Zellen anfärbt. Die Suspension wird in die Zählkammer gegeben und die Zellzahl in je 4

der ausgezeichneten Quadrate (die jeweils aus 16 Quadraten bestehen) bei 100facher Vergrößerung bestimmt. Die Konzentration der Suspension ergibt sich als:

$$\text{Zellen/ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Quadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

## **9. Stabile Calciumphosphattransfektion (CaPO<sub>4</sub>-Transfektion) und Produktion von Proteinen in CHO-K1-Zellen**

### **9.1. Vorbemerkungen**

Die Transfektion dient der Einführung von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CaPO<sub>4</sub>-Transfektion verwendet (Chen und Okayama, 1987), um eine stabile Expression des neu konstruierten Fusionsproteins in CHO-Zellen zu erreichen. Die CaPO<sub>4</sub>-Transfektion ist besonders geeignet, da sie die Aufnahme mehrerer Kopien der gewünschten DNA pro Zelle erlaubt und somit eine vermehrte Expression mit erhöhter Ausbeute des gewünschten Proteins ermöglicht. Bei der Transfektion wird durch vorsichtiges Mischen einer CaCl<sub>2</sub> enthaltenden DNA-Lösung mit einer mit HEPES gepufferten Lösung ein Präzipitat aus CaPO<sub>4</sub> und DNA gebildet, das an die Oberfläche der Zellen adhäriert. Abhängig von der verwendeten Zelllinie nehmen bis zu 10% der Zellen das Präzipitat auf. Die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen erfolgte in dieser Arbeit durch das weiter unten beschriebene Glutamin-Synthetase-Amplifikations-System.

### **9.2. Transfektion**

Hier wird die CaPO<sub>4</sub>-Transfektion von CHO-K1-Zellen beschrieben, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Konzentration der DNA, die Anzahl der ausplattierten Zellen und die Inkubationszeit sind für dieses Experiment optimiert und können für andere Zelllinien oder Konstrukte abweichen.

#### **a) Vorbereitungen**

- ein Kryotube CHO-K1-Zellen auftauen und in eine T<sup>25</sup>-Flasche überführen
- bei 90% Konfluenz Zellen  $\frac{1}{10}$  in T<sup>75</sup>-Flaschen passagieren
- 2-3 Tage wachsen lassen bis zu 50-80% Konfluenz (die Zellen sollten vor der Transfektion

nie 100% Konfluenz erreichen)

- Zellen  $\frac{1}{6}$  passagieren und bis zu 50% Konfluenz wachsen lassen

**b) 0. Tag (24h vor der Transfektion)**

- Zellen in Kulturschalen von 9 cm Durchmesser passagieren: ca.  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro Schale
- Zellen 20-22 h kultivieren; sie sollten sich zur Transfektion in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden und gleichmäßig auf die Kulturschale verteilt sein

**c) 1. Tag (Transfektion)**

- Stammlösungen: 2x HBS, 2M  $\text{CaCl}_2$ , 15% Glycerol,  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  auf Raumtemperatur, Medien auf 37°C vorwärmen
- in einem sterilen Eppendorf-Cup ansetzen:

$62 \mu\text{l}$  2M  $\text{CaCl}_2$   
 $15 \mu\text{g}$  DNA  
ad  $500 \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$
- als Negativ-Kontrolle wird eine Mock-Transfektion ohne DNA durchgeführt, als Positiv-Kontrolle kann eine Transfektion mit DNA aus einer erfolgreichen Transfektion durchgeführt werden
- das DNA- $\text{CaCl}_2$ -Gemisch wird tropfenweise auf  $500 \mu\text{l}$  2x HBS gegeben, während mit einer Pasteurpipette das Gemisch aufgeschäumt wird, wobei sich ein Präzipitat bildet
- das Gemisch wird für 5-10 s gevortext
- das Präzipitat wird 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert
- die Zellen werden 1x mit serumfreiem GMEM-S gewaschen und dann 3 ml serumfreies GMEM-S auf die Zellen gegeben
- das Präzipitat wird unter leichtem Schwenken der Kulturschale tropfenweise auf die Zellen gegeben
- die behandelten Kulturen werden 3,5 – 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert
- das Präzipitat-Gemisch wird abgezogen
- Zugabe von 3 ml 15% Glycerol in HBS und Inkubation bei Raumtemperatur für weniger als 1 min.
- 10 ml serumfreies GMEM-S zugeben und sofort wieder abziehen
- 10 ml GMEM-S + 10% dFCS zugeben
- Inkubation für 24 h bei 37°C, dann Beginn der Selektion

**9.3. Selektion stabiler Klone mit dem**

**Glutamin-Synthetase-Amplifikations-System**

Die Selektion stabiler Klone wurde in dieser Arbeit mit dem Glutamin-Synthetase-Amplifikations-System erreicht (Cockett et al., 1990). Dabei wird die zu exprimierende cDNA in die multiple Klonierungsstelle des Vektors pEE14 (Bebbington, 1991; Simmons, 1993) kloniert, so daß sie durch den Promoter-Enhancer des humanen Cytomagalievirus (CMV) exprimiert wird. In dieser Arbeit wurde allerdings ein modifizierter pEE14 verwendet, der außerdem für das Fragment crystallizable (F<sub>c</sub>) eines humanen IgG<sub>1</sub> kodierende genomische DNA enthielt. Das Plasmid pEE14 enthält außerdem ein für die Glutamin-Synthetase kodierendes Gen, das als dominanter Selektionsmarker in CHO-K1-Zellen verwendet werden kann. Die Glutamin-Synthetase, die in Zellen, die das gewünschte Plasmid enthalten, exprimiert wird, verleiht diesen Zellen bei Kultivierung in glutaminfreiem Selektionsmedium eine Resistenz gegen den Glutamin-Synthetase-Inhibitor l-Methionin-Sulfoximin (MSX). Durch Kultivierung der Zellen in Medien mit steigender MSX-Konzentration können Klone mit einer maximalen Zahl an Kopien der gewünschten DNA selektioniert werden.

Die Selektion beginnt 24 h nach der Transfektion mit dem Abziehen des Mediums und der Zugabe des Selektionsmediums (GMEM-S + 10% dFCS + 25 µM MSX).

- nach 3-4 Tagen und dann alle 4-5 Tage Wechsel des Selektionsmediums
- nach ca. 2 Wochen Vergleich der Koloniezahl auf den Kulturschalen mit der Mocktransfektion, die 1-5 Kolonien zeigen sollten, mit den Kulturschalen der Transfektion, in denen 20-30 Kolonien erkennbar sein sollten
- bei Erreichen einer Größe von 2 mm (ca. 300 Zellen) können die Zellen mit Hilfe von Klonierungsringen in eine Kulturschale (Durchmesser 1 cm) überführt werden:
  - markieren der unter dem Mikroskop identifizierten Kolonien an der Außenseite der Kulturschale (pro Konstrukt sollten 25-30 Kolonien kultiviert werden)
  - die Kulturschalen werden 2x mit HBSS<sup>-</sup> gewaschen
  - ein Klonierungsring, dessen Öffnung mit mittelgradig viskosem Silikon beschichtet wurde, wird auf eine Kolonie gesetzt
  - Zugabe von 10 µl 37°C warmem T/E in den Klonierungsring und Inkubation für 2 min
  - Mit 60 µl GMEM-S + 10% dFCS die Zellen resuspendieren und in eine Kulturschale (1 cm Durchmesser) überführen und bei 37°C inkubieren
- nach 24 h Ersatz des Mediums durch Selektionsmedium und Kultivierung bis zur Konfluenz
- das Selektionsmedium wird abgezogen, 2 ml zugegeben und bis zur Gelbfärbung des Mediums kultiviert
- der Überstand wird abgezogen und durch proteinbiochemische Methoden (siehe dort) diejenigen Klone identifiziert, die das gewünschte Protein exprimieren

- die positiven Zellen werden in eine T<sup>25</sup>-Kulturflasche passagiert und in GMEM-S + 10% dFCS kultiviert
- nach 24 h Wechsel des Mediums zu Selektionsmedium
- Aufzucht der Kultur und Einfrieren von Zellen für spätere Experimente

#### **9.4. Produktion von Proteinen in CHO-K1-Zellen**

Zur Produktion des Fusionsproteins werden die selektionierten CHO-K1-Zellen in Selektionsmedium kultiviert und passagiert, bis eine Menge von 20 T<sup>175</sup>-Kulturflaschen erreicht ist. Da die Aufreinigung mit Protein A erfolgt, das unselektiv an IgG bindet (siehe Methoden der Proteinbiochemie), muß die Produktion in Medium durchgeführt werden, das nur sehr geringe Mengen von IgG enthält:

- bei Erreichen von 20 T<sup>175</sup>-Kulturflaschen während des Passagierens ( $\frac{1}{4}$ ) Wechsel des Mediums zu GMEM-S ohne FCS
- Kultivierung der Zellen bis zur Gelbfärbung des Mediums
- Medium abziehen und für 15 min. bei 5.000 rpm zentrifugieren
- Überstand abziehen und für 15 min. bei 5.000 rpm zentrifugieren
- Lagerung bei 4°C bis zur Aufreinigung über Protein A-Sepharose (siehe Proteinbiochemie)

### **10. Techniken der Proteinbiochemie**

#### **10.1. Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem BCA-System**

Die BCA-Methode dient der Bestimmung der Eiweißkonzentration einer Lösung. Sie beruht auf einer Kombination der Reaktion von Kupfer(I)-Ionen und Peptidbindungen in einer alkalischen Lösung, die zur Bildung eines Komplexes führt, der bei 546 nm absorbiert (Methode nach Biuret), mit der Ermittlung von Cuproionen anhand von Bichinchoninsäure (BCA), wodurch ein Absorptionsmaximum bei 562 nm entsteht. Die Analyse kann in einem Bereich zwischen 1 und 2000 µg/ml verwendet werden. In dieser Arbeit wurde der BCA-200 Protein Assay Kit von Pierce verwendet. Für die Handhabung siehe entsprechende Handbücher.

#### **10.2. Aceton-Fällung**

Die Acetonfällung dient der Aufreinigung von Proteinlösungen bzw. dem Pufferwechsel. In dieser Arbeit diente sie dem Wechsel von Ripa-Lysierpuffer zum Reswelling-Buffer für die 2-D Gelelektrophorese.

- Zugabe von Aceton zu der zu fällenden Lösung im Verhältnis Lösung : Aceton von 1 : 7
- Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ü/N
- Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 min. bei  $4^{\circ}\text{C}$
- Überstand abnehmen und Pellet für 5 – 10 min. trocknen
- Pellets im gewünschten Puffer aufnehmen

### **10.3. Aufreinigung von $F_c$ -gekoppelten Fusionsproteinen mit Protein A**

#### **10.3.1. Vorbemerkungen**

In dieser Arbeit wurde zur Aufreinigung des Fusionsproteins die Affinitätschromatographie mit Protein A angewendet (Ey et al., 1978). Bei der Affinitätschromatographie wird das aufzureinigende Molekül spezifisch und reversibel an ein komplementär bindendes Molekül (Ligand) gebunden, das kovalent an einen unlöslichen Hilfsstoff (Matrix) gebunden ist. Die Lösung wird unter Bedingungen appliziert, die die Bindung an den immobilisierten Liganden fördern. Nach Waschen zur Entfernung der unerwünschten Moleküle werden die experimentellen Bedingungen geändert, um die Elution des aufzureinigenden Moleküls zu fördern. In dieser Arbeit wurde Protein A-Sepharose CL-4B von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Dabei ist die Matrix Sepharose CL-4B, d.h. geperlte 4%ige Agarose, die nur geringe unspezifische Adsorption zeigt und durch die perlförmige Struktur gute Fließeigenschaften hat. Daran gebunden ist der Ligand Protein A. Protein A ist ein Oberflächenmolekül des humanpathogenen Bakteriums *Staphylokokkus aureus*, das stark und spezifisch an den  $F_c$ -Teil des IgG mehrerer Säugetierarten, insbesondere des humanen IgG, bindet, wobei die Antigenbindungsstellen frei bleiben. Es bindet den größten Teil des  $\text{IgG}_1$ , fast das gesamte  $\text{IgG}_{2a}$ ,  $\text{IgG}_{2b}$ ,  $\text{IgG}_3$  und etwas IgM. Daher ist es für die Aufreinigung des in dieser Arbeit produzierten, den  $F_c$ -Teil von humanem  $\text{IgG}_1$  enthaltenden, Fusionsproteins geeignet.

#### **10.3.2. Präzipitation von $F_c$ -enthaltenden Fusionsproteinen mit Protein A-Sepharose**

Die Protein A-Sepharose-Präzipitation dient der Aufreinigung kleiner Mengen von Zellkulturüberstand für die Verwendung in SDS-PAGE. Beginn am Vorabend der Präzipitation mit der Vorbereitung von 50% Protein A-Sepharose CL-4B:

- benötigte Menge Protein A-Sepharose-Pulver in PBS (je 100 mg pro 10ml) bei  $4^{\circ}\text{C}$  ü/N aufschwämmen
- 5 min. bei 3.000 rpm zentrifugieren
- Pellet in dem Pellet entsprechendem Volumen PBS aufnehmen

Präzipitation:

- 10  $\mu\text{l}$  50% Protein A-Sepharose zu 2 ml Zellkulturüberstand geben und ü/N bei  $4^{\circ}\text{C}$  schwenken
- 5 min. bei 6.000 rpm zentrifugieren

- Pellet in 1ml einer Lösung von 0,1 M Tris (pH 8,0), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA aufnehmen
  - 5 min. bei 6.000 rpm zentrifugieren
  - Pellet mit 1 ml 25 mM Tris (pH 6,8) waschen
  - Pellet in 20 µl Probenpuffer für SDS-PAGE aufnehmen und 5 min. bei 100°C kochen
- Suspension kann jetzt für SDS-PAGE verwendet werden

### **10.3.3. Aufreinigung größerer Mengen von Überstand mit Protein A-Sepharose**

Zur Aufreinigung größerer Mengen von Überstand werden mit Protein A-Sepharose gefüllte Säulen verwendet. Der Vorgang des Beladens der Säulen und des Eluierens des Proteins wird mit dem ECONO System von Biorad gesteuert. Eine Pumpe ermöglicht die stufenlose Verstellung der Tropfgeschwindigkeit, ein Photometer die grobe Konzentrationsbestimmung des Eluates. Dabei hat 1 cm Säulenbettvolumen die Kapazität ca. 20 mg Protein zu binden. 1 cm Säulenbettvolumen erfordert dabei den Einsatz von 300 mg Protein A-Sepharose

#### **a) Vorbereiten der Säule**

- 300 mg Protein A-Sepharose in 10 ml PBS aufschwemmen und ü/N bei 4°C schwenken
- Sepharose für 30 min. sedimentieren lassen, Überstand abziehen und erneut 10 ml PBS zugeben
- dies 3x wiederholen und dann Suspension in die Säule füllen und sedimentieren lassen

#### **b) Aufreinigung des Proteins**

- Zellkulturüberstand (siehe 9.4.) mit einer Geschwindigkeit von 0,25 ml/h auf die Protein A-Sepharosesäule geben
- Säule 2x mit dem 20fachen Säulenbettvolumen waschen bei 0,5 ml/h bis sich die Anzeige des Photometers nicht mehr verändert (Festsetzung dieses Wertes als Ausgangswert)
- Beginn der Elution mit 100 mM Natriumacetat (pH 4,0) bei 0,5 ml/h
- je 7 ml des Eluates in 1 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) auffangen
- pH des Eluates mit Hilfe von Indikatorpapier messen und auf 7,4 mit HCl und NaOH einstellen
- Elution fortsetzen bis Anzeige des Photometers wieder den Ausgangswert erreicht hat
- Dialyse des Eluates gegen 4 l PBS pH 7,4
- Konzentrierung des Eluates mit Zentrifugenfiltern
- Bestimmung der Konzentration mit dem BCA-System

## **10.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)**

### **10.4.1. Vorbemerkungen**

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Methode basiert auf der Bindung des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) an die durch Hitzebehandlung denaturierten Proteine. Dabei ist die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle dem Molekulargewicht der Polypeptide proportional, was die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld ermöglicht, wobei die Ladung der Aminosäurereste der Polypeptide wegen der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle vernachlässigt werden kann. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke in Polyacrylamid mit der Laufstrecke bekannter Proteine. In dieser Arbeit wurde die Benchmark Protein Ladder, bzw. die Benchmark Prestained Protein Ladder von Gibco verwendet.

#### **10.4.2. Durchführung**

##### **a) Vorbereiten der Gele**

- Gelkammern nach Herstellerangaben vorbereiten (in dieser Arbeit wurde das Miniprotean System von BioRad verwendet)
- Trenngelpuffer ansetzen und direkt in die Gelkammer (in dieser Arbeit ca. 5 ml Trenngelpuffer pro Gel) pipettieren sowie mit H<sub>2</sub>O überschichten
- Polymerisation für 0,5 - 1 h abwarten
- Sammelgelpuffer ansetzen und direkt in die Gelkammer pipettieren (in dieser Arbeit ca. 1 ml pro Gel) sowie einsetzen eines Kamms zur Taschenbildung bzw. freilassen eines 0,5 cm breiten Saumes für die 2-D Gelelektrophorese
- Polymerisation für 0,5 - 1 h abwarten
- Gelhalter in die Laufkammer einsetzen und Kompartimente mit SDS-Laufpuffer füllen

##### **b) Vorbereiten der Proben und Durchführung der Elektrophorese**

- zu je 20 µl Probe werden 5 µl Probenpuffer gegeben
- Inkubation für 2 min. im Wasserbad bei 100°C
- Zentrifugation für 2 min. bei 10.000 rpm
- Kamm aus den Gelen entfernen und Proben sowie Molekulargewichtsmarker mit einer Hamiltonpipette in die Geltaschen pipettieren
- Elektrophorese mit 20 mA je angeschlossenem Gel starten, bis die Lauffront das Trenngel erreicht, dann erhöhen auf 25 mA
- Elektrophorese je nach erwünschter Auftrennung für 0,5 – 2 h fortsetzen
- Gelhalterung lösen und Gel mit Coomassie- oder Silberfärbung anfärben oder für Western Blot verwenden

#### **10.5. Anfärben von Polyacrylamidgelen**

### 10.5.1. Coomassiefärbung (Diezel et al., 1972)

- Proteingel für 20 min. in der Fixierungslösung C inkubieren
- Färbelösung A und B 1 : 1 mischen und das Gel für 1 h darin färben
- Gel kurz mit Wasser abspülen
- ca. 1 h in Entfärbelösung C inkubieren, Lösung eventuell wechseln

### 10.5.2. Silberfärbung (Morrissey, 1981)

- Proteingel für 30 min. in Fixierungslösung S inkubieren
- Gel für 30 min. in Inkubationslösung schwenken
- 3x für je 5 min. in  $H_2O_d$  waschen
- Gel für 20 min. in Versilberungslösung inkubieren
- für 1 min. in Entwicklungslösung S entfärben, dann Lösung abziehen, erneut Entwicklungslösung S zugeben und schwenken, bis angemessene Entwicklung erreicht ist (3 – 7 min.)
- Reaktion mit der Stopplösung für 10 min. inkubieren
- 3x für je 5 min. in  $H_2O_d$  waschen
- Inkubation in der Trocknungslösung für 30 min.
- bei Raumtemperatur trocknen

## 10.6. Western Blot (Towbin et al., 1979; Schneppenheim et al., 1991)

### 10.6.1. Vorbemerkungen

Der Western Blot dient der Identifikation spezifischer Antigene durch monoklonale oder polyklonale Antikörper. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE werden sie elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran überführt, an deren Oberfläche sie gebunden werden, wo sie für Reaktionen mit Antikörpern zur Verfügung stehen. Alle übrigen Bindungsstellen der Membran werden durch eine Blockierungslösung, in dieser Arbeit 2-4%ige Milchpulverlösung, blockiert. Nach Applikation des ersten Antikörpers wird die Membran gewaschen und die Antigen-Antikörperkomplexe werden mit Hilfe der horseradish peroxidase (HRPO) identifiziert, die an den sekundären Anti-IgG-Antikörper gebunden ist. Hierzu wird der Blot erneut gewaschen und dann mit einer Luminol und p-Iodophenol enthaltenden Lösung benetzt. Die HRPO oxidiert Luminol, wobei blaues Licht emittiert wird. Die Lichtemission wird durch p-Iodophenol verstärkt. Das Licht färbt einen Film, nach dessen Entwicklung die Lage der Antigen-Antikörperkomplexe bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wurde der Western Blot zum einen verwendet, um das produzierte Fusionsprotein zu identifizieren, zum anderen bei dem Versuch, die Tyrosinphosphorylierung in N2A-Zellen nach Stimulation mit hCHL1-Fc nachzuweisen.

### 10.6.2. Durchführung

#### a) Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran

Zunächst Durchführung einer SDS-PAGE unter Verwendung einer Prestained Protein Ladder.

- Equilibrierung des Polyacrylamidgels für 30 min. in Blot Buffer bei Raumtemperatur
- Zusammenbau der Transferkassette (sollte unter Überschichtung mit Blot Buffer geschehen, um Einschluß von Luftblasen zu vermeiden)

Schichtung von der Kathode zur Anode:

- Schwamm
- Filterpapier (Whatman), in dieser Arbeit 10 cm x 8 cm
- Polyacrylamidgel
- Nitrozellulosemembran, in dieser Arbeit 8 cm x 6,5 cm (sollte vorher für 15 min. in Blot Buffer equilibriert werden)
- Filterpapier (Whatman)
- Schwamm
- Verschuß der Transferkassette, Einführen in die Blot-Kammer und Überschichten mit Blot Buffer
- Elektrophoretischer Transfer der Proteine auf die Membran durch Anlegen einer Spannung von 60 – 100 V für 1 – 2 h oder von 14 V ü/N jeweils bei 4°C
- Transferkassette öffnen und Membran zur Antikörperapplikation entfernen, evtl. auf das Gel zur Einschätzung der Transfereffizienz Coomassie- oder Silberfärbung anwenden

#### b) Proteindetektion und –visualisation durch Antikörperapplikation

- Membran mit Blockierungspuffer (ca. 10 – 15 ml) überschichten und für 30 – 60 min. bei RT unter konstantem Schütteln inkubieren
- Blockierungspuffer abziehen und 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung in Blockierungspuffer zugeben sowie für 60 min. bei RT unter konstantem Schwenken inkubieren
- Membran 5x mit 20 ml TBS für je 5 min. waschen
- Zugabe des 2. Antikörpers in entsprechender Verdünnung in Blockierungspuffer und Inkubation bei 4°C ü/N unter konstantem Schwenken
- Membran 5x mit 20 ml TBS für je 5 min. waschen
- Zugabe von je 2 ml frisch zubereitetem Luminol-Reagens und Inkubation für 1-2 min.
- Membran mit Plastikfolie bedecken und Verwendung des Filmpapiers in Dunkelheit unter Rotlicht für verschiedene Zeiträume
- Entwicklung des Films mit den entsprechenden Reagenzien

## 10.7. Präparation von Hirnhomogenat

Für den Western Blot zur Identifikation des produzierten Fusionsproteins wurde Hirnhomogenat der Maus benötigt.

- mechanische Homogenisierung von 10 g Gehirn mit 20 ml Lysis-Puffer A
- Zentrifugation für 10 min. bei 4°C bei 1000 g
- erneute Zentrifugation des Überstands für 1 h bei 4°C bei 100.000 g. Der erhaltene Überstand bildet die lösliche Fraktion
- Resuspension der Pellets der 1000 g-Zentrifugation in 10 ml Lysis-Puffer B und Solubilisierung bei 4°C ü/N
- Zentrifugation für 1 h bei 4°C bei 100.000 g. Der Überstand bildet die Membranfraktion
- Lagerung der Fraktionen bis zur Verwendung bei -20°C

## **11. Primärzellkultur von Körnerzellen aus dem Cerebellum der Maus (Schnitzer und Schachner, 1981; Keilhauer et al., 1985)**

### **11.1. Vorbemerkungen**

Die Aktivität des produzierten Fusionsproteins wurde durch Neuritenwachstumsexperimente mit Körnerzellen aus den Cerebella 5-7 Tage alter Mäuse des Typs C57 black bestimmt. Diese Methode wurde von Keilhauer et al. (1985) beschrieben und in zahlreichen Versuchen zur Bestimmung der Funktion neuraler Zelladhäsionsmoleküle in verschiedenen Variationen verwendet. Es werden hierzu die Cerebella der Mäuse präpariert, die einzelnen Zellen durch Behandlung mit Trypsin und Pipettieren mit Pipetten absteigenden Durchmessers voneinander separiert, in X1-Medium aufgenommen und dann in Kulturschalen gegeben, die vorher jeweils entweder mit PLL und dem zu testenden Protein oder PLL allein beschichtet wurden. In einigen Experimenten wurde das zu testende Protein zwei Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen hinzugegeben, um auch die Aktivität des Proteins in Lösung zu testen ohne dabei die initiale Adhäsion der Zellen zu stören. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert, mit Toluidinblau angefärbt und dann im Phasenkontrastmikroskop betrachtet bzw. ihre Neuritenlänge mit Hilfe des KS400-Systems der Firma Zeiss bestimmt. Als Kontrolle wurden jeweils PLL allein bzw.  $F_c$  von humanem IgG<sub>1</sub> allein verwendet, das unter Verwendung des ImmunoPure F<sub>ab</sub> Preparation Kit von Pierce aus humanem IgG<sub>1</sub> hergestellt wurde.

### **11.2. Beschichtung von Coverslips und 96-well-plates**

In dieser Arbeit wurden für die Experimente coverslips von 11 mm Durchmesser sowie 96-well-plates verwendet.

Für Experimente mit beschichteten Coverslips:

- 48 h vor dem Experiment Coverslips mit 0,025% Poly-L-Lysin (PLL) für 24 h bei 4°C inkubieren
- 3x mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> waschen
- für 24 h bei 4°C mit dem entsprechenden Protein der gewünschten Konzentration inkubieren
- 2x mit HBSS<sup>-</sup>, dann 1x mit X1 waschen

Für Experimente mit löslichem Protein:

- 24 h vor dem Experiment Coverslips mit 0,025% Poly-L-Lysin (PLL) für 24 h bei 4°C inkubieren
- 2x mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 1x mit X1 waschen

### **11.3. Präparation von Körnerzellen aus dem Cerebellum der Maus**

In dieser Arbeit wurden 5-7 Tage alte (P5 – P7) Mäuse des Typs C57B6/J verwendet. Pro Versuch werden 3 – 5 Cerebella benötigt.

- Entnahme der Cerebella mit sterilen Instrumenten (Vor Entnahme wird der abgetrennte Kopf kurz mit 70% Ethanol desinfiziert)
- die Cerebella werden in 4°C kaltem HBSS<sup>-</sup> aufgenommen
- Entfernung der Meningen und des Plexus choroideus
- jedes Cerebellum wird in drei Teile geschnitten und trocken in ein Röhrchen überführt
- Zugabe von  $\frac{1}{3}$  ml Trypsin/DNAse pro Cerebellum und Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur
- Überstand abziehen und 3x mit 5 ml X1 waschen
- Zugabe von  $\frac{1}{3}$  ml DNAse pro Cerebellum
- Separation der Körnerzellen durch Pipettieren mit Pasteurpipetten von abnehmendem Innendurchmesser (ca. 5 – 7 Passagen pro Pipette)
- auf 10 ml mit X1 auffüllen
- Zentrifugation bei 100 g für 10 min. bei 4°C
- Körnerzellen in 2-5 ml X1 aufnehmen
- Bestimmung der Konzentration der lebenden Zellen durch Trypanblaufärbung und Auszählen mit der verbesserten Neubauerkammer

## 11.4. Bestimmung des Neuritenwachstums

### a) Kultivierung

Für die Bestimmung des Neuritenwachstums wurden 5.000 – 20.000 Körnerzellen pro Well auf einem 96-well-plate in je 100  $\mu$ l X1 ausplattiert, nachdem die Wells 3x gewaschen wurden (siehe 11.2.). Es wurden verschiedene Konzentrationen von hCHL1-Fc getestet. Als Negativkontrolle wurde F<sub>c</sub> von humanem IgG<sub>1</sub> verwendet, das jeweils in denselben Konzentrationen wie hCHL1-Fc aufgetragen wurde. In einem weiteren Experiment wurde der Effekt von hCHL1-Fc mit dem anderer Zelladhäsionsmoleküle verglichen.

Die Körnerzellen wurden für 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 24 h:

- Zugabe von 10  $\mu$ l Glutaraldehyd (25% w/v) pro Well (100  $\mu$ l) und Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur
- 3x vorsichtig mit PBS waschen
- Zugabe von je 50  $\mu$ l Toluidinblaulösung und Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur
- 3 – 5x mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> waschen und für 24 h bei Raumtemperatur trocknen

## **b) Auswertung**

Die Neuritenlänge wurde im Phasenkontrastmikroskop (KONTRON) bei 320facher Vergrößerung mit dem KS400-System der Firma Zeiss bestimmt. Es wurde jeweils die Summe der Längen aller Neuriten eines Neurons bestimmt, wobei nur Neurone berücksichtigt wurden, deren Perikarya und Neuriten keinen Kontakt zu Perikarya oder Neuriten anderer Neurone hatten. Pro Kulturschale wurden 50 Neurone in vorher ausgewählten Gesichtsfeldern vermessen. Je Versuchsbedingung wurden in verschiedenen Experimenten 3-4 Kulturschalen ausgewertet und die durchschnittliche Gesamtlänge aller Neuriten eines Neurons mit der jeweiligen Kontrolle verglichen. Dazu wurde der Mann Whitney U-Test (Claus und Ebner, 1977) verwendet, da sich die Standardabweichung von Experiment und Kontrolle zu sehr unterschieden.

## **12. 2-D-gelelektrophoretische Auftrennung von Zellysaten stimulierter N2A-Zellen (Görg et al., 1985; Görg et al., 1988)**

### **12.1. Vorbemerkungen**

Die 2-D Gelelektrophorese ist eine in zunehmenden Maße verwendete Methode zur Analyse komplexer Proteinlösungen, die aus Zellen, Geweben oder anderen biologischen Materialien extrahiert wurden. Diese Technik trennt die Proteine unter Verwendung zweier unterschiedlicher Eigenschaften der Proteine. Im ersten Schritt, der ersten Dimension, werden die Proteine durch isoelektrische Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt, während der zweite Schritt, die SDS-PAGE, eine weitere Auftrennung nach Molekulargewicht bringt. Jeder Punkt auf dem resultierenden 2-dimensionalen Gel entspricht dann einer einzelnen Proteinspezies, wobei tausende verschiedener Proteine aufgetrennt und Unterschiede in der Menge bestimmt werden können. Während in der ursprünglichen Methode, beschrieben von O'Farrell (1975) und Klose (1975), die Auftrennung in der ersten Dimension durch Ampholyte enthaltende Polyacrylamidgele erreicht wurde, deren Ampholyte im elektrischen Feld einen pH-Gradienten erzeugten, wurde in dieser Arbeit das Multiphor II Elektrophorese System mit Immobiline Dry Stripes verwendet, dessen Auftrennung in der ersten Dimension auf immobilisierten pH-Gradienten beruht. In dieser Arbeit sollten die der Signaltransduktion des Zelladhäsionsmoleküls L1 zugrundeliegenden Mechanismen weiter erforscht werden. Dazu wurden Neuroblastomzellen einer Mäusezelllinie (N2A) mit dem Antikörper AK 557.B6 stimuliert, einem in Kaninchen hergestellten Antikörper, der sich in früheren Experimenten (Appel et al., 1995) als effektiv in der Stimulation der durch L1 vermittelten Signaltransduktion erwiesen hatte. Die stimulierten Zellen

wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation lysiert und das Lysat in der 2-D Gelelektrophorese verwendet. Die resultierenden Polyacrylamidgele wurden entweder mit der Silberfärbung angefärbt oder im Western Blot mit dem Antiphosphotyrosin-Antikörper 4G10 verwendet und das Ergebnis mit der jeweiligen Kontrolle verglichen.

## **12.2. Kultivierung der N2A-Zellen (Rathjen und Rutishauser, 1984)**

- 3 Tage vor dem Experiment ausplattieren von je  $1,4 \times 10^6$  N2A-Zellen in DMEM + 5% FCS + P/S in Kulturschalen (50 mm Durchmesser)
- zwei Stunden vor der Stimulation Medium absaugen und je 2 ml DMEM ohne FCS und ohne P/S zugeben (die Zellen sollten 60-80% Konfluenz erreicht haben)

## **12.3. Stimulation und Lyse der Zellen**

- Inkubation der Zellen mit AK 557.B6 bzw. IgG vom Kaninchen der Konzentration 200 µg/ml in einem Volumen von 2 ml DMEM ohne FCS und P/S für 1 min. bis 3 h bei 37°C
- mit 2 ml eiskaltem PBS pro Schale waschen
- Zugabe von 400 µl Ripa-Lysierpuffer und Schwenken der Kulturschalen bei 4°C für 60 min.
- lysierte Zellen mit Hilfe eines Polishmans abschaben und in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführen
- Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 min. bei 4°C und Überstand abnehmen
- BCA-Proteinbestimmung des Überstandes (es werden im folgenden jeweils gleiche Proteinmengen der stimulierten Zellen und der Kontrolle eingesetzt)
- Acetonfällung des Proteinlysats und aufnehmen des Pellets in 150 µl Reswelling-Buffer

## **12.4. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)**

Für die 1. Dimension wurden Immobiline Dry Stripes mit einer Länge von 7 cm und einem pH-Gradienten von 3 – 10 bzw. 4 – 7 von Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Es wurden identische Mengen Protein aufgetragen, im allgemeinen 400 – 500 µg.

- Streifen mit je 150 µl Protein-Pufferlösung beladen:
  - Lösung in der Reswelling-Chamber vorlegen und Streifen mit der Gelseite nach unten luftblasenfrei auflegen
  - mit Paraffinöl überschichten
  - bei Raumtemperatur ü/N inkubieren
- am nächsten Morgen Laufkammer auf 17°C vorkühlen, 8 ml Paraffinöl auf die Kühlfläche geben, Rahmen auf die Platte setzen und mit 10 ml Paraffinöl überschichten, Stripe-aligner luftblasenfrei aufsetzen
- Streifen mit der Gelseite nach oben auf dem Aligner ausrichten, saure Seite zur Anode

- Elektrodenstripes (11 cm Länge) mit je 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{ad}}$  befeuchten, leicht abtupfen und so auf die Streifen legen, daß die Außenkannten der Elektrodenstreifen soweit wie möglich auseinander-, aber noch komplett auf dem Gel aufliegen
- Elektroden auflegen und festdrücken
- Kammer mit Paraffinöl überschichten und isoelektrische Fokussierung starten:

|         |                            |      |     |        |
|---------|----------------------------|------|-----|--------|
| Phase 1 | 200 $V_{\text{gradient}}$  | 2 mA | 5 W | 0:01 h |
| Phase 2 | 3500 $V_{\text{gradient}}$ | 2 mA | 5 W | 1:30 h |
| Phase 3 | 3500 $V_{\text{konstant}}$ | 2 mA | 5 W | 3:00 h |

( $V_{\text{gradient}}$  bedeutet hier, daß die Spannung in der angegebenen Zeit vom vorherigen auf den angegebenen Wert ansteigt)

Nach der Fokussierung können die Streifen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert oder direkt in der zweiten Dimension eingesetzt werden.

## 12.5. SDS-PAGE (2. Dimension)

Die 2. Dimension entspricht einer eindimensionalen SDS-PAGE unter Verwendung des Streifens der isoelektrischen Fokussierung:

- Equilibrierung der Streifen durch zweimaliges, leichtes Schütteln in je 12,5 ml Equilibrierungspuffer bei Raumtemperatur für 10 min.
- 1 mm starkes 10%iges Trenngel mit schmalem 5%igem Sammelgel gießen
- Proteinmarker (prestained) auf 5 mm breite Streifen Whatman-Papier pipettieren
- Streifen aus der isoelektrischen Fokussierung mit Hilfe eines Spacers luftblasenfrei auf dem Sammelgel plazieren
- Markerstreifen neben den Streifen plazieren und mit 0,5%iger Agarose (in Sammelgelpuffer) fixieren
- Proteine bei 80 V in das Gel einlaufen lassen, dann ca. 60 min. bei 140 V laufen lassen (blaue Bromphenolblaubande soll das untere Ende des Gels erreichen)

## 12.6. Western Blot und Silberfärbung

Zur Auswertung der Stimulationsexperimente wurden die Proteingele alternativ mit der Silberfärbung angefärbt oder im Western Blot verwendet. Für Silberfärbung und Western Blot siehe Methoden der Proteinbiochemie. Der Western Blot wurde für 2 h bei 65 V bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde der monoklonale Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 von Upstate Biotech in einer Verdünnung von 1 : 4000 verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde ein HRP-konjugierter Anti-Mouse-IgG-Antikörper von Santa Cruz in einer Verdünnung von 1 : 20.000 verwendet. Blockiert wurde mit 2% Milchpulver.

## C. Ergebnisse

### 1. Konstruktion des für das Fusionsprotein hCHL1-Fc kodierenden Plasmids

#### 1.1. Ausgangslage und Ziel

Die für das humane Zelladhäsionsmolekül CHL1 kodierende cDNA wurde freundlicherweise von M. I. Lerman in Form des Plasmids pCMVSPORT-CALLII bereitgestellt. Das Plasmid pCMVSPORT-CALLII enthält die gesamte kodierende cDNA sowie Teile der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen. Für die Klonierungen mußte die Transmembrandomäne identifiziert werden, um ein ausschließliches Klonieren der extrazellulären Domäne zu ermöglichen. Die für die Transmembrandomäne kodierende cDNA wurde mit Hilfe des Hydrophobicity-Plot nach Kyte und Doolittle sowie anschliessendem Vergleich der Sequenz mit der für das CHL1 der Maus kodierenden cDNA lokalisiert und befindet sich zwischen den Basenpaaren (bp) 3240 und 3299 bezogen auf das Startcodon. Weiterhin wurde das Plasmid pEE14-Km verwendet. Es handelt sich um einen modifizierten pEE14 (Celltech), der zusätzlich ein Kanamycin-Resistenzgen sowie eine BamHI-Schnittstelle gefolgt von einer Splice-Acceptor-Sequenz und der für den F<sub>c</sub>-Teil eines humanen IgG<sub>1</sub> kodierenden genomischen DNA enthält, die aus dem Vektor pIG1 stammen (Vektor und Splice-Acceptor-Sequenz wurden von Simmons (1993) beschrieben). Ziel war die Subklonierung der für die extrazelluläre Domäne kodierenden cDNA aus pCMV-SPORT-CALLII in den eukaryontischen Expressionsvektor pEE14. Soweit nicht anders angegeben wurden die Klonierungen mit Hilfe des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  durchgeführt und die Selektion über die AB-Resistenz des jeweiligen Zielvektors erreicht.

#### 1.2. Klonierungsstrategie (Abb. 1., 2.)

1. Zunächst wurde ein 5744 bp-*EcoRI-XhoI*-Fragment aus pCMVSPORT-CALLII in pGEM-7ZF(+) kloniert. Es enthielt die gesamte kodierende cDNA sowie einen kleinen Teil der 5'- und den Großteil der 3'-untranslatierten Region. Durch diesen Schritt wurde die Einführung einer neuen *HindIII*-Schnittstelle in der 5'-untranslatierten Region sowie der Verlust der *HindIII*-Schnittstelle in der 3'-untranslatierten Region erreicht. Das resultierende Plasmid ist pGEM7-CALLII.
2. Da sich am 3'-Ende der für die extrazelluläre Domäne kodierenden DNA keine geeignete Schnittstelle befindet, mußte diese über eine PCR eingeführt werden. Es wurde eine PCR an pCMVSPORT-CALLII unter Verwendung der Primer CALL-BcS und CALL-5'V nach dem

unter Material und Methoden angegebenen Protokoll durchgeführt. Die Primer dieser PCR ermöglichen die Amplifikation einer Sequenz, die bei bp 2943 beginnt und sich über die *EcoRV*-Schnittstelle an bp 3062 bis zum Beginn der für die Transmembrandomäne kodierenden Basenpaare erstreckt. Durch CALL-BcS wurden eine *BclI*-, gefolgt von einer *SaI*-Schnittstelle und einer Splice-Donor-Sequence (ACAGGTAAGT) an das Ende angefügt.

3. Das PCR-Produkt wurde dann als 198 bp *EcoRV*-*SaI*-Fragment in pBlue-CAM(+) kloniert, der dann mit den Primern uni und rev sequenziert wurde, um durch die PCR induzierte Mutationen auszuschließen.
4. Nach Amplifikation wurde das PCR-Produkt in pBlue-PCR als 198 bp *EcoRV*-*SaI*-Fragment über *EcoRV*-*XhoI* in pGEM-CALLII kloniert. Dies war durch die Übereinstimmung des Schnittmusters von *SaI* und *XhoI* möglich, deren Erkennungssequenzen sich nur am Rand unterscheiden. Die zu ligierenden Fragmente wurden jeweils aus dem Agarosegel eluiert und das Produkt der Ligation vor der Transformation mit *XhoI* gespalten, da hierdurch der eventuell religierte pGEM-CALLII linearisiert und somit die Transformation verhindert würde, während das erwünschte Produkt pGEM7-CALLII-PCR bei der Ligation die *XhoI*-Schnittstelle verlor und somit nicht gespalten würde.
5. Da für die folgende Ligation die Verwendung des Restriktionsenzym *BclI* nötig war, dessen Erkennungssequenz in DH5 $\alpha$  methyliert ist, wurde pGEM7-CALLII-PCR dann in den *E. coli*-Stamm NR 3704 umtransformiert, da dieser die Schnittstelle von *BclI* nicht methyliert und somit Plasmid-DNA liefert, die mit *BclI* verdaut werden kann.
6. Das für die extrazelluläre Domäne des humanen CHL1 kodierende *HindIII*-*BclI*-Fragment (3566 bp) wurde aus dem Agarosegel eluiert und über *HindIII*-*BamHI* in pEE14-Km kloniert, wobei *BclI* und *BamHI* wiederum durch einander entsprechende Schnittmuster die Ligation ermöglichen. Das resultierende Plasmid ist pEE14-hCHL1-Fc.

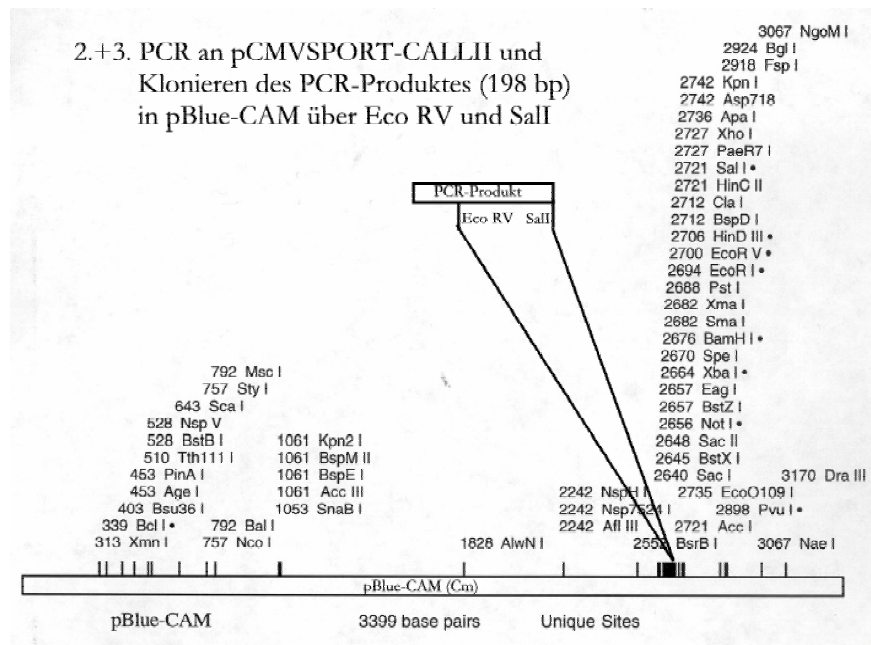
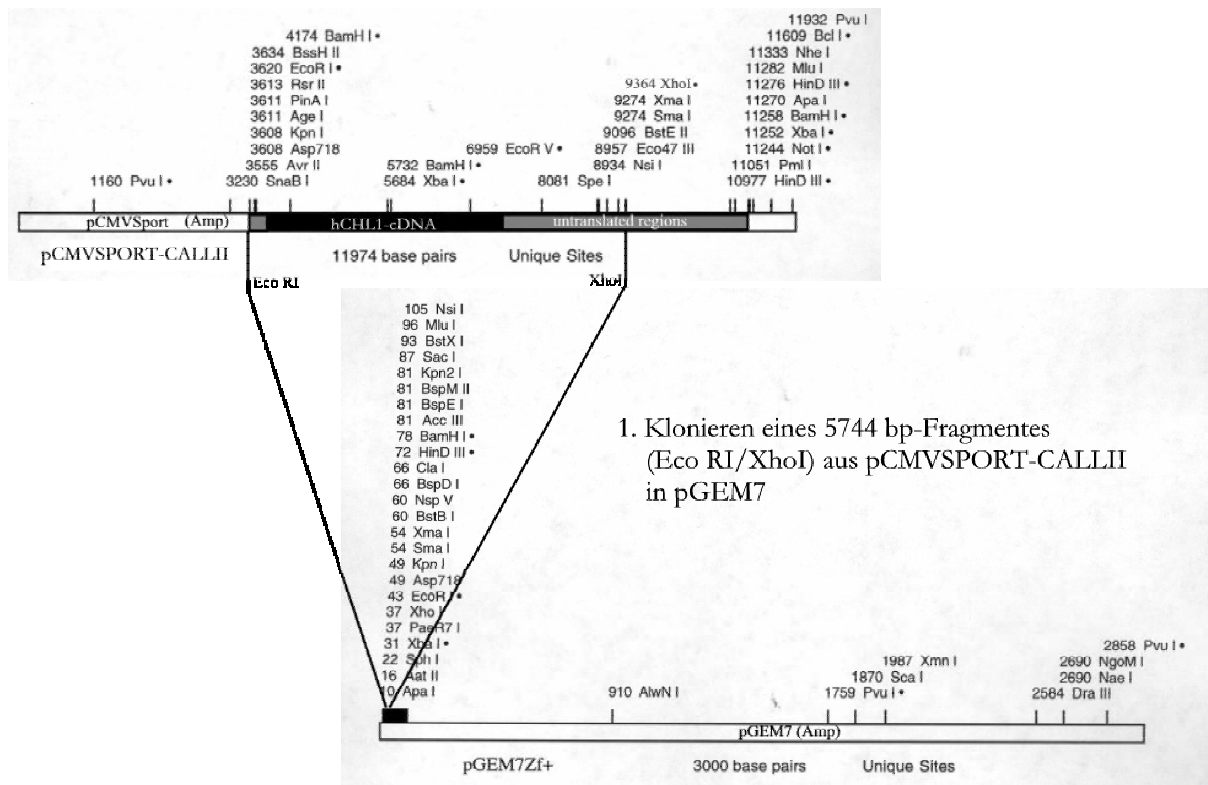
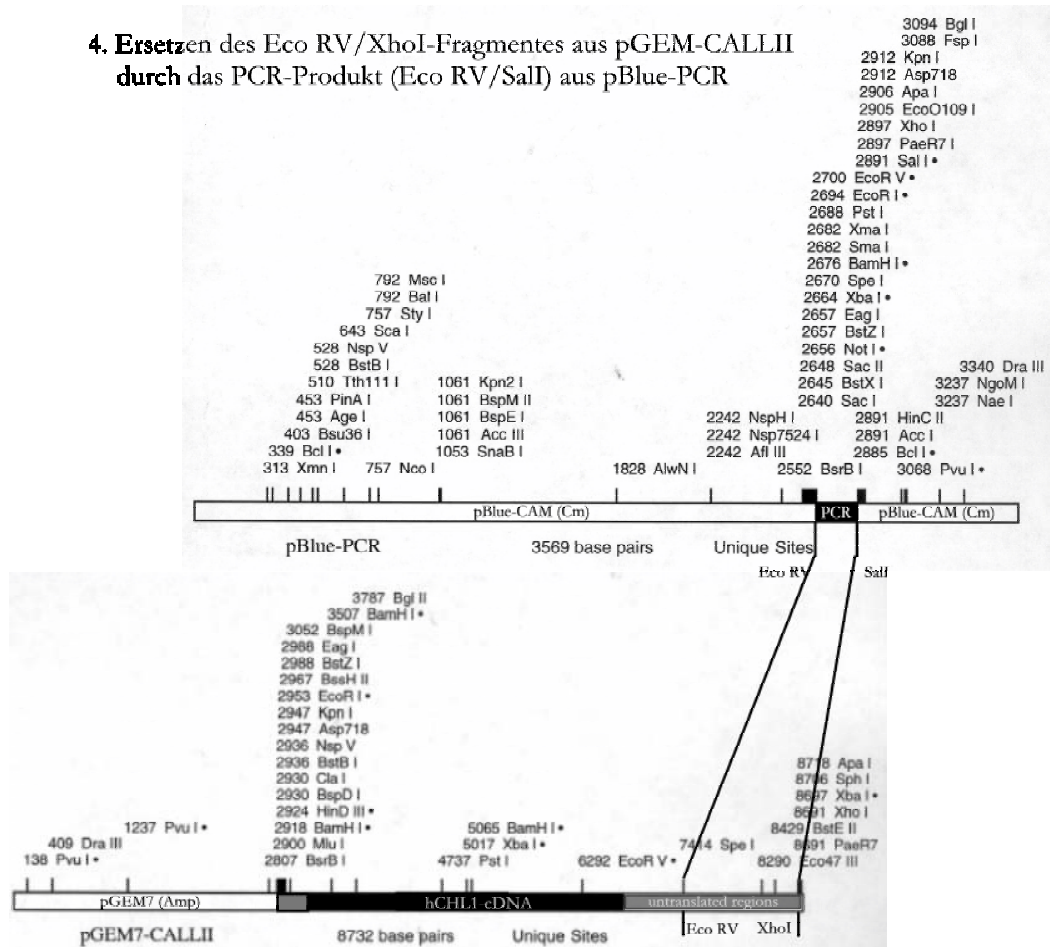


Abbildung 1a. Klonierungsstrategie für pEE14-hCHL1-Fc.

Die Plasmide sind zur Steigerung der Übersichtlichkeit linearisiert dargestellt. Es sind jeweils die singulären Schnittstellen sowie die übrigen dargestellt, soweit sie verwendet wurden. Die mit einem Punkt markierten Schnittstellen wurden für Klonierung oder Kontrollverdau verwendet.  
Fortsetzung auf der nächsten Seite

**4. Ersetzen des Eco RV/XhoI-Fragmentes aus pGEM-CALLII durch das PCR-Produkt (Eco RV/SalI) aus pBlue-PCR**



**5.+6. Umtransformieren von pGEM7-CALLII-PCR in NR 3704 und Klonieren eines 3566 bp-Fragmentes (HindIII/BclI) in pEE14-Km über HindIII/BamHI**

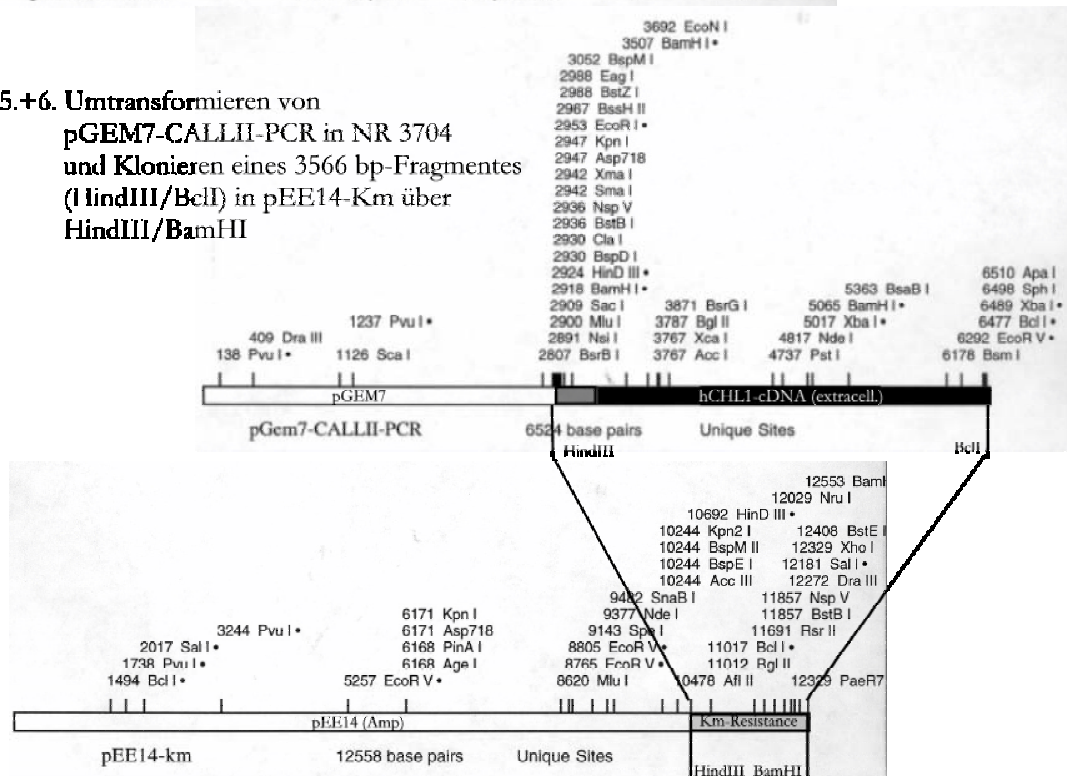


Abbildung 1b. Fortsetzung von voriger Seite

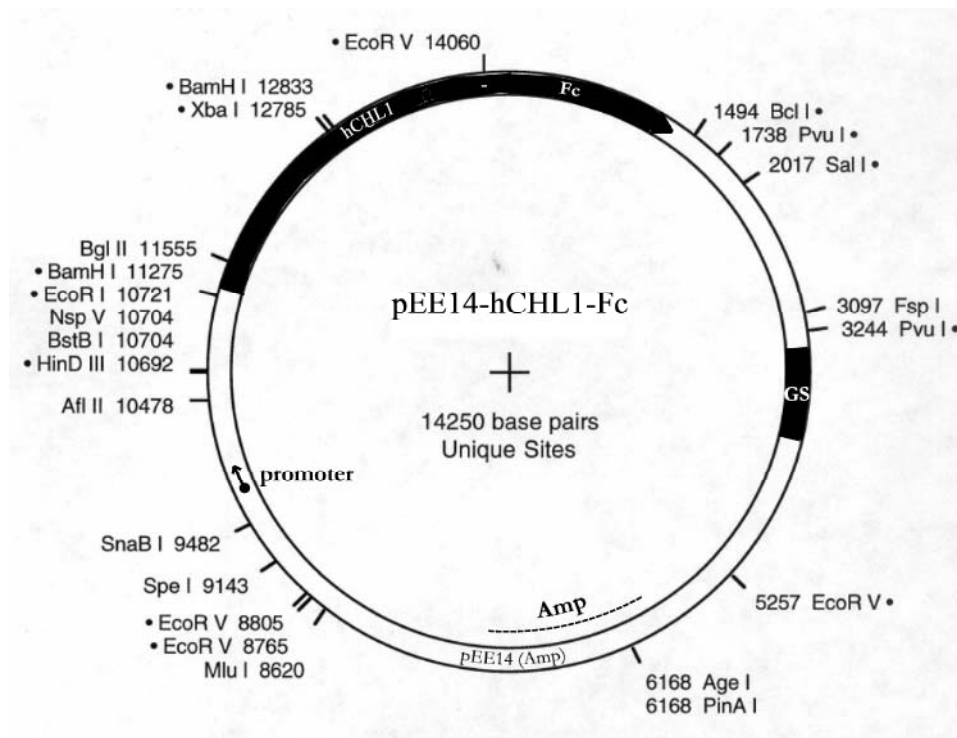


Abbildung 2. Plasmidkarte von pEE14-hCHL1-Fc  
Es sind die singulären sowie die für Kontrollverdaus verwendeten Schnittstellen dargestellt. Amp = Ampicillin-Resistenzgen,  
GS = Glutamin-Synthetase-Gen

## 2. Produktion des Fusionsproteins in CHO-K1-Zellen

### 2.1. Vorbemerkungen

Das resultierende Plasmid wurde, wie in Material und Methoden beschrieben, zur  $\text{CaPO}_4$ -Transfektion von CHO-K1-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurde pEE14-L1 verwendet, ein entsprechendes Plasmid zur Expression von L1-Fc, das sich in vorherigen Experimenten (Chen et al., 1999) als geeignet zur Transfektion in CHO-K1 erwiesen hatte. Als Negativkontrolle wurde ein entsprechender Transfektionsansatz ohne Plasmid verwendet. Es ergaben sich pro Petrischale ca. 2-3 Kolonien bei der Negativkontrolle sowie jeweils 15-20 bei der Positivkontrolle und bei pEE14-hCHL1-Fc, von denen 20 zur Kultivierung in 1 cm Kulturschalen überführt wurden. Der Überstand wurde später abgezogen und mit Protein A-Sepharose aufgereinigt. Eine SDS-PAGE wurde durchgeführt, um die hCHL1-Fc produzierenden Klone zu identifizieren und ihre Produktivität zu bestimmen (Abb.3.).

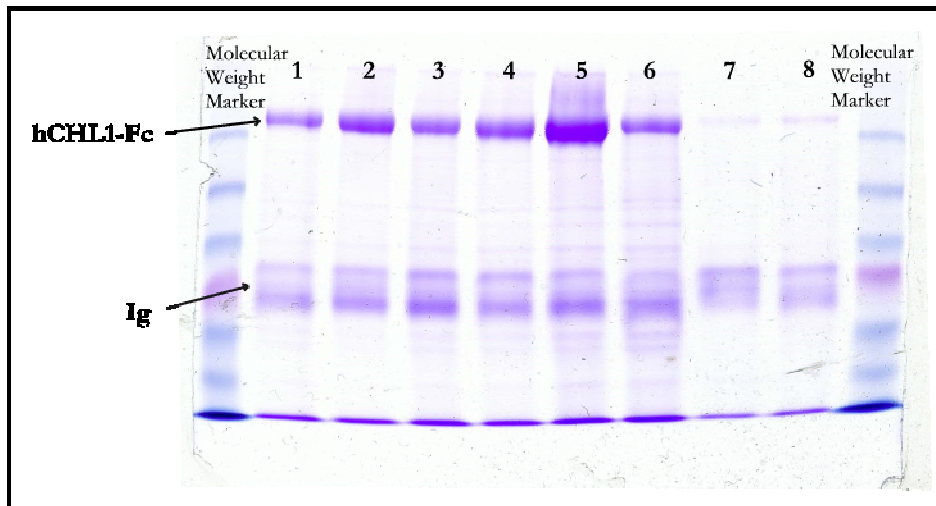


Abbildung 3. Auswahl des produktivsten Klon

Dargestellt ist die SDS-PAGE des Überstandes von acht, hCHL1-Fc produzierenden, Klonen. Der hCHL1-Fc am stärksten exprimierende Klon wurde zur Produktion des Fusionsproteins kultiviert. Die Banden im mittleren Molekulargewichtsbereich entsprechen Immunglobulinen (Ig), die in FCS enthalten sind, welches später zur Kultivierung des am stärksten produzierenden Klonen nicht mehr verwendet wurde.

Im Überstand der produktivsten Klone wurde über Western Blot und Anwendung von Anti-CHL1-Antikörpern sicher das humane CHL1-Protein identifiziert. Nach Kultivierung dieses Klonen erbrachte die Aufreinigung von 500 ml Zellkulturüberstand mit Protein A-Sepharose eine Ausbeute von 3 mg hCHL1-Fc.

## 2.2. Charakterisierung des gereinigten Fusionsproteins

### 2.2.1 Nachweis des aufgereinigten Fusionsproteins hCHL1-Fc durch SDS-PAGE

Das aufgereinigte Fusionsprotein hCHL1-Fc wurde zur Identifikation in der SDS-PAGE verwendet. Dabei wurde die SDS-PAGE sowohl unter reduzierenden Bedingungen, d.h. mit  $\beta$ -Mercaptoethanol enthaltendem Probenpuffer, als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Es wurden jeweils 5  $\mu$ g des Proteins aufgetragen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Als Standard wurde der Benchmark Molecular Weight Marker von Gibco verwendet. Das Ergebnis ist in Abb.4. dargestellt.

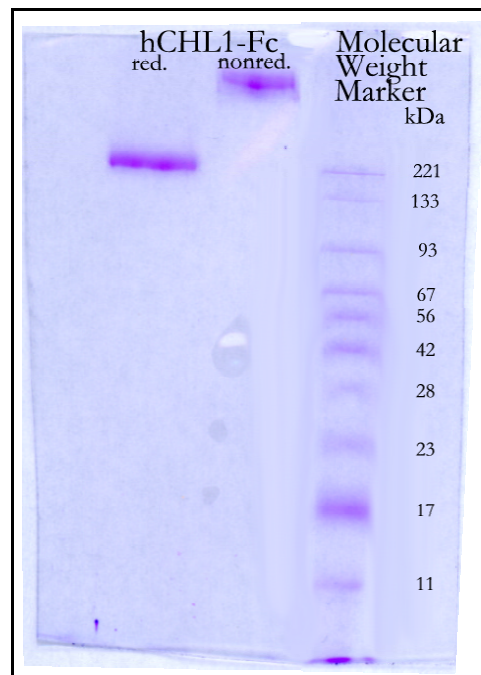


Abbildung 4. SDS-PAGE von hCHL1-Fc unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Als Standard wurde der Benchmark Molecular Weight Marker von Gibco verwendet.

Es ergab sich jeweils eine einzige Bande, die sich unter reduzierenden Bedingungen ungefähr bei 220 kDa befand, während sie sich unter nicht reduzierenden Bedingungen deutlich über der 220 kDa Bande des Standards befand. Die beobachtete Größe des Fusionsproteins unter reduzierenden Bedingungen liegt damit über der aus der Aminosäuresequenz berechneten Größe von 150 kDa, was sich durch dessen posttranslationelle Modifikation, v.a. Glykosylierung, in eukaryontischen Zellen erklären läßt. Da jeweils nur eine Bande zu sehen ist, kann man davon ausgehen, daß das Fusionsprotein bis zur Homogenität gereinigt werden konnte.

### 2.2.2. Nachweis des Fusionsproteins hCHL1-Fc im Western Blot

Zur Sicherung der Identität des Fusionsproteins wurde ein Western Blot mit Antikörperfärbung unter Verwendung eines Anti-CHL1-Antikörpers (Kaninchen-Anti-Maus-CHL1, bereitgestellt von M. Richter, Hamburg) durchgeführt. Dazu wurde eine SDS-PAGE von 15 µg der Membranfraktion eines Hirnhomogenats von 6 Tage alten C57 black Mäusen und von 200 ng des Fusionsproteins hCHL1-Fc durchgeführt. Das Elektrophoresegel wurde im Western Blot verwendet und mit dem oben erwähnten Antikörper angefärbt (Abb.5.).

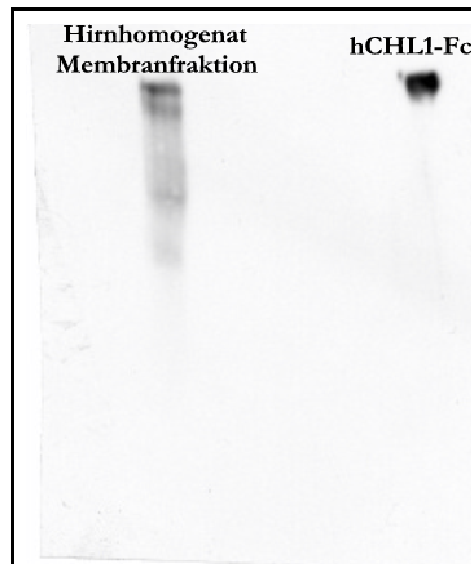


Abbildung 5. Westernblot und Anfärbung mit einem Kaninchen-Anti-Maus-CHL1-Antikörper der Membranfraktion eines Homogenates des Gehirns von C57 Black bzw. von hCHL1-Fc.

Dabei zeigte sich, daß tatsächlich ein hCHL1-Fc Fusionsprotein isoliert werden konnte, das mit dem CHL1-Antikörper spezifisch reagierte. Im Hirnhomogenat der Maus zeigten sich drei Banden, die schon von Holm et al. (1996) beschrieben wurden. Diese hielten die größte Bande für membrangebundenes und die beiden übrigen Banden für proteolytisch gespaltenes Protein. Für hCHL1-Fc ergab sich nur eine Bande, was durch die rekombinante Form des Fusionsproteins und die Sekretion in den Überstand sowie die unterschiedliche Struktur zu erklären ist.

### 3. Neuritenwachstumsexperimente

#### 3.1. Vorbemerkungen

Das produzierte und aufgereinigte Protein konnte jetzt in verschiedenen Experimenten verwendet werden. Es sollte der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum, die Konzentrationsabhängigkeit seiner Wirkung sowie die Wirkung von hCHL1-Fc im Vergleich mit anderen Zelladhäsionsmolekülen bestimmt werden. Dazu wurden, wie unter Material und Methoden beschrieben, die Cerebella von 5 – 7 Tage alten Mäusen vom Stamm C57 black präpariert, die Zellen durch Trypsin und Pipettieren separiert und in X1-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in einem Volumen von jeweils 100 µl in 96-well-plates (Schalendurchmesser je 5 mm) gegeben. Dabei wurden zunächst verschiedene Mengen verwendet, wobei sich eine optimale Zellzahl von 8.000 pro Kulturschale ergab. Kleinere Mengen verringerten das Neuritenwachstum sowohl der mit hCHL1-Fc stimulierten als auch der nicht stimulierten Neurone teilweise sehr stark, während größere Mengen zwar das Wachstum nicht beeinträchtigten, aber durch die zunehmende

Zelldichte die Häufigkeit der Berührung von Neuriten erhöhten, was den Anteil der auswertbaren Neuriten verringerte. Die folgenden Versuchsergebnisse wurden also sämtlich bei einer Zelldichte von 8.000 Neuronen pro Kulturschale ermittelt. Die Zellen wurden 24 h in X1-Medium kultiviert, wobei die Kulturschalen jeweils mit verschiedenen Konzentrationen an hCHL1-Fc, F<sub>c</sub> von humanem IgG<sub>1</sub>, L1-Fc, Laminin oder nur PLL beschichtet wurden. Im Experiment zum Vergleich der Wirkung von hCHL1-Fc in löslicher Form bzw. in beschichteter Form wurde die lösliche Form 2 h nach dem Ausplattieren der Neurone zugegeben, um den Adhäsionsprozeß der Zellen nicht zu stören. Nach 24 h wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert, mit Toluidinblau angefärbt und dann bei 400 facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop betrachtet, bzw. mit dem KS400-System der Firma Zeiss die Neuritenlängen bestimmt. Dabei wurde jeweils die Summe aller Neuriten eines Neurons ermittelt. Es wurden nur Neurone berücksichtigt, die keinen Kontakt zu anderen Neuronen hatten. Pro Kulturschale wurden die Summen der Neuritenlängen von je 50 Neuronen aus einer Sequenz vorherbestimmter und für alle Kulturschalen gleicher Blickfelder bestimmt. In den ersten Experimenten zur Bestimmung der biologischen Aktivität von hCHL1-Fc wurden je 4 Kulturschalen pro Proteinkonzentration und Versuchsbedingung ausgewertet, also insgesamt je 200 Neurone, während für die folgenden zur näheren Charakterisierung bestimmten Experimente je 3 Kulturschalen, also insgesamt je 150 Neurone ausgewertet wurden. Da die Standardabweichungen der Gruppe der stimulierten Neuronen und die der Kontrollgruppe sich stark unterschieden, wurde zur Ermittlung der Signifikanz des Unterschiedes zwischen den Gruppen nicht der t-Test, sondern der Mann Whitney U-Test (Claus und Ebner, 1977) verwendet, wobei ein p von 0.05 als signifikant, ein p von 0.01 als hochsignifikant und ein p von 0.001 als höchstsignifikant definiert wurden.

## 3.2. Ergebnisse

### 3.2.1. Der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum

In mit hCHL1-Fc beschichteten Kulturschalen wachsende Neurone zeigten im Mittel eine Neuritengesamtlänge von 2-2.5x derjenigen der in mit F<sub>c</sub> von humanem IgG<sub>1</sub> bzw. in nur mit PLL beschichteten Kulturschalen wachsenden Neuronen (Abb.6., 7. und 8.). Die Standardabweichungen der Mittelwerte fielen bei den Gruppen der mit hCHL1-Fc stimulierten Neuronen in den Bereich 2.0 – 4.0 µm, während sie bei den unstimulierten Neuronen in den Bereich 0.5 bis 2.0 µm fielen. Die Gruppe der in mit hCHL1-Fc beschichteten Kulturschalen wachsenden Neuronen unterschied sich dabei bei jeder Proteinkonzentration höchstsignifikant von den anderen beiden Gruppen, während sich zwischen PLL und F<sub>c</sub> kein signifikanter Unterschied ergab. Die in Abb.9. dargestellten repräsentativen Ausschnitte aus den Kulturschalen bei einer

Beschichtungskonzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  des Fusionsproteins hCHL1-Fc bzw. F<sub>c</sub> zeigen dabei exemplarisch das verbesserte Neuritenwachstum von auf in mit hCHL1-Fc beschichteten Kulturschalen wachsenden Kleinhirneuronen gegenüber solchen, die auf F<sub>c</sub> als Substrat wuchsen. Es wurden zur Sicherung der biologischen Aktivität wegen der Wichtigkeit der mit hCHL1-Fc geplanten weiteren Experimente drei unabhängige Experimente mit jeweils unterschiedlichen Zellpräparationen und Medien sowie Kontrollen durchgeführt (Abb.6., 7. und 8.).

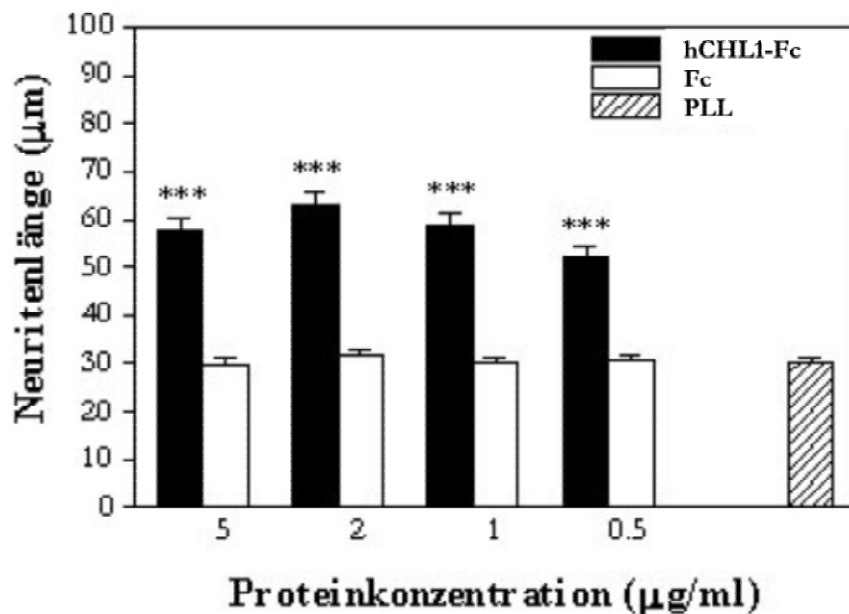


Abbildung 6. Der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum, Experiment 1. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Neuritenlänge von je 200 Kleinhirneuronen nach Kultivierung der Zellen auf dem entsprechenden Substrat für 24 h.  
 \*\*\*: Mittelwert unterscheidet sich höchstsignifikant ( $p < 0.001$ ) vom Mittelwert der Kontrolle  
 \*\*: Mittelwert unterscheidet sich hochsignifikant ( $p < 0.01$ ) vom Mittelwert der Kontrolle  
 \*: Mittelwert unterscheidet sich signifikant ( $p < 0.05$ ) vom Mittelwert der Kontrolle

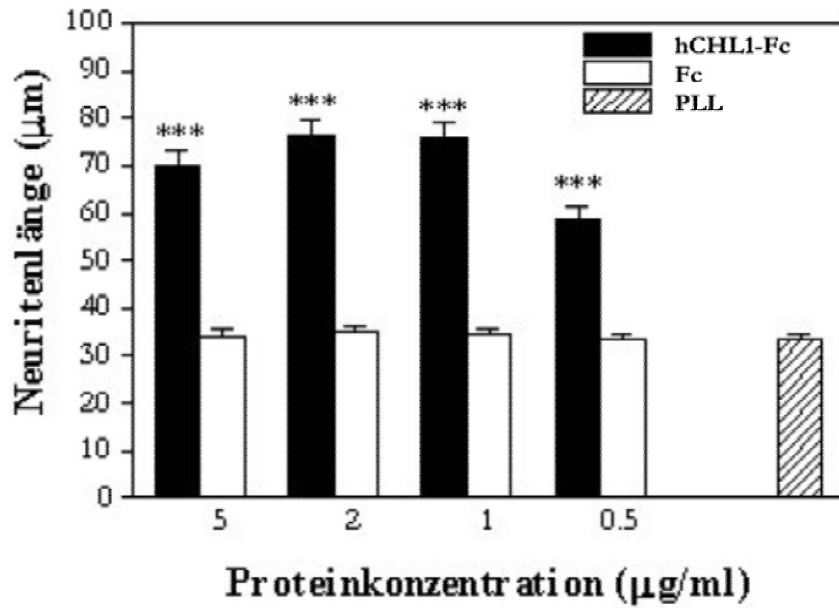


Abbildung 7. Der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum, Experiment 2. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Neuritenlänge von je 200 Kleinhirneuronen nach Kultivierung der Zellen auf dem entsprechenden Substrat für 24 h. \*\*\*, \*\*, \* wurden wie in voriger Abbildung verwendet.

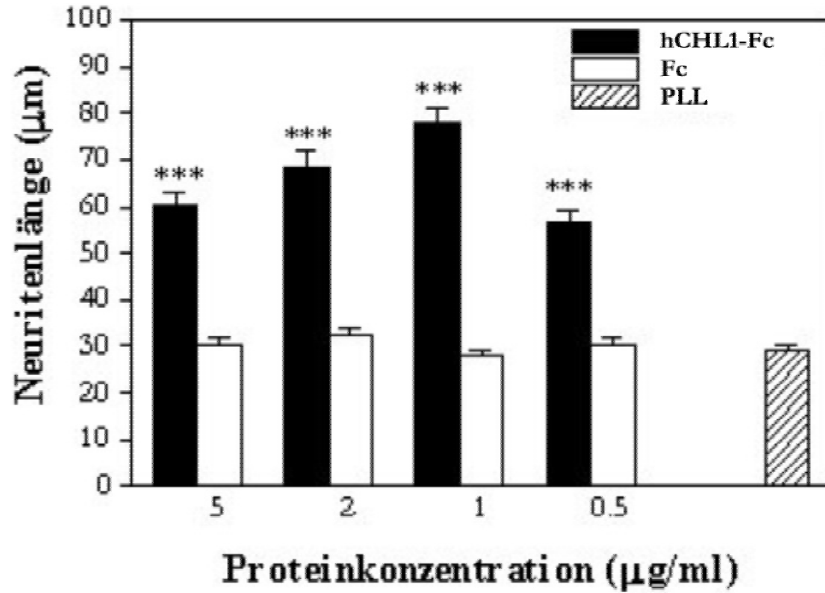


Abbildung 8. Der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum, Experiment 3. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Neuritenlänge von je 200 Kleinhirneuronen nach Kultivierung der Zellen auf dem entsprechenden Substrat für 24 h. \*\*\*, \*\*, \* wurden wie in voriger Abbildung verwendet.

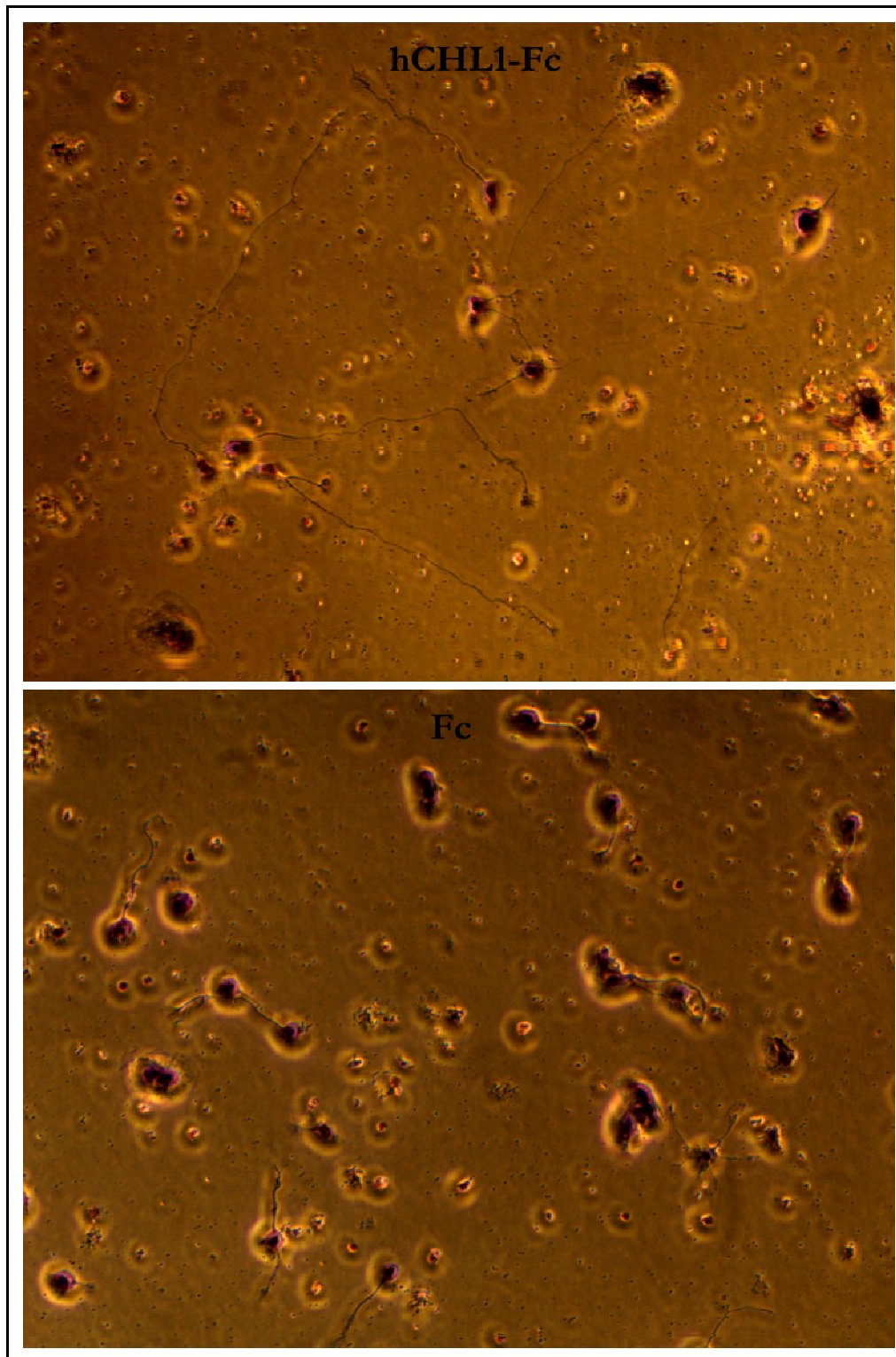


Abbildung 9. Der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum, Experiment 3. Dargestellt sind zwei repräsentative Ausschnitte aus den jeweiligen Kulturschalen, wobei die obere mit einer Konzentration von 5 µg/ml mit hCHL1-Fc beschichtet wurde, die untere mit Fc von humanem IgG<sub>1</sub> derselben Konzentration. Dargestellt ist die mikroskopische Sicht im Phasenkontrastmikroskop bei einer Vergrößerung von 320x.

Es zeigte sich also, daß Neurone, die auf mit dem humanen CHL1 beschichteten Kulturschalen wuchsen, im Schnitt etwa doppelt so lange Neuriten ausbildeten wie solche, die nur auf PLL oder PLL und F<sub>c</sub> kultiviert worden waren. Der Unterschied ist dabei höchstsignifikant und demonstriert, daß das humane CHL1 das Neuritenwachstum fördern kann.

### 3.2.2. Konzentrationsabhängigkeit der hCHL1-Fc vermittelten Stimulation des Neuritenwachstums

In weiteren Experimenten wurde der Einfluß der Konzentration der Beschichtungslösung auf das Ausmaß der Verstärkung des Neuritenwachstums bestimmt. Es wurden Proteinkonzentrationen von 0.01 µg/ml bis 10 µg/ml verwendet sowie eine Kontrolle, bei der Neurone in Kulturschalen kultiviert wurden, die nur mit PLL beschichtet waren. Das übrige Verfahren unterschied sich nicht von den obigen Experimenten. Das Ergebnis ist in Abb.10. dargestellt.

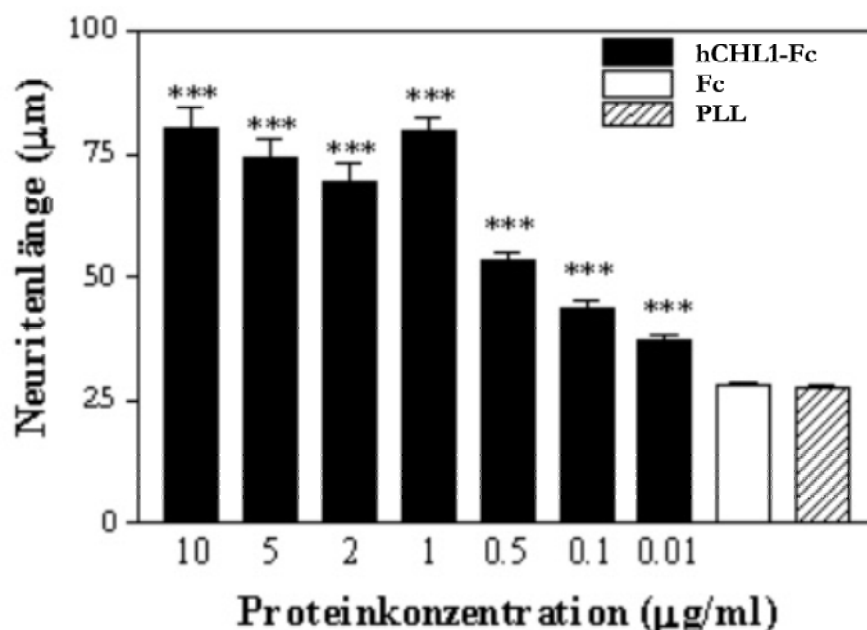


Abbildung 10. Der Einfluß der Proteinkonzentration auf das Ausmaß der Verstärkung des Neuritenwachstums.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Neuritenlänge von je 150 Kleinhirneuronen nach Kultivierung der Zellen auf dem entsprechenden Substrat für 24 h.

- \*\*\*: Mittelwert unterscheidet sich höchstsignifikant ( $p < 0.001$ ) vom Mittelwert der Kontrolle  
 \*\*: Mittelwert unterscheidet sich hochsignifikant ( $p < 0.01$ ) vom Mittelwert der Kontrolle  
 \*: Mittelwert unterscheidet sich signifikant ( $p < 0.05$ ) vom Mittelwert der Kontrolle

Es ergab sich, daß hCHL1-Fc in Konzentrationen, die größer oder gleich 1 µg/ml waren, das Neuritenwachstum um den Faktor 2 – 2.5 verstärkte, während dieser Wert unterhalb von 1 µg/ml

auf unter 2 sank und bei 0.01  $\mu\text{g/ml}$  auf einen Wert von 1.33, wobei sich auch hier der Mittelwert höchstsignifikant von dem der Kontrolle unterschied. Dies zeigt, daß der Einfluß des humanen CHL1 auf das Neuritenwachstum konzentrationsabhängig ist.

### 3.3.3. Vergleich der Wirksamkeit von hCHL1-Fc in löslicher und beschichteter Form

Zur Verwendung in späteren Experimenten *in vivo* sollte auch die Wirksamkeit des Fusionsproteins in löslicher Form gezeigt werden. Der Vergleich der Wirksamkeit von hCHL1-Fc in löslicher und beschichteter Form wurde bei einer Konzentration von je 1  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt, wobei als Kontrolle F<sub>c</sub> von humanem IgG<sub>1</sub> der entsprechenden Konzentration in löslicher bzw. beschichteter Form verwendet wurde. Die lösliche Form wurde 2 h nach dem Ausplattieren der Zellen in Form einer Lösung von 1 mg/ml hCHL1-Fc in HBSS<sup>-</sup> zugegeben. Das übrige Verfahren unterschied sich nicht von dem der obigen Experimente. Das Ergebnis ist in Abb.11. dargestellt.

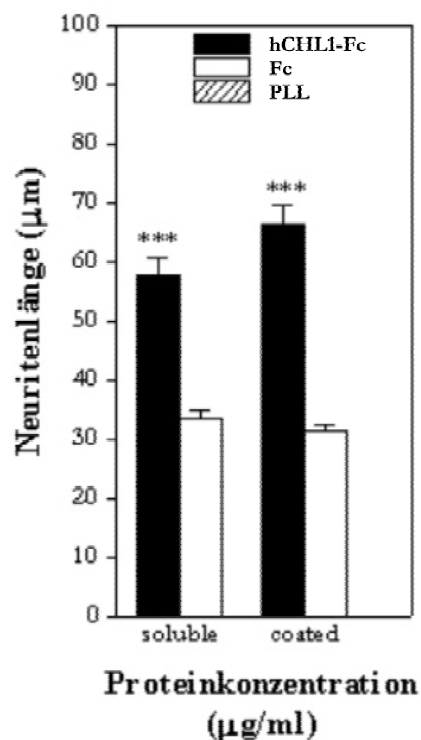


Abbildung 11. Vergleich des Einflusses von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum in löslicher und beschichteter Form.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der gesamten Neuritenlänge von je 150 Kleinhirneuronen nach Kultivierung der Zellen auf dem entsprechenden Substrat für 24 h.

\*\*\*: Mittelwert unterscheidet sich höchstsignifikant ( $p < 0.001$ ) vom Mittelwert der Kontrolle

\*\*: Mittelwert unterscheidet sich hochsignifikant ( $p < 0.01$ ) vom Mittelwert der Kontrolle

\*: Mittelwert unterscheidet sich signifikant ( $p < 0.05$ ) vom Mittelwert der Kontrolle.

Es ergab sich eine signifikant geringere Verstärkung des Neuritenwachstums durch die lösliche Form, wobei beide Formen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle das Neuritenwachstum höchstsignifikant verstärkten. Der Unterschied war aber nur gering und bestätigte die Wirksamkeit von hCHL1-Fc auch in löslicher Form.

### 3.3.4. Vergleich der Wirksamkeit von hCHL1-Fc mit der Wirksamkeit anderer Moleküle

Der Einfluß von hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum wurde mit dem des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1, das ebenfalls in Form eines Fusionsproteins aus der extrazellulären Domäne des Moleküls und dem F<sub>c</sub> von humanem IgG<sub>1</sub> vorlag, und des Matrixproteins Laminin verglichen, die beide dokumentierten Einfluß auf das Neuritenwachstum haben. Dabei wurden, um jeweils maximale Stimulation des Neuritenwachstums zu erreichen, hCHL1-Fc und L1-Fc in einer Konzentration von je 10 µg/ml und Laminin in einer Konzentration von 20 µg/ml zur Beschichtung der Kulturschalen verwendet. Als Kontrolle wurden in diesem Experiment Cerebellumzellen verwendet, die in Kulturschalen kultiviert wurden, die mit PLL allein beschichtet wurden. Das Ergebnis ist in Abb.12. dargestellt.

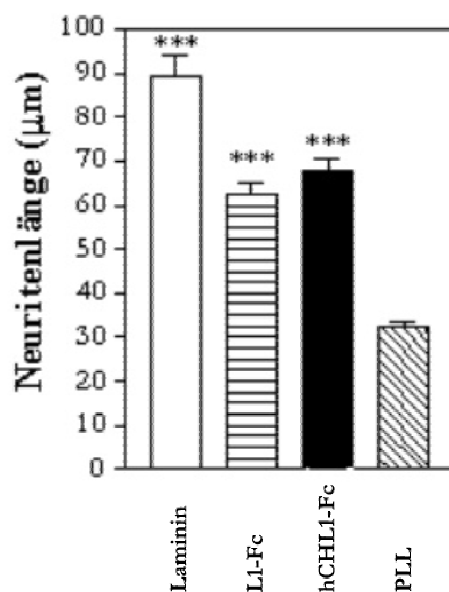


Abbildung 12. Vergleich des Effekts von Laminin, L1-Fc und hCHL1-Fc auf das Neuritenwachstum. Dargestellt sind die Mittelwerte der Gesamtnuritenlänge von je 150 Kleinhirneuronen und die jeweilige Standardabweichung des Mittelwertes nach Kultivierung der Zellen auf dem entsprechenden Substrat für 24 h, wobei die verwendeten Konzentrationen der Beschichtungslösungen für Laminin 20 µg/ml, für L1-Fc und hCHL1-Fc je 10 µg/ml betrugen. Als Kontrolle dienten Kulturschalen, die nur mit PLL beschichtet waren.

\*\*\*: Mittelwert unterscheidet sich höchstsignifikant ( $p < 0.001$ ) vom Mittelwert der Kontrolle

\*\*: Mittelwert unterscheidet sich hochsignifikant ( $p < 0.01$ ) vom Mittelwert der Kontrolle

\*: Mittelwert unterscheidet sich signifikant ( $p < 0.05$ ) vom Mittelwert der Kontrolle

Es ergab sich, dass die Verstärkung des Neuritenwachstums durch Laminin höchstsignifikant größer war als die durch L1-Fc bzw. hCHL1-Fc, während letzteres das Neuritenwachstum nur minimal, doch signifikant mehr verstärkte als L1-Fc. Alle Moleküle verstärkten das Neuritenwachstum höchstsignifikant im Vergleich mit der Kontrolle.

## **4. Ergebnisse der Stimulation von N2A-Zellen mit AK 557.B6**

### **4.1. Vorbemerkungen**

Wie unter Material und Methoden beschrieben wurden N2A-Zellen mit dem monoklonalen Anti-L1-Antikörper AK 557.B6 stimuliert, die Zellen nach verschiedenen Zeitspannen lysiert und das Lysat 2-D-elektrophoretisch aufgetrennt und mit der Silberfärbung angefärbt bzw. im Western Blot unter Verwendung des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers 4G10 verwendet, wobei als Kontrolle jeweils IgG des Kaninchens diente. Das Ziel war Moleküle, die während der Signaltransduktion des Zelladhäsionsmoleküls L1 von Tyrosinkinasen phosphoryliert werden, in der 2-dimensionalen Elektrophorese zu identifizieren und anschließend ihre Sequenz zu bestimmen. Dabei variierte die aufgetragene Proteinmenge von 200-800 µg, wobei zunächst Immobiline Dry Stripes des pH-Bereichs 3 – 10 mit linearem Gradienten und später des pH-Bereichs 4 – 7 mit linearem Gradienten verwendet wurden. Die Zeitspanne zwischen Stimulation und Lyse wurde von 1 min. – 4 h variiert.

### **4.2. Ergebnisse**

Es ergaben sich unter keiner Versuchsbedingung reproduzierbare Unterschiede zwischen stimulierten Zellen und Kontrolle. Dabei wurde jeweils die zur Stimulation verwendete Antikörperkonzentration zwischen 100 – 300 µg/ml variiert, wobei in verschiedenen Experimenten die Lyse der Zellen mit Ripa-Puffer 1 min, 5 min, 7,5 min, 15 min. sowie 1 h, 2 h und 4 h nach der Stimulation durchgeführt wurde. Dabei konnten weder in der Silberfärbung noch im Western Blot unter Verwendung des Antikörpers 4G10 reproduzierbare Unterschiede festgestellt werden. Repräsentative Ergebnisse eines Experiments mit Lyse der N2A-Zellen 5 min. nach der Stimulation und 2-D Elektrophorese im Bereich pH 3 – 10 sind in Abb.13. in Form der Silberfärbung und in Abb.14. in Form des Western Blots dargestellt.

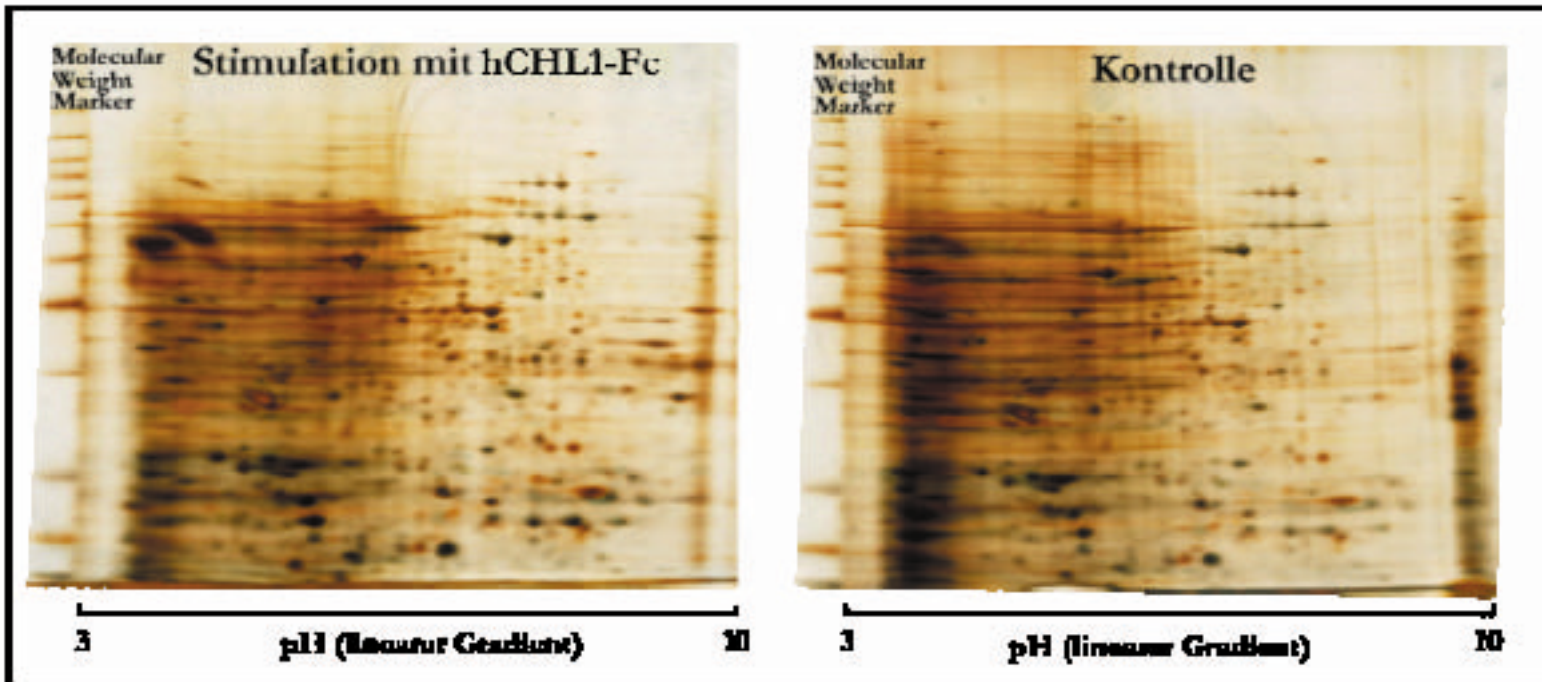


Abbildung 13. Silberfärbung der 2-D Gelelektrophorese im Bereich pH 3 - 10 der Lysate von N2A-Zellen 5 min. nach Stimulation mit AK 557.B6. Es wurden je 400 µg der Lysate der stimulierten Zellen und der Kontrolle aufgetragen.

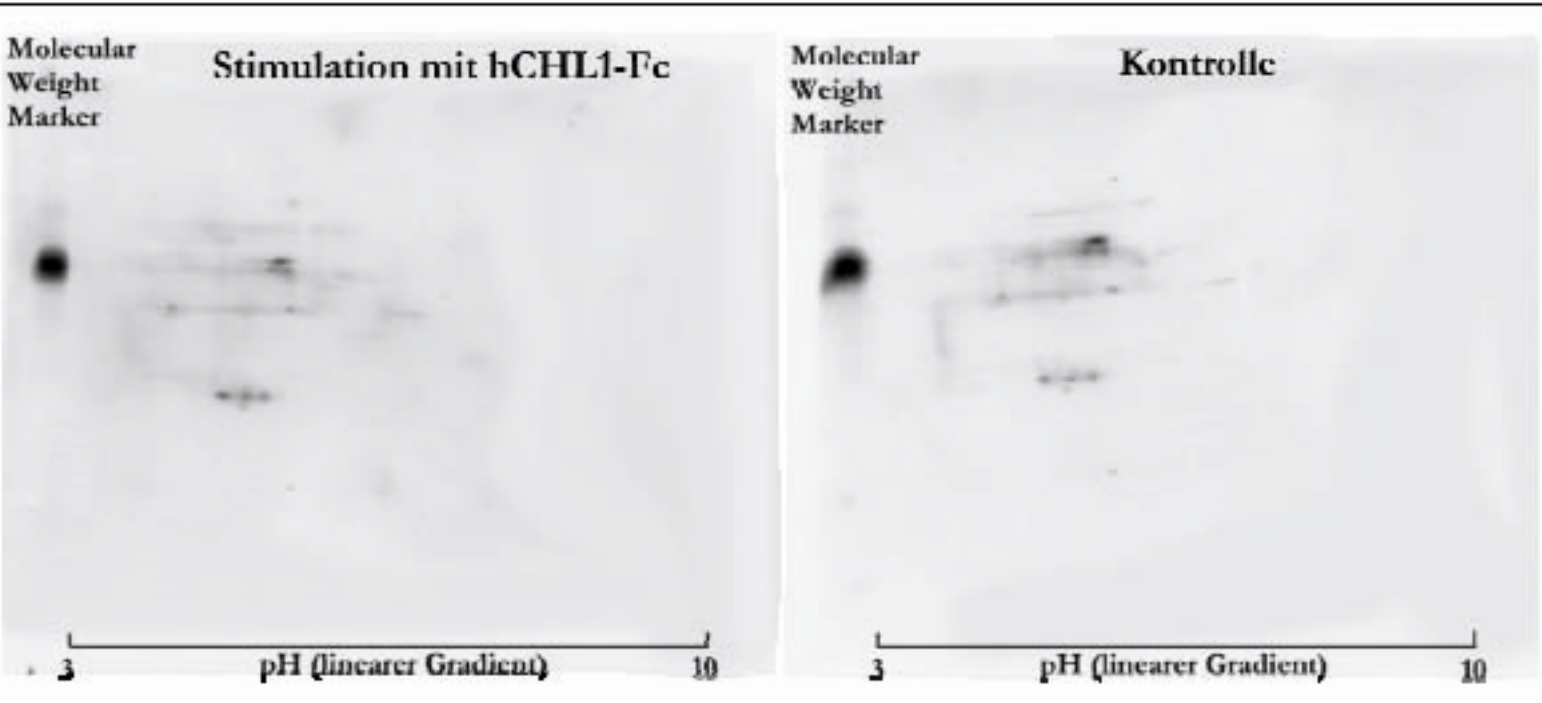


Abbildung 14. Western Blot der 2-D Gelelektrophorese im Bereich pH 3 - 10 der Lysate von N2A-Zellen 5 min. nach Stimulation mit AK 557.B6 und Anfärbung mit 4G10. Es wurden je 400 µg der Lysate der stimulierten Zellen und der Kontrolle aufgetragen.

## D. Diskussion

### 1. Stimulation des Neuritenwachstums durch hCHL1-Fc

In dieser Arbeit sollte die Funktion des Zelladhäsionsmoleküls CALL, des humanen Orthologs von CHL1, untersucht und die Grundlage für Regenerationsversuche bei Rückenmarkskontusionen geschaffen werden. Zur Untersuchung der Funktionen von Zelladhäsionsmolekülen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

Zum einen kann die Funktion verschiedener Moleküle indirekt über die Untersuchung von Krankheitszuständen, die durch Mutationen bzw. totalen Funktionsverlust des entsprechenden Moleküls bewirkt werden, untersucht werden. Dazu können natürliche genetische Erkrankungen wie z.B. das CRASH-Syndrom oder aber künstlich erzeugte Mutationen oder Deletionen in Knock-out-Tieren dienen. Die Tiere können hinsichtlich Morphologie und Funktionalität untersucht werden, wobei Probleme der eindeutigen Zuordnung von Funktionen und Molekülen auftreten können, da Funktionen teilweise von anderen Molekülen übernommen werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Funktion von Zelladhäsionsmolekülen zu charakterisieren, bilden Neuritenwachstumsexperimente. Dabei besteht die Möglichkeit, das Molekül aus nativen Zellen aufzureinigen und das Verhalten verschiedener Zellpopulationen in Zellkultur mit substratgebundenem Protein zu untersuchen. Probleme ergeben sich dabei aus der Möglichkeit der Denaturierung bzw. Veränderung der Struktur der membrangebundenen Moleküle während der Aufreinigung und des Beschichtens der Kulturschalen. Außerdem ist die Dichte der substratgebundenen Moleküle meist künstlich hoch und die Orientierung nicht definiert (Walsh und Doherty, 1996). Dies kann teilweise durch Verwendung von rekombinanten Fusionsproteinen aus der extrazellulären Domäne des Moleküls und dem F<sub>c</sub> von IgG verhindert werden, was in dieser Arbeit für das humane Ortholog von CHL1 durchgeführt wurde. Die Expression in eukaryontischen Zellen, die das Protein in den Überstand sezernieren, ermöglicht eine weniger denaturierende Aufreinigung und dadurch eine bessere Erhaltung der Struktur. Durch die Fusion mit F<sub>c</sub> entstehen Fusionsprotein-Dimere, die die cis-Clusterung an der Zelloberfläche imitieren, welche für die Funktion der Moleküle und die Signaltransduktion von Bedeutung zu sein scheint (Reth, 1992). Diese chimären Proteine kann man entweder substratgebunden oder in löslicher Form verwenden. In Zellkultur können auch andere Funktionen von Adhäsionsmolekülen untersucht werden wie der Einfluß auf die Adhäsion von Zellen oder auf das Zellüberleben (Appel et al., 1993; Chen et al., 1999).

Um die Funktion weiter zu charakterisieren gibt es zum einen die Möglichkeit, Neuritenwachstumsexperimente mit Primärzellen durchzuführen, die aus Tieren gewonnen wurden, die Mutationen oder Deletionen in dem zu untersuchenden Molekül aufweisen. Alternativ können diese Experimente auch, statt mit der substratgebundenen Form des Moleküls, mit Zellen, die mit der DNA des Moleküls transfiziert wurden und es in physiologischen oder größeren Konzentrationen an ihrer Oberfläche exprimieren, durchgeführt werden, um deren Einfluß auf das Neuritenwachstum verschiedener Zellpopulationen, die auf einem Rasen der transfizierten Zellen kultiviert werden, zu untersuchen. Dies bietet den Vorteil gegenüber der Untersuchung in substratgebundener Form, daß auch die physiologische Verankerung der Moleküle in der Membran und deren Orientierung an der Oberfläche berücksichtigt werden (Rutishauser, 1993). Diese Neuritenwachstumsexperimente können auch mit spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Molekül durchgeführt werden, womit die Spezifität der Interaktionen weiter charakterisiert werden kann. So konnte in Antikörperstudien die heterophile Interaktion von L1 dokumentiert werden (Bixby et al., 1988; Williams et al., 1995). Spezifische Antikörper können auch für Experimente *in vivo* verwendet werden. Durch Hemmung der Funktion der Zelladhäsionsmoleküle durch Antikörper oder  $F_{ab}$  während der Entwicklung können eventuell Veränderungen in der Morphologie nachgewiesen werden. So konnte z.B. durch die Applikation von Antikörpern gegen NgCAM im sich entwickelnden Rückenmark des Huhns eine Defaszikulierung der kommissuralen Neuriten bewirkt werden (Brümmendorf und Rathjen, 1995).

Eine weitere Möglichkeit, die Funktion von Proteinen *in vivo* zu testen besteht in Regenerationsversuchen. Dabei können periphere oder zentrale Nervenbahnen künstlich durchtrennt oder gequetscht werden, um dann durch Applikation des zu testenden Adhäsionsmoleküls in löslicher Form, z.B. als Fusionsprotein, dessen Einfluß auf die Regeneration zu testen, wie dies für FGF von Cheng et al. (1996) durchgeführt wurde. Hier wurde nach Durchtrennung des Rückenmarks FGF appliziert und zum einen die funktionelle Regeneration, zum anderen morphologische Veränderungen bestimmt.

In dieser Arbeit sollte die Funktion des humanen Orthologs des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls CHL1 charakterisiert werden. Hierzu wurde zunächst ein für ein Fusionsprotein aus dem  $F_c$  von humanem IgG<sub>1</sub> und der extrazellulären Domäne des humanen Orthologs von CHL1 kodierendes Plasmid konstruiert, das dann nach CaPO<sub>4</sub>-Transfektion zur Expression und Sekretion des Proteins in eukaryontischen CHO-Zellen führte. Das Protein wurde über Protein A-Sepharose zur weiteren Verwendung aufgereinigt. Da das Medium für die Produktion des Proteins kein Serum enthielt, war es möglich, ein rekombinantes Protein von hoher Reinheit zu produzieren, um mögliche Effekte von Verunreinigungen zu minimieren. So ergaben sich in der Coomassie-Färbung auch keine weiteren Banden neben einer bei ca. 220 kDa unter reduzierenden Bedingungen. Die im Vergleich

zum auf der Basis der Sequenz von hCHL1-Fc kalkulierten Molekulargewicht von 150,0 kDa bestehende Differenz erklärt sich durch die Glykosylierung des Moleküls, was schon für das CHL1 der Maus gezeigt wurde. (Holm et al., 1996). Für die Produktion des Proteins wurde ein eukaryontisches Expressionssystem gewählt. In prokaryontischen Expressionssystemen können nur kleine Domänen exprimiert werden, denen die posttranslationalen Modifikationen fehlen, die in der Interaktion der Zelladhäsionsmoleküle aber von Bedeutung sind, wie z.B. das HNK-1-Epitop in der cis-Interaktion von L1 und NCAM (Schachner und Marini, 1995), das erst durch Glykosylierung gebunden wird. Die Expression in eukaryontischen Zellen ermöglicht eine korrekte Glykosylierung sowie Faltung in die richtige Tertiärstruktur des Moleküls und erhöht die Übereinstimmung zwischen nativem und rekombinantem Protein. Es entstanden dimere Proteine, was sich an der höhermolekularen Bande unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte. Die dimeren Fusionsproteine wurden in dieser Arbeit zur Untersuchung der Funktion des humanen Orthologs von CHL1 verwendet. Als System wurde die Kultur von Primärzellen aus dem Cerebellum von infantilen Mäusen gewählt, denen das Fusionsprotein in löslicher und substratgebundener Form angeboten wurde, um dessen Einfluß auf das Neuritenwachstum zu untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendete Cerebellum-Zellkultur (modifiziert nach Keilhauer et al., 1985) erwies sich schon in mehreren anderen Arbeiten als anwendbar (Appel et al., 1993; Chen et al., 1999). Um den Einfluß auf das Neuritenwachstum unabhängig von der Adhäsion der Zellen zu bestimmen, die eine Voraussetzung des Neuritenwachstums darstellt, wurden die Fusionsproteine und die Kontrollproteine jeweils auf Poly-L-Lysin absorbiert, da Poly-L-Lysin ein hochpotentes Substrat für die Adhäsion von Kulturzellen ist und somit eventuelle Unterschiede der Adhäsion der Cerebellumzellen an hCHL1-Fc bzw. die Kontrollproteine, die sich durch verschiedene Zelldichten wiederum auf das Neuritenwachstum auswirken würden, nicht auftreten konnten (Appel et al., 1993). Als optimale Zellzahl pro Kulturschale (0.5 cm Durchmesser) für Neuritenwachstumsexperimente wurde in dieser Arbeit 8000 ermittelt. Bei geringeren Zellzahlen nahm das Neuritenwachstum sowohl unter dem Einfluß der Kontrollproteine, als auch von hCHL1-Fc so stark ab, daß Unterschiede nicht mehr feststellbar waren, während es bei größeren Zellzahlen zunehmend zu Berührungen der Neuriten, besonders unter dem Einfluß von hCHL1-Fc, kam. Da andere Neuriten berührende Neuriten nicht ausgewertet wurden, verfälschte dies zunehmend das Ergebnis zu Gunsten der Kontrolle, da deren Neuriten kürzer waren und es so seltener zu Berührungen kam. Dies zeigte sich auch bei der für die Messungen benutzten Dichte von 8.000 Zellen, so daß auch hier die Differenz zwischen dem Einfluß der Kontrolle und hCHL1-Fc im Ergebnis dieser Arbeit als eher unterschätzt betrachtet werden muß.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß das humane Ortholog von CHL1 das Neuritenwachstum von Cerebellumzellen signifikant stimuliert. Es stimuliert das Neuritenwachstum sowohl in

löslicher, als auch in substratgebundener Form, in substratgebundener Form etwas stärker als in löslicher Form. Der Effekt ist konzentrationsabhängig mit geringerem Effekt bei Konzentrationen unter 1 µg/ml und maximalem Effekt bei 1 – 10 µg/ml. Die Stimulation des Neuritenwachstums wurde schon für mehrere Moleküle der L1-Familie nachgewiesen. So wurde eine Stimulation des Neuritenwachstums verschiedener Zellpopulationen für L1 in substratgebundener (Appel et al., 1993) und in Form eines löslichen Fusionsproteins (Chen et al., 1999) und für das CHL1 der Maus, ebenfalls in substratgebundener und löslicher Form (Hillenbrand et al., 1999) sowie in Form eines löslichen Fusionsproteins (Chen et al., 1999) und als Molekül an der Oberfläche von mit CHL1 transfizierten Zellen (Hillenbrand et al., 1999) gezeigt. Das Ausmaß der Steigerung des Neuritenwachstums lag dabei im Bereich des Ergebnisses dieser Arbeit, was auch im Vergleichsexperiment in dieser Arbeit gezeigt wurde, in dem die humanen Orthologe von L1 und CHL1 das Neuritenwachstum vergleichbar steigerten, während Laminin zu stärkerem Wachstum führte. Dieser Unterschied wurde für das homologe Protein von L1 der Maus in aufgereinigter Form und Laminin schon von Appel et al. (1993) gezeigt und spricht für die Validität dieser Ergebnisse. Die Versuche dieser Arbeit zeigen, daß das Neuritenwachstum auf immobilisiertem hCHL1-Fc konzentrationsabhängig ist. Ein Schwellenwert scheint dabei nicht zu existieren, schon geringe Konzentrationen von hCHL1-Fc stimulieren das Neuritenwachstum, allerdings signifikant weniger als größere. Die Abnahme der Stimulation deutete sich schon bei der Untersuchung der Funktion des CHL1 der Maus an (Chen et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des humanen Orthologs von CHL1 aber bei noch geringeren Konzentrationen untersucht und auch hier eine abnehmende Stimulation gezeigt. In der Arbeit von Chen et al. (1999) wurde ein Maximum der Stimulation des Neuritenwachstums durch CHL1 bei einer Konzentration von 1 µg/ml gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurde für das humane Ortholog von CHL1 gezeigt, daß es auch in höheren Konzentrationen das Neuritenwachstum entsprechend stimulierte. Einige der Versuche zeigten zwar einen Abfall der Stimulation bei 2 µg/ml, bei der Betrachtung der Gesamtheit der Versuche scheint dies aber eher Ausdruck der statistischen Variabilität als eines hemmenden Einflusses höherer Konzentrationen zu sein. Für andere Zelladhäsionsmoleküle wurden verschiedene Arten der Konzentrationsabhängigkeit gefunden. Während für F11 ein Schwellenwert, aber keine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden konnte, wurde für NCAM ein Schwellenwert gefunden mit einer Konzentrationsabhängigkeit in Form einer Exponentialfunktion (Hoffmann und Edelmann, 1983) und für N-Cadherin eine lineare Konzentrationsabhängigkeit. Auch der Einfluß von Laminin auf das Neuritenwachstum zeigte sich als wenig abhängig von der Konzentration (Buettner und Pittmann, 1991).

In dieser Arbeit zeigte das humane Ortholog von CHL1 eine Konzentrationsabhängigkeit, die am ehesten linearer Natur bis zu einem Maximalwert ist. Von früheren Autoren wurde vermutet, daß Moleküle mit konzentrationsabhängigem Effekt eine instruktive Funktion für das Neuritenwachstum haben könnten, während die Funktion von Molekülen ohne Konzentrationsabhängigkeit eher permissiver Natur sei (Buettner und Pittmann, 1991).

Da hCHL1-Fc in Versuchen zur Regeneration im Rückenmark in vivo verwendet werden sollte, war es wichtig, auch die Funktion des Proteins in löslicher Form zu bestimmen. In dieser Arbeit stimulierte hCHL1-Fc sowohl substratgebunden, als auch in löslicher, dimerer Form das Neuritenwachstum. Dies wurde auch für das CHL1 der Maus als Fusionsprotein in dimerer Form gezeigt (Chen et al., 1999). Auch hier stimulierte die lösliche Form das Neuritenwachstum weniger als die substratgebundene, was auch damit zusammenhängen könnte, daß die lösliche Form erst 2 h nach dem Ausplattieren der Zellen zugegeben wurde, um eine Beeinträchtigung der Adhäsion zu verhindern. Natürliche lösliche Isoformen von Molekülen der L1-Familie, die das Neuritenwachstum stimulieren, wurden für TAG-1/Axonin-1 (Furley et al., 1990), F3/F11/Contactin (Gennarini et al., 1989) und das CHL1 der Maus (Hillenbrand et al., 1999) beschrieben. Lösliche monomere Isoformen von L1 stimulierten hingegen das Neuritenwachstum nicht, während es in dimerer Form eines Fusionsproteins zu einer Stimulation führte (Doherty et al., 1995). Mit hCHL1-Fc stand nun ein lösliches Molekül zur Verfügung, dessen Einfluß auf das Neuritenwachstum nachgewiesen ist. Ziel war seine Verwendung in Regenerationsversuchen bei Rückenmarksverletzungen.

Rückenmarksverletzungen sind Gegenstand intensiver Forschung. Beim Menschen handelt es sich bei Rückenmarksverletzungen meist um Kontusionen und in geringerem Anteil um Transsektionen mit totalem Querschnittssyndrom. Im Gegensatz zum peripheren Nervensystem kommt es im zentralen Nervensystem aber nur zu geringer neuraler Regeneration. Die Ursachen hierfür lassen sich in drei Bereiche aufteilen: der Zelltod der verletzten und umliegender Neurone, die Unfähigkeit differenzierter Neurone Neuritenwachstum zu initiieren und aufrechtzuerhalten und eine Umgebung, in der restriktive gegenüber permissiven Faktoren überwiegen (Behar et al., 2000), die alle therapeutische Ansatzpunkte bieten. Ein Ansatzpunkt liegt in der Verhinderung des Zelltods. Wenn dies erreicht werden kann, könnten embryonale Stammzellen transplantiert werden, um verlorene Neurone zu ersetzen (McDonald et al., 1999). Potentielle Moleküle hierfür sind L1 und CHL1, für die in vitro ein hemmender Einfluß auf Apoptose nachgewiesen wurde (Chen et al., 1999). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die restriktive Umgebung, die eine Regeneration verhindert und zur Bildung einer glösen Narbe führt. Wie in der Einleitung beschrieben lassen sich die Faktoren der Umgebung in lösliche Faktoren mit Fernwirkung, Moleküle der extrazellulären Matrix sowie Moleküle an der Zelloberfläche einteilen. Eine Möglichkeit, umfassend in dieses System

eingzugreifen, besteht in der Zell- und Gewebstransplantation. So wurden bisher periphere Nerven, Schwannzellen und embryonale Stammzellen mit einigem Erfolg transplantiert (McDonald et al., 1999). Außerdem kann auch in einzelne Systeme regulierend eingegriffen werden. So wurde gezeigt, daß Myelin zentraler Neurone hemmenden Einfluß auf die Regeneration hat. Es konnte durch Applikation von Antikörpern gegen zentrales Myelin eine geringe Verbesserung der Regeneration erzielt werden (Tatagiba et al., 1997), insbesondere wurden Myelin-Associated-Glycoprotein (MAG) (Fawcett und Asher, 1999) und Nogo-A (Chen et al., 2000), zwei Zelladhäsionsmoleküle, als regenerationshemmende Moleküle identifiziert. Weitere *in vitro* als hemmende Signale identifizierte Moleküle sind Semaphorin 3a (Pasterkamp et al., 1999), EphB3 (Miranda et al., 1999) und Moleküle der extrazellulären Matrix wie Phosphacan, Versican, Brevican, Neurocan und Tenascin-R (Fawcett und Asher, 1999). Diese bieten potentielle Ansatzpunkte der Verbesserung der Regeneration. Einen weiteren Ansatzpunkt bilden die das Neuritenwachstum stimulierenden Moleküle. Diese könnten die Regeneration im zentralen Nervensystem steigern, indem sie die Apoptose verhindern, molekulare Mechanismen des Wachstums stimulieren, und als leitende Strukturen des gerichteten Neuritenwachstums wirken. Dies deutete sich für den FGF-Rezeptor an (Cheng et al., 1996). Mit dem zunehmenden Verständnis der Signaltransduktion im Wachstumskegel bietet auch diese Ansatzpunkte, indem dort regulierend eingegriffen wird. hCHL1-Fc wird in einem Regenerationsmodell am gequetschten Rückenmark der Ratte getestet, das durch funktionelle und morphologische Untersuchungen Einsicht in dessen Einfluß auf die Regeneration im Rückenmark bringen soll. So könnte hCHL1-Fc einmal einen Faktor in der Behandlung von Rückenmarksverletzungen beim Menschen darstellen, die wie oben beschrieben auch meist kontusioneller Natur sind, wenn die Vielzahl der die Regeneration beeinflussenden Faktoren ausreichend verstanden sind. Zur Zeit der Einreichung dieser Arbeit lagen die Ergebnisse der Regenerationsexperimente allerdings noch nicht vor. Auch wenn in den letzten Jahren viele ermutigende Ergebnisse veröffentlicht wurden, wird noch intensive Forschung nötig sein, um eine routinemäßige Verbesserung der Regeneration beim Menschen zu erreichen. So ist nicht nur axonales Wachstum, sondern auch ein Wachstum entlang der richtigen Strukturen und eine Erkennung der richtigen Zielzellen und –strukturen mit der Formation funktionierender Synapsen für eine angemessene Reinnervation nötig. Bis dahin wird der Standard der Therapie weiterhin auf zwei Säulen ruhen, zum einen auf der Verhinderung weiterer Zellschädigung durch hochdosierte Corticosteroidapplikation und der operativen Stabilisierung der Wirbelsäule und Dekompression des Rückenmarks, zum anderen auf der Rehabilitation mit Optimierung der verbliebenen Funktion und der Reduktion der auftretenden Probleme.

## **2. Untersuchung der Signaltransduktion von L1 mit der 2-D Polyacrylamidgelelektrophorese (2-D PAGE)**

In dieser Arbeit wurde die Signaltransduktion von L1 mit der 2-D Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht.

Die 2-D PAGE ist eine Technik, die, erstmals von O'Farrell 1975 beschrieben, höchste Auflösungen für Proteinanalysen bereitstellt und deswegen eine Zentralstellung in den sogenannten Proteomics, einem den Genomics entsprechenden Ansatz der globalen Analyse der Genexpression auf Proteinebene, einnimmt. Das Proteom stellt die Gesamtheit der vom Genom einer Zelle exprimierten Proteine dar. Die 2-D PAGE wird heute für verschiedene Fragestellungen verwendet. So können komplexe Proteingemische in ihre einzelnen Polypeptidkomponenten aufgetrennt und Proteinexpressionsmuster in Zellen von Geweben in verschiedenen Zuständen verglichen werden, z.B. normales Gewebe mit demselben Gewebe in tumoröser Entartung oder ein Gewebstyp während der Entwicklung mit dem differenzierten Zustand. Außerdem bietet die 2-D PAGE die Möglichkeit, unter definierten Bedingungen die Antwort einer Zellpopulation auf zu untersuchende Moleküle auf Proteinebene zu untersuchen, da die Expression der Proteine sowohl quantitativ, als auch qualitativ untersucht werden kann, wobei wie in dieser Arbeit die Möglichkeit besteht, z.B. Zelloberflächenmoleküle durch Antikörper spezifisch zu stimulieren, um die Signaltransduktion zu untersuchen. Zur Identifikation und Charakterisierung der Proteine, die hierbei eventuell neu auftreten oder deren Expression sich quantitativ ändert, stehen verschiedene Techniken zur Verfügung wie Peptid-Sequenzierung durch Edman-Degradierung (Bauw et al., 1989), Massenspektroskopie (Schevchenko et al., 1997) und Western Blot. Proteomprofile verschiedener Labore zeigten, daß nur ein Teil der Gene des Genoms in einem bestimmten Zelltyp exprimiert wird (Celis et al., 1998), so daß einzelne Zellen wahrscheinlich nicht mehr als 6000 primäre Translationsprodukte zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimieren, von denen 80-90% Produkte von house-keeping Genen darstellen, die in verschiedener Ausprägung in den meisten Zellen exprimiert werden (Celis et al., 1998). Die 2-D PAGE berücksichtigt auch posttranslationelle Modifikationen wie Glykosylierung und Phosphorylierung. Außerdem können die Effekte von Serin- und Tyrosinkinasen nachgewiesen werden, da diese durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung den isoelektrischen Punkt des untersuchten Moleküls verändern.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion von L1. Es sollten insbesondere mögliche Effekte von Tyrosinkinasen und -phosphatasen durch Verwendung des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers 4G10 im Western Blot des 2-D-Gels untersucht werden. Wie in der Einleitung gezeigt wurde, sind für die Signaltransduktion von L1 zahlreiche mögliche Wege beschrieben und für einige deren Bedeutung bewiesen worden. Auch

Tyrosinphosphorylierung und -dephosphorylierung wurden vorgeschlagen. Es wurde gezeigt, daß L1 selbst an mehreren Stellen der zytoplasmatischen Domäne an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Heiland et al., 1998). Außerdem scheinen Rezeptor- und Non-Rezeptor-Tyrosinkinasen an der Signaltransduktion von Zelladhäsionsmolekülen beteiligt zu sein (Beggs et al., 1994). So wurde Src mit der Funktion von L1 in Verbindung gebracht. Es ist allerdings nicht klar, an welcher Stelle und zu welchem Zeitpunkt diese Kinasen aktiv sind. Neben Tyrosinkinasen müssen an der Regulation auch Phosphatasen beteiligt sein. Es wurden auch hier Rezeptor- und Non-Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen beschrieben, deren Funktion noch nicht genau untersucht wurde. In dieser Arbeit sollte nun mit Hilfe der 2-D PAGE und dem Antikörper 4G10 dieser mögliche Signaltransduktionsweg von L1 charakterisiert werden. Es konnten allerdings keine reproduzierbaren Unterschiede im Tyrosinphosphorylierungsmuster zwischen stimulierten N2A-Zellen und den Zellen der Kontrolle gefunden werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen könnte die Tyrosinphosphorylierung keine Rolle in der Signaltransduktion von L1 spielen. Dies ist bei der Fülle der Experimente, die einen Einfluß der Tyrosinphosphorylierung implizieren aber unwahrscheinlich. Möglich ist außerdem eine fehlende Stimulierung der N2A-Zellen durch den verwendeten Antikörper AK 557.B6. Auch dies ist unwahrscheinlich, da AK 557.B6 in früheren Experimenten spezifisch mit L1 reagierte und Neuritenwachstum stimulierte, zu einer Steigerung der Expression von Inositolphosphaten führte und die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erhöhte (Appel et al., 1995). Ausgeschlossen ist aber nicht, daß hier nur einer von mehreren möglichen Signaltransduktionswegen stimuliert wurde, da AK 557.B6 spezifisch zwischen der zweiten und dritten FNIII-Domäne bindet und andere Wege eventuell durch unterschiedliche Interaktionen von L1 stimuliert werden. Wahrscheinlicher ist allerdings, daß die Ursache des fehlenden Nachweises eines Unterschieds im Proteinexpressionsmuster zwischen stimulierten Zellen und Kontrollzellen in der 2-D PAGE zu suchen ist. Der Nachweis von Polypeptiden kann aus unterschiedlichen Gründen in der 2-D PAGE fehlschlagen. So werden einige Proteine durch den Lysierpuffer nicht ausreichend gelöst und können so nicht detektiert werden. Andere Proteine haben einen isoelektrischen Punkt, der außerhalb des pH-Bereichs des verwendeten Streifens für die isoelektrische Fokussierung liegt. Proteine mit zu hohem oder niedrigem Molekulargewicht wandern nicht ins Polyacrylamidgel und bleiben deswegen unberücksichtigt. Deswegen wurde auch in dieser Arbeit L1, das mit seinem hohen Molekulargewicht nicht berücksichtigt wird, nicht detektiert, obwohl eine Veränderung der Tyrosinphosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne zu erwarten war. Einige Proteine präzipitieren auch und verstreichen so anstatt einen Spot zu bilden. Auch liegt die Menge einiger Proteine einfach unter der Detektionsgrenze der verwendeten Nachweismethode. Schließlich wurden von verschiedenen Gruppen Probleme mit den vorgefertigten Streifen für die isoelektrische

Fokussierung, die zu Streifen und Präzipitaten führten, beschrieben (Righetti und Bossi, 1997), was auch in dieser Arbeit auffiel. Die Ursache des fehlenden Nachweises in dieser Arbeit ist letztlich ungeklärt. Obwohl noch nicht viele Ergebnisse dieser neuen Technik im Bereich der Neurobiologie vorliegen (für Beispiele siehe Fountoulakis et al., 1999; Lubec et al., 1999), wird sie noch weitere Einblicke in die Signaltransduktion neuraler Zelladhäsionsmoleküle bringen.

Zusammen mit anderen Ansätzen wird eine Aufklärung der Signaltransduktion der neuralen Zelladhäsionsmoleküle weitere therapeutische Ansatzpunkte liefern wie dies schon in der Diskussion der Ergebnisse der Neuritenwachstumsexperimente angedeutet wurde. Eventuell wird man durch Eingriffe in die Signaltransduktion die Regeneration bei Rückenmarksverletzungen verbessern können. Zu bedenken ist bei allen Ansätzen zur Steigerung der Regeneration, daß schon ein Rest von 10% funktionierender Neuronen im Rückenmark oft das aufrechte Gehen, eventuell mit Gehhilfen, ermöglicht, und so auch geringe Steigerungen der Regeneration zu großen Effekten für den betroffenen Patienten führen können.

## E. Zusammenfassung

Das humane orthologe Molekül von CHL1 (hCHL1) ist ein kürzlich entdecktes Molekül aus der L1-Familie von Zelladhäsionsmolekülen. Die Moleküle dieser Teilfamilie der Ig-Superfamilie sind an zahlreichen Vorgängen in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion des zentralen und peripheren Nervensystems beteiligt. In dieser Arbeit sollte ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von hCHL1 und dem F<sub>c</sub> von IgG<sub>1</sub> hergestellt werden, um mit diesem in Neuritenwachstumsexperimenten die Funktion von hCHL1 zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst ein für das Fusionsprotein hCHL1-Fc kodierendes Plasmid konstruiert, das durch CaPO<sub>4</sub>-Transfektion in CHO-K1-Zellen eingeführt wurde. In diesem eukaryontischen Expressionssystem wurde das Fusionsprotein in dimerer Form in den Überstand sezerniert und konnte über Protein A-Sepharose aufgereinigt werden. Nachdem dessen Identität im Western Blot gesichert war, wurde es zu Neuritenwachstumsexperimenten in der Cerebellum-Zellkultur verwendet. Es wurde gezeigt, daß hCHL1-Fc das Neuritenwachstum von Cerebellumzellen der Maus sowohl substratgebunden, als auch in löslicher Form konzentrationsabhängig in ähnlichem Maße wie L1 und Laminin stimuliert. Nach Sicherung der Funktion wird hCHL1-Fc nun in Experimenten zur Regeneration bei Rückenmarksverletzungen durch Kontusion an Ratten verwendet und wird so möglicherweise eine Teilfunktion in der Therapie von Rückenmarksverletzungen einnehmen können.

L1 ist ein weiteres Molekül der L1-Familie, dessen Funktion schon näher charakterisiert wurde. Seine Signaltransduktion ist Gegenstand intensiver Forschung. Zahlreiche potentielle Transduktionswege wurden beschrieben. In dieser Arbeit sollte der noch weitgehend unbekannte Einfluß von Tyrosinkinasen und -phosphatasen untersucht werden. Dazu wurden N2A-Zellen kultiviert, mit dem Anti-L1-Antikörper AK 557.B6 stimuliert, der in früheren Experimenten erfolgreich Neuritenwachstum und Ca<sup>2+</sup>-Influx stimulierte, und schließlich lysiert. Das Lysat wurde durch 2-D Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mit der Silberfärbung angefärbt bzw. im Western Blot mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 verwendet, um Unterschiede zwischen den stimulierten Zellen und der Kontrolle festzustellen. In dieser Arbeit konnten keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen stimulierten Zellen und Kontrolle gefunden werden, was den Einfluß von Tyrosinkinasen und -phosphatasen aber keineswegs unwahrscheinlich macht.

## F. Literatur

- Angeloni D, Lindor NM, Pack S, Latif F, Wei MH, Lerman MI (1999) *CALL* gene is haploinsufficient in a 3p- syndrome patient. *Am J Med Genet* 86:482-85
- Angeloni D, Wei MH, Lerman MI (1999) Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CALL* gene for association studies with IQ. *Psychiatr Genet* 9:165-67
- Appel F, Holm J, Conscience JF, Schachner M (1993) Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J Neurosci* 13:4764-75
- Appel F, Holm J, Conscience JF, von Bohlen und Halbach F, Faissner A, James P, Schachner M (1995) Identification of the border between fibronectin type III homologues repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain. *J Neurobiol* 28:297-312
- Arquint M, Roder J, Chia LS, Down J, Wilkinson D, Bayley H, Braun P, Dunn R (1987) Molecular cloning and primary structure of myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:600-04
- Barbacid M (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* 7:148-55
- Bauw G, Van Damme J, Puype M, Vandekerckhove J, Gesser B, Ratz GP, Lauridsen JB, Celis JE (1989) Protein-electroblotting and microsequencing strategies in generating protein databases from two-dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7701-05
- Bebbington CR (1991) Expression of antibody genes in nonlymphoid mammalian cells. *Methods* 2:136-45
- Becker JW, Erickson HP, Hoffman S, Cunningham BA, Edelman GM (1989) Topology of cell adhesion molecules. *Proc Nat Acad Sci USA* 86:1088-92
- Beggs HE, Soriano P, Maness PF (1994) NCAM dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from *fyn*-minus mice. *J Cell Biol* 127:825-843
- Behar O, Mizuno K, Neumann S, Woolf CJ (2000) Putting the spinal cord together again. *Neuron* 26:291-93
- Bixby JL, Lilien J, Reichardt LF (1988) Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol* 107:353-61

- Bixby JL, Zhang R (1990) Purified N-Cadherin is a potent substrate for rapid induction of neurite outgrowth. *J Cell Biol* 110:1253-60
- Bixby JL, Harris WA (1991) Molecular mechanisms of axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Biol* 7:117-59
- Brümmendorf T, Hubert M, Treubert U, Leuschner R, Tarnok A, Rathjen FG (1993) The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with NgCAM and restrictin. *Neuron* 10:711-27
- Brümmendorf T, Rathjen FG (1993) Axonal Glycoproteins with with immunoglobulin- and fibronectin type III-related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* 61:1207-19
- Brümmendorf T, Rathjen FG (1994) Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile* 1:951-1021
- Brümmendorf T, Rathjen FG (1995) Cell adhesion molecules 2: immunoglobulin superfamily *Protein Profile* 2:963-1058
- Brümmendorf T und Rathjen FG (1996) Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6:584-93
- Buettner HM, Pittman RN (1991) Quantitative effects of laminin concentration on neurite outgrowth in vitro. *Dev Biol* 145:266-76
- Celis JE, Østergaard M, Jensen NA, Gromova I, Rasmussen HH, Gromov P (1998) Human and mouse proteomic databases: novel resources in the protein universe. *FEBS Lett* 430:64-72
- Cervello M, Matranga V, Durbec P, Rougon G, Gomez S (1996) The GPI-anchored adhesion molecule F3 induces tyrosine phosphorylation: involvement of FNIII repeats *J Cell Sci* 109:699-704
- Chaisuksunt V, Campbell G, Zhang Y, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN (2000) The cell recognition molecule CHL1 is strongly upregulated by injured and regenerating thalamic neurons. *J Comp Neurol* 425:382-92
- Chen A, Haines S, Maxson K, Akeson RA (1994) VASE exon expression alters NCAM-mediated cell-cell interactions. *J Neurosci Res* 38:483-92
- Chen C, Okayama H (1987) High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-52

- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME (2000) Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1 *Nature* 403:434-39
- Chen S, Mantei N, Dong L, Schachner M (1999) Prevention of neuronal cell death by neural adhesion molecules L1 and CHL1. *J Neurobiol* 38:428-39
- Cheng H, Cao Y, Olson L (1996) Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function. *Science* 273:510-13
- Clauss G, Ebner H (1977) *Grundlagen der Statistik*. Thun und Frankfurt am Main, Verlag Harri Deutsch S:224-36
- Cockett MI, Bebbington CR, Yarranton GT (1990) High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Bio/Technology* 8:662-67
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kremer P, Scheff S (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulbs and deficits in spatial learning. *Nature* 367:455-59
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger E, Brachenbury R, Edelman GM (1987) Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative splicing. *Science* 236:799-806
- Dahlin-Huppe K, Berglund EO, Ranscht B, Stallcup WB (1997) Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol Cell Neurosci* 9:144-56
- Damsky CH, Werb Z (1992) Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr Op Cell Biol* 4:772-81
- Davis JQ, Bennett V (1994) Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 269:27163-66
- DeBernardo AP, Chang S (1996) Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J Cell Biol* 133:657-66
- Diezel W, Kopperschlager G, Hofmann E (1972) An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* 48:617-20
- Doherty P, Williams E, Walsh FS (1995) A soluble chimeric form of the L1 glycoprotein stimulates neurite outgrowth. *Neuron* 14:57-66

- Doherty P, Walsh F (1996) CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 8:99-111
- Edelmann GM (1969) The covalent structure of an entire gamma G immunoglobulin molecule. *Proc Nat Acad Sci USA* 63:78-85
- Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR (1978) Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Immunochemistry* 15:429-36
- Fawcett JW, Asher RA (1999) The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49:377-91
- Felsenfeld DP, Hynes MA, Skoler KM, Furley AJ, Jessell TM (1994) TAG-1 can mediate homophilic binding, but neurite outgrowth on TAG-1 requires an L1-like molecule and  $\beta 1$  integrins. *Neuron* 12:1-20
- Felsenfeld DP, Choquet D, Sheetz MP (1996) Ligand binding regulates the directed movement of  $\beta 1$  integrins on fibroblasts. *Nature* 383:438-40
- Fountoulakis M, Cairns N, Lubec G (1999) Increased levels of 14-3-3 gamma and epsilon proteins in brain of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 57:323-35
- Fransen E, Vits L, Van Gamp G, Willems PJ (1996) CRASH syndrome: the clinical spectrum of mutations in L1, a neuronal cell adhesion molecule. *Am J Med Genet* 64:73-77
- Friedländer DR, Milev P, Karthikeyan L, Margolis RK, Margolis RU, Grumet M (1994) The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules NgCAM/L1/Nile and NCAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 125:669-80
- Furley AJ, Morton SB, Manalo D, Karagogeos D, Dodd J, Jessell TM (1990) The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth promoting activity. *Cell* 61:157-70
- Garver TD, Davies JQ, Ren Q, Bennett V (1996) Association of ankyrin with the neuronal cell adhesion molecule neurofascin: regulation by both tyrosin phosphorylation and alternative exon usage. *Mol Biol Cell [Suppl]* 7:384a
- Gennarini G, Cibelli G, Rougon G, Mattei MG, Goridis C (1989) The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. *J Cell Biol* 109:775-88

- Girault JA, Hemmings HC, Zorn SH, Gustafson EL, Grengard P (1990) Characterization in mammalian brain of DARPP-32 serine kinase identical to casein kinase II. *J Neurochem* 55:1772-83
- Görg A, Postel W, Günther S, Weser J (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6:599-604
- Görg A, Postel W, Günther S (1988) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH-Gradients. *Electrophoresis* 9:531-46
- Graf J, Iwamoto Y, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Robey FA, Yamada Y (1987) Identification of an amino acid sequence in laminin mediating cell attachment, chemotaxis, and receptor binding. *Cell* 48:989-96
- Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P (1973) Protein composition of myelin in the peripheral nervous system. *J Neurochem* 20:1207-16
- Gumbiner BM (1993) Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11:551-64
- Gundersen RW, Barrett JN (1980) Characterization of turning response of dorsal root ganglion neurites toward nerve growth factor. *J Cell Biol* 87:546-54
- Heiland PC, Griffith LS, Lange R, Schachner M, Hertlein B, Traub O, Schmitz B (1998) Tyrosine and serine phosphorylation of the neural cell adhesion molecule L1 is implicated in its oligomannosidic glycan dependent association with NCAM and neurite outgrowth. *Eur J Cell Biol* 75:97-106
- Hemperly JJ, Edelman GM, Cunningham BA (1986) cDNA clones of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) lacking a membrane-spanning region consistent with evidence for membrane attachment via a phosphatidylinositol intermediate. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9822-26
- Hillenbrand R, Molthagen M, Montag D, Schachner M (1999) The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions. *Eur J Neurosci* 11:813-26
- Hlavín ML, Lemmon V (1991) Molecular structure and functional testing of human L1CAM: an interspecies comparison. *Genomics* 11:416-423
- Hoffman S, Sorkin BC, White PC, Brackenbury R, Mailhammer R (1982) Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J Biol Chem* 257:7720-29

- Hoffmann S, Edelman GM (1983) Kinetics of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci* 80:5762-66
- Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Moos M, Lübbert H, Montag D, Schachner M (1996) Structural features of a close homolog of L1 (CHL1) in the mouse: a novel member of L1 family of neural recognition molecules. *Eur J Neurosci* 8:1613-29
- Horstkorte R, Schachner M, Magyar JP, Vorherr T, Schmitz B (1993) The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 121:1409-21
- Juliano RL, Haskill S (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* 120:577-85
- Jørgensen OS (1995) Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodelling. *J Neurochem Res* 20:533-47
- Keilhauer G, Faissner A, Schachner M (1985) Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and NCAM antibodies. *Nature* 316:728-30
- Keith FJ, Gay NJ (1990) The drosophila membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO* 9:4299-4306
- Klagsbrunn M, Baird A (1991) A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 67:229-31
- Klose J (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues: A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26:231-43
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-85
- Lahrtz F, Schachner M, Montag D (1997) The VASE encoded peptide modifies NCAM and L1 mediated neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 50:62-68
- Lee EC (1991) Cytogenetic analysis of continuous cell lines. In: *The ACT Cytogenetic Laboratory Manual*, 2nd ed., Raven Press, New York S 107-28
- Lemmon V, Farr KL, Lagenaur C (1989) L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2:1597-1608

- Lisei P (1991) Laminin and fibronectin and their cellular receptors during neural development. *Seminars in the neurosciences* 3:331-40
- Lubec G, Nonaka M, Krapfenbauer K, Gratzner M, Cairns N, Fountoulakis M (1999) Expression of the dihydropyrimidinase related protein 2 (DRP-2) in Down syndrome and Alzheimer's disease brain is downregulated at the mRNA and dysregulated at the protein level. *J Neural Transm Suppl* 57:161-77
- Main AL, Harvey TS, Baron M, Boyd J, Campbell ID (1992) The three dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions *Cell* 71:671-78
- Maisonpierre P, Belluscio L, Squinto S, Ip N, Furth M (1990) Neurotrophin-3: a novel factor related to NGF and BDNF. *Science* 247:1446-51
- Martini R, Schachner M (1988) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (I1, NCAM, and MAG) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106:1735-46
- Maurel P, Rauch U, Flad M, Margolis RK, Margolis RU (1994) Phosphacan, a chondroitin sulfate proteoglycan of brain that interacts with neurons and neural cell adhesion molecules, is an extracellular variant of a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2512-16
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 5:1410-12
- Messerschmidt EK, Leonardo ED, Shatz CJ, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Kolodkin AL (1995) Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal chord. *Neuron* 14:949-59
- Milev P, Friedländer DR, Sakurai T, Karthikeyan L, Flad M, Margolis RK, Grumet M, Margolis RU (1994) Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 127:1703-15
- Miranda JD, White LA, Marcillo AE, Willson CA, Jagid J, Whittemore SR (1999) Induction of EPH B3 after spinal cord injury. *Exp Neurol* 156:218-222

- Montgomery AMP, Becker JC, Siu CH, Lemmon VP, Cheresch DA, Pancook JD, Zhao X Reisfeld RA (1996) Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin  $\alpha V\beta 3$ . *J Cell Biol* 132:475-85
- Morrissey JH (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117:307-10
- Moscoso LM, Sanes JR (1995) Expression of four immunoglobulin superfamily adhesion molecules (L1, NrCAM, /Bravo, Neurofascin/ABGP, and NCAM) in the developing mouse spinal cord. *J Comp Neurol* 352:321-334
- Nakic M, Mitrovic N, Sperk G, Schachner M (1996) Kainic acid activates transient expression of Tenascin-C in the adult rat hippocampus. *J Neurosci Res* 44:355-62
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-21
- Pasterkamp RJ, Giger RJ, Ruitenberg MJ, Holtmaat AJGD, De Wit J, De Winter F, Verhaagen J (1999) Expression of the gene encoding the chemorepellent semaphorin III is induced in the fibroblast component of neural scar tissue formed following injuries of adult but not neonatal CNS. *Mol Cell Neurosci* 13:143-66
- Peles E, Nativ M, Campbell PL, Sakurai T, Martinez R (1995) The carbonic anhydrase domain of receptor tyrosine phosphatase  $\beta$  is a functional ligand for the axonal cell recognition molecule contactin. *Cell* 82:251-60
- Pennington SR, Wilkins MR, Hochstrasser DF, Dunn MJ (1997) Proteome analysis: From protein characterization to biological function. *Trends in Cell Biology* 7:168-173
- Pesheva P, Gennarini G, Coridis C, Schachner M (1993) The F3/F11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180. *Neuron* 10:69-82
- Pierceall WE, Cho KR, Getzenberg RH, Reale MA, Hedrick L, Vogelstein B Fearon ER (1994) NIH3T3 cells expressing the deleted in colorectal cancer tumor suppressor gene product stimulate neurite outgrowth in rat PC12 pheochromocytoma cells. *J Cell Biol* 124:1017-27
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 303:31-33
- Raffioni S, Bradshaw RA, Buxser SE (1993) The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins. *Annu Rev Biochem* 62:823-50

- Rathjen FG, Rutishauser U (1984) Comparison of two cell surface molecules involved in neural cell adhesion. *EMBO* 3:461-65
- Rathjen FG, Wolff JM, Chiquet-Ehrismann R (1991) Restrictin: a chick neural extracellular matrix protein involved in cell attachment co-purifies with the cell recognition molecule F11. *Development* 113:151-64
- Reth M (1992) Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 10:97-121
- Righetti PG, Bossi A Isoelectric focussing in immobilized pH gradients: recent analytical and preparative developments. *Anal Biochem* 247:1-10
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238:491-97
- Ruppert M, Aigner S, Hubbe M, Yagita H, Altevogt P (1995) The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J Cell Biol* 131:1881-91
- Rutishauser U (1993) Adhesion molecules of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 3:709-15
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-67
- Santoni MJ, Barthels D, Vopper G, Boned A, Goridis C, Wille W (1989) Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *EMBO* 8:385-92
- Schachner M (1989) Families of neural adhesion molecules. *Ciba Found Symp* 145:156-69
- Schachner M, Martini R (1995). Glycans and the modulation of neural-recognition molecule function. *TINS* 18:183-91
- Schevchenko A, Wilm M, Mann M (1997) Peptide sequencing by mass spectrometry for homology searches and cloning genes. *J Prot Chem* 16:481-90
- Schneppenheim R, Budde U, Dahlmann N, Rautenberg P (1991) Luminography – a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* 12:367-72
- Schnitzer J, Schachner M (1981) Characterization of isolated mouse cerebellar cell populations in vitro. *J Neuroimmunol* 1:457-70
- Schubert D (1991) The possible role of adhesion in synaptic modifications. *TINS* 14:127-30

- Schwab ME, Kapfhammer JP, Bandtlow CE Inhibitors of neurite growth  
Annu Rev Neurosci 1993 16:565-95
- Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, Perry-O'Keefe H, Rokey M, Sutherland E  
Slatko BE (1992) CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated  
DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase.  
Biotechniques 13:626-33
- Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thomson A, Lehmann MS, Gröbel G, Legrand JF,  
Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995): Structural basis of cell-cell adhesion by  
Cadherins. Nature 374:327-37
- Simmons DL (1993) Dissecting the modes of interactions amongst cell adhesion molecules.  
Dev Suppl 193-203
- Small SJ, Akeson R (1990) Expression of the unique NCAM VASE exon is independently  
regulated in distinct tissues during development. J Cell Biol 111:2089-96
- Spring J, Beck K, Chiquet-Ehrismann R (1989): Two contrary functions of tenascin: dissection  
of the active sites by recombinant tenascin fragments. Cell 59:325-34
- Takeichi M (1990) Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion.  
Ann Rev Biochem 59:237-52
- Tatagiba M, Brosamle C, Schwab ME (1997) Regeneration of injured axons in the adult  
mammalian central nervous system. Neurosurgery 40:541-46
- Thomsen NK, Soroka V, Jensen PH, Berezin V (1996) The three-dimensional structure of the  
first domain of neural cell adhesion molecule. Nat Struct Biol 3:581-85
- Thor G, Probstmeier R, Schachner M (1987) Characterization of the cell adhesion molecules L1,  
NCAM and J1 in the mouse intestine. EMBO 6:2581-86
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from  
polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.  
Proc Nat Acad Sci USA 76:4350-54
- Vaughan DE, Bjorkman PJ (1996) The (Greek) key to structures of neural cell adhesion  
molecules. Neuron 16:261-73
- Von Bohlen und Halbach F, Taylor J, Schachner M (1992) Cell type-specific effects of the neural  
adhesion molecules L1 and NCAM on diverse second messenger systems.  
Eur J Neurosci 4:896-909

- Walsh FS, Furness J, Moore SE, Ashton S, Doherty P (1992) Use of the neural cell adhesion molecule VASE exon by neurons is associated with a specific down-regulation of neural cell adhesion molecule-dependent neurite outgrowth in the developing cerebellum and hippocampus. *J Neurochem* 59:1959-62
- Walton KM, Dixon JE (1993) Protein tyrosine phosphatases. *Annu Rev Biochem* 62:101-20
- Wehrle-Haller B, Chiquet M (1993) Dual function of tenascin: simultaneous promotion of neurite growth and inhibition of glial migration. *J Cell Sci* 106:597-610
- Wei MH, Karavanova I, Ivanov SV, Popescu NC, Keck CL, Pack S, Eisen JA, Lerman MI (1998) In silico-initiated cloning and molecular characterization of a novel member of the L1 gene family of neural cell adhesion molecules. *Hum Genet* 103:355-64
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan YX, Gooley AA Hughes G, Humphrey-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF (1996) From proteins to proteomes: Large-scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio Technology* 14:61-65
- Williams AF, Barclay AN (1988) This immunoglobulin superfamily – domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* 6:381-405
- Williams AF, Davis SJ, He Q, Barclay AN (1989) Structural diversity in domains of the immunoglobulin superfamily. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio* 154:637-47
- Williams EJ, Mittal B, Walsh FS, Doherty P (1995) FGF inhibits neurite outgrowth over monolayers of astrocytes and fibroblasts expressing transfected cell adhesion molecules. *J Cell Sci* 108:3523-30
- Wong EV, Schaefer AW, Landreth G, Lemmon V (1995) Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 66:779-786
- Wong EV, Schaefer A, Landreth G, Lemmon V (1996) Involvement of p90rsk in neurite outgrowth mediated by cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 271:18217-18223
- Xiao ZC, Taylor J, Montag D, Rougon G, Schachner M (1996) Distinct effects of recombinant Tenascin-R domains on neuronal cell-adhesion, growth cone guidance, neuronal polarity, and interacting with the neuronal immunoglobulin superfamily adhesion molecule F3/11. *Eur J Neurosci* 8:766-782
- Zhang Y, Roslan R, Land D, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN (2000) Expression of CHL1 and L1 by neurons and glia following sciatic nerve and dorsal root injury. *Mol Cell Neurosci* 16:71-86

## **G. Danksagung**

Ich bedanke mich bei

Prof. Dr. Melitta Schachner für ihr Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten

Dr. Michael Kutsche für den Einstieg in die Molekularbiologie

allen Mitarbeitern des Instituts für die Biosynthese Neuraler Strukturen, die mir im Verlauf meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen

## H. Lebenslauf

### Zur Person

Name: Christian Bernreuther  
Geburtsdatum: 3. November 1972  
Geburtsort: Borås / Schweden

### Ausbildung

1983-1992 Gymnasium Dörpsweg, Hamburg  
6/1992 Abitur

### Wehrdienst

7/1992 – 6/1993 Zerstörer Lütjens, Kiel

### Studium

8/1993 – 1/1994 Studium verschiedener Fächer am  
Central Texas College, Killeen, U.S.A.  
4/1994 – 8/1996 Studium der Physik an der Universität Hamburg  
8/1996 Diplomvorprüfung Physik  
4/1995 – 4/2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg  
3/1997 Physikum  
3/1998 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
10/1998 USMLE Step 1  
3/2000 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
4/2000 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Promotion

Promotionsarbeit bei Prof. Dr. Schachner im Institut für die Biosynthese  
neuraler Strukturen, Hamburg  
Thema: „Funktionelle Analysen der humanen neuronalen  
Zellerkennungsmoleküle L1 und CHL1“

Hamburg, den 2.5.2001

## **I. Erklärung:**

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.