



**Untersuchungen neuer Funktionen der
intrazellulären Domäne des Zelladhäsionsmoleküls L1
im Gehirn von *Mus musculus* (Linnaeus, 1758)**

Dissertation

**Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Department Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Gerrit Wolters

aus Hamburg

Hamburg, August 2010

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. Melitta Schachner
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. Matthias Kneussel
Tag der Disputation: 16. Oktober 2009

Hamburg, den 1. Oktober 2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jörg Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| Kapitel 1 Einleitung..... | 8 |
| 1.1 Neuronale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)..... | 8 |
| 1.2 Die Zelladhäsionsmoleküle der L1-Familie | 10 |
| 1.3 Das Zelladhäsionsmolekül L1..... | 11 |
| 1.3.1 Die intrazelluläre Domäne von L1: Bindungspartner und Signaltransduktion..... | 13 |
| 1.3.2 Regulierte Prozessierung von L1 im Nervensystem | 16 |
| 1.4 Ubiquitinylierung: Proteinabbau und mehr | 18 |
| 1.5 Die post-translationale Modifikation der Sumoylierung..... | 19 |
| 1.6 Kernimport von Proteinen..... | 21 |
| 1.7 Zielsetzung..... | 22 |
| Kapitel 2 Material | 23 |
| 2.1 Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 23 |
| 2.2 Zelllinien | 24 |
| 2.2.1 Basiszelllinien | 24 |
| 2.2.2 Stabil transfizierte Zelllinien | 25 |
| 2.2.3 Zellkulturmedien | 25 |
| 2.2.4 Kultivierung | 26 |
| 2.2.5 Langzeitlagerung von Zellen..... | 26 |
| 2.3 <i>E. coli</i> -Stämme | 27 |
| 2.3.1 Kultivierung | 27 |
| 2.3.2 Stammhaltung | 28 |
| 2.4 Hefestämme | 28 |
| 2.4.1 Basis Hefestamm | 28 |
| 2.4.2 Stabil transformierte Hefestämme | 28 |
| 2.4.3 Kultivierung und Medien..... | 29 |
| 2.4.4 Stammhaltung | 30 |
| 2.5 Antibiotika | 30 |
| 2.6 Inhibitoren | 30 |
| 2.6.1 Stimulanzen | 31 |
| 2.7 Peptide | 31 |
| 2.8 Oligonukleotide | 31 |
| 2.9 Plasmide | 32 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 2.9.1 Expressionskonstrukte | 34 |
| 2.10 Antikörper | 35 |
| 2.10.1 Primärantikörper | 35 |
| 2.10.2 Sekundärantikörper..... | 36 |
| 2.11 Molekulargewichtsstandards | 37 |
| 2.12 Online Datenbanken und Werkzeuge | 38 |
| 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer..... | 38 |
| Kapitel 3 Methoden..... | 40 |
| 3.1 Biochemische Methoden..... | 40 |
| 3.1.1 Affinitätschromatographie | 40 |
| 3.1.2 Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)..... | 42 |
| 3.1.2.1 Silberfärbung | 43 |
| 3.1.2.2 Coomassie-Färbung..... | 44 |
| 3.1.2.3 Immunblot-Analyse (Western blot)..... | 45 |
| 3.1.2.3.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen | 45 |
| 3.1.2.3.2 Immunreaktion..... | 46 |
| 3.1.2.3.3 ECL-Detektion | 47 |
| 3.1.2.3.4 Entfernen gebundener Antikörper vom <i>Western blot</i> | 47 |
| 3.1.3 Proteinfällung | 47 |
| 3.1.3.1 Proteinfällung nach Wessel..... | 47 |
| 3.1.3.2 Acetonfällung | 48 |
| 3.1.4 Proteinbestimmung (BCA-Test)..... | 48 |
| 3.1.5 Gehirnfractionierung..... | 49 |
| 3.1.5.1 Herstellung eines Gehirnhomogenates..... | 49 |
| 3.1.5.1.1 Proteaseansatz mit Gehirnhomogenat | 50 |
| 3.1.5.2 Herstellung eines 17000 g-Überstandes und -Sedimentes | 50 |
| 3.1.5.3 Herstellung eines 100000 g-Überstandes und -Sediments | 50 |
| 3.1.5.4 Präparation von Endosomen..... | 51 |
| 3.1.5.5 Isolation von Zellkernen aus Gehirn..... | 52 |
| 3.1.5.6 Herstellung eines Zellkernextraktes | 53 |
| 3.1.6 Co-Immunpräzipitation | 54 |
| 3.1.7 Qproteome Nuclear Protein Kit, Kernfraktionierungskit | 55 |
| 3.1.8 Co-Immunpräzipitation aus einem Zellkernextrakt | 56 |
| 3.1.9 Hefe-Zwei-Hybrid System..... | 56 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 3.1.9.1 Klonierung des Köderplasmids | 57 |
| 3.1.9.2 Abschätzung der DB-X abhängigen <i>HIS3</i> autoaktivierung..... | 57 |
| 3.1.9.3 Kleinmaßstäbliche Transformation von MaV203..... | 58 |
| 3.1.9.4 Co-Transformation mit DB-X und der AD-Bibliothek | 58 |
| 3.1.9.5 Screening von AD-Bibliotheken nach Bindungspartnern von DB-X | 59 |
| 3.1.9.6 Charakterisierung der Transformanden, die das <i>HIS3</i> Reporter Gen induzieren | 59 |
| 3.1.9.7 Bestätigung der Interaktionen | 60 |
| 3.1.10 Biochemisches <i>Crosslinking</i> | 60 |
| 3.1.11 Puffer Austausch Prozedur..... | 61 |
| 3.1.12 <i>In-vivo Crosslinking</i> | 61 |
| 3.1.13 Verifizierung putativer Bindungspartner durch <i>Pulldown</i> -Experimente..... | 62 |
| 3.1.13.1 Kopplung von Liganden an CNBr-aktivierte Sepharose <i>beads</i> | 62 |
| 3.1.14 Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i> | 63 |
| 3.1.14.1 French Press, Hochdruck Aufschluss-System | 64 |
| 3.1.14.2 Aufreinigung von His-tag Proteinen aus <i>E. coli</i> | 64 |
| 3.1.14.3 Einengen von Proteinlösungen | 65 |
| 3.1.15 Densitometrische Quantifizierung von Banden | 65 |
| 3.1.16 Aufreinigung von His-tag Proteinen aus HEK-293 Zellen | 66 |
| 3.2 Molekularbiologische Methoden | 66 |
| 3.2.1 Restriktionsverdau | 66 |
| 3.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS..... | 67 |
| 3.2.3 Herstellung von kompetenten Bakterien..... | 68 |
| 3.2.4 Transformation von Bakterien | 69 |
| 3.2.5 Polymerase Kettenreaktion PCR..... | 69 |
| 3.2.5.1 Touch Down-PCR | 70 |
| 3.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten..... | 71 |
| 3.2.7 Ligation von DNS | 71 |
| 3.2.8 Minipräparation von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i> -Bakterienkulturen..... | 72 |
| 3.2.9 Maxipräparation von Plasmid-DNS aus <i>E. coli</i> -Bakterienkulturen | 72 |
| 3.2.10 DNS-Isolation aus Agarosegelen..... | 73 |
| 3.2.11 pGEM®-T Easy Vektor System (T/A-Klonierung) | 73 |
| 3.2.12 DNS-Reinheitsanalyse und -Konzentrationsbestimmung | 74 |
| 3.2.13 DNS-Sequenzierung..... | 75 |
| 3.2.14 RNase-freies Arbeiten | 75 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| 3.2.14.1 Präparation von Gesamt-RNS..... | 76 |
| 3.2.14.2 DNase-Behandlung..... | 76 |
| 3.2.14.3 cDNS-Synthese, Reverse Transkription | 76 |
| 3.3 Zellbiologische Methoden | 77 |
| 3.3.1 Aufarbeitung von Zellen und Zellkulturüberständen | 77 |
| 3.3.2 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren u/o Stimulanzen | 78 |
| 3.3.3 Transfektion von Zelllinien | 78 |
| 3.3.4 Immunhistochemie von Zellen | 79 |
| 3.3.4.1 Färbung von <i>Paraspeckles</i> | 80 |
| 3.3.5 Primärzellkultur | 80 |
| 3.3.5.1 Beschichtung von Oberflächen mit poly-L-Lysin (PLL) | 80 |
| 3.3.5.2 Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen | 81 |
| Kapitel 4 Ergebnisse | 83 |
| 4.1 Das Zelladhäsionsmolekül L1 transloziert in den Zellkern | 83 |
| 4.1.1 Immunhistochemische Analyse der L1-Kernlokalisierung in primären Kleinhirnneuronen. | 83 |
| 4.1.2 Immunhistochemische Analyse der L1-Kernlokalisierung in Zelllinien | 84 |
| 4.2 Analyse der L1-Kernlokalisierung | 86 |
| 4.2.1 Biochemische Analyse der L1-Kernlokalisierung in Gehirnregionen..... | 87 |
| 4.2.2 Biochemische Analyse der L1-Kernlokalisierung in Kleinhirnneuronen..... | 89 |
| 4.2.3 Stimulation von Kleinhirnneuronen mit L1-557 und dessen Einfluss auf den L1-Kernimport | 90 |
| 4.2.4 Einfluss der Protease-Inhibitoren DAPT und GM6001 auf den L1-Kernimport | 92 |
| 4.2.5 Stimulation von Zellen und Kernimport von L1..... | 94 |
| 4.2.5.1 Einfluss von Ionomycin auf die L1-Prozessierung | 94 |
| 4.2.5.2 Kernimport von L1 nach Glutamat-Stimulation von SH-SY5Y Zellen | 96 |
| 4.2.5.3 Stimulation von SH-SY5Y Zellen mit L1-Fc..... | 98 |
| 4.2.6 Untersuchungen zur L1-Prozessierung durch γ -Sekretase..... | 98 |
| 4.3 Eukaryotische L1-Konstrukte..... | 100 |
| 4.3.1 Klonierung der eukaryotischen L1-Konstrukte..... | 101 |
| 4.3.2 Expression der Konstrukte in HEK-Zellen | 102 |
| 4.3.3 Untersuchung der Kernlokalisierung der L1-Konstrukte..... | 103 |
| 4.4 Posttranslationale Modifikationen der L1-ID | 107 |
| 4.4.1 Ist L1 sumoyliert? | 107 |
| 4.4.2 Untersuchungen zur möglichen Ubiquitylierung von L1..... | 109 |
| 4.5 Der Weg in den Kern | 110 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| 4.5.1 Ist der L1-Kernimport Importin abhängig?..... | 110 |
| 4.5.2 Verteilung von L1 in Endosomen..... | 111 |
| 4.5.3 Existiert Ubiquitinyliertes L1 in Endosomen?..... | 113 |
| 4.6 Bindungspartnersuche der L1-ID..... | 115 |
| 4.6.1 Hefe-Zwei-Hybrid System..... | 115 |
| 4.6.2 Crosslinking mit L1-Peptiden..... | 119 |
| 4.6.3 Affinitätschromatographie und massenspektrometrische Analysen..... | 120 |
| 4.6.3.1 Generierung eines prokaryotischen Expressionsvektors der L1-ID | 121 |
| 4.6.3.2 Ergebnisse der Affinitätschromatographie | 122 |
| 4.6.4 Verifizierung der L1-Bindungspartner aus der Affinitätschromatographie | 126 |
| 4.6.4.1 Co-Lokalisation von L1 mit nuklearen Bindungspartnern | 129 |
| 4.6.5 Co-Lokalisation von L1 und PSP1 in <i>Paraspeckles</i> ? | 130 |
| Kapitel 5 Diskussion..... | 131 |
| Kapitel 6 Zusammenfassung..... | 153 |
| Kapitel 7 Summary | 155 |
| Kapitel 8 Literaturverzeichnis..... | 157 |
| Kapitel 9 Anhang | 172 |
| 9.1 Plasmidkarten..... | 172 |
| 9.2 Abkürzungsverzeichnis | 175 |
| 9.3 Verzeichnis der Tabellen | 177 |
| 9.4 Verzeichnis der Abbildungen..... | 178 |
| 9.5 Danksagung | 180 |

Kapitel 1 EINLEITUNG

1.1 NEURONALE ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE DER IMMUNGLOBULIN-SUPERFAMILIE (IGSF)

Sowohl die präzise räumliche als auch zeitlich abgestimmte Organisation von Zell-Zellinteraktionen oder Zell-extrazelluläre Matrix (EZM)-Interaktionen stellt eine wesentliche Voraussetzung für das Funktionieren des Organismus dar und spielt insbesondere im Nervensystem eine entscheidende Rolle.

In der Entwicklung wie auch im adulten Nervensystem, vermitteln neuronale Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie homo- und heterophile Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen. IgSF-Mitglieder werden mit den Integrinen, den kalziumabhängigen Cadherinen und Molekülen der extrazellulären Matrix zu der Gruppe der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle zusammengefasst.

Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie, die größte bisher identifizierte Proteinfamilie mit mehr als 750 Mitgliedern (Lander et al., 2001), werden durch ein gemeinsames Strukturmotiv, der Immunglobulin-ähnlichen Domäne (Ig-ähnliche Domäne) charakterisiert.

Die Ig-ähnliche Domäne wird als eine heterogene Domäne angesehen, die auf einer verbreiteten Faltung beruht. Proteine mit Ig-ähnlichen Domänen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verteilung in Geweben, ihrer Aminosäure-Zusammensetzung und ihrer biologischen Funktionen (Bork et al., 1994; Halaby and Mornon, 1998; Halaby et al., 1999).

Alle Ig-ähnlichen Domänen haben eine Bindungsfunktion gemein. Ihre Liganden reichen von kleinen Molekülen (Antigene, Chromophore), zu Hormonen (Wachstumshormon, Interferone, Prolactin) bis hin zum Riesenmolekül Titin in Muskeln (Halaby and Mornon, 1998). Bindungsstellen befinden sich entweder in der Loop-Region (den variabelsten Bereichen der Immunglobuline) oder in den β -Strängen. Beispielsweise sind bestimmte Bereiche der β -Faltblatt-Strukturen für die Bindung von Liganden an CD8, CD4 oder an den Wachstumshormon-Rezeptor (GHR) zuständig. Diese Bindungsstellen werden von einem Faltblatt (CD2, CD4), durch Homodimere (GHR, CD8) oder durch Heterodimere gebildet (Halaby and Mornon, 1998).

Klassische Ig-ähnliche Domänen bestehen aus 7 bis 10 β -Strängen, welche in zwei Faltblättern mit typischer Topologie und Verknüpfung zu einem „ β -Fass“ angeordnet sind.

Kapitel 1 Einleitung

Zwei Cysteine in einem Abstand von 55 bis 75 Aminosäuren bilden je eine intramolekulare Disulfidbrücke. Die grundsätzliche Form von Ig-ähnlichen Domänen ist hochkonserviert, aber sie können sich signifikant in ihrer Größe unterscheiden, was eine hohe Variabilität der Loops zur Folge hat.

Ig-ähnliche Domänen werden nach der Anzahl an β -Strängen in vier Klassen unterteilt (Bork et al., 1994; Halaby and Mornon, 1998). Die Abbildung 1.1 zeigt eine Schematische

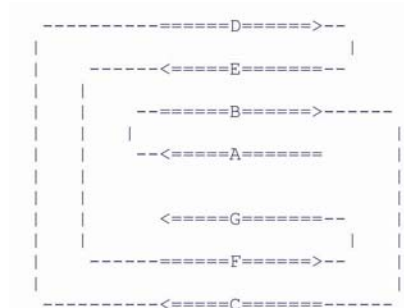


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer C1-Typ Ig-ähnlichen Domäne.

Die Pfeile (=>) deuten die Richtung der β -Stränge an.

Darstellung einer C1-Typ Ig-ähnlichen Domäne, wie sie exklusiv im Immunsystem vorkommt.

Faltblatt I besteht aus den β -Strängen ABED, Faltblatt II aus CFG. Im C2-Typ ist Strang D deletiert und durch C' ersetzt, welcher direkt mit E verbunden ist. C2-Typ Ig-ähnliche Domänen sind u.a. in den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen der L1-Familie zu finden.

Die Typen V und H stellen weitere intermediäre Formen von Ig-ähnlichen Domänen dar (Harpaz and Chothia, 1994).

Ein zweites Strukturmotiv, das in den meisten, obgleich nicht allen, IgSF-Mitgliedern gefunden wurde, ist die Fibronektindomäne (Fn-Domäne) (Crossin and Krushel, 2000).

Fibronectin ist ein dimeres Glykoprotein, welches aus, über Disulfidbrücken verbundene, Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von jeweils 220-250 kDa, besteht. Es ist in Prozessen der Zelladhäsion, Zellmorphologie, Zellmigration und Embryonalentwicklung involviert. Fibronectin ist ein modulares Protein, das sich aus homologen Repeats dreier prototypischer Domänen bekannt als Typ I, II und III zusammensetzt (Petersen et al., 1983). Fibronectin Typ-III (FN-3) Domänen stellen die größten und auch häufigsten Fibronectin-Subdomänen dar und wurden in diversen tierischen Proteinfamilien identifiziert, wie z.B. Proteinen der extrazellulären Matrix, Oberflächenrezeptoren, Enzymen und Muskel-Proteinen (Bork and Doolittle, 1992). Strukturell besteht eine FN-3 Domäne aus einem „ β -Sandwich“ mit einem β -Faltblatt aus vier Strängen und einem zweiten Faltblatt aus drei Strängen (de Vos et al., 1992; Leahy et al., 1992). Diese Faltungstopologie ist der von Ig-ähnlichen Domänen sehr ähnlich, mit dem Unterschied, dass FN-3 Domänen nicht über

Disulfidbrücken verfügen. Der hydrophobe Kern und das Fehlen von Sequenzhomologien schließt eine evolutionäre Verwandtschaft von FN-3 und Ig-ähnlichen Domänen aus (Leahy et al., 1992).

1.2 DIE ZELLADHÄSIONSMOLEKÜLE DER L1-FAMILIE

Das 1980 entdeckte neurale Zelladhäsionsmolekül L1 (Rathjen and Schachner, 1984) ist Namensgeber und Gründer der neuronalen L1-Familie (Brummendorf and Rathjen, 1996; Hortsch, 1996). Die L1-Familie ist eine Untergruppe der großen Immunglobulin-Superfamilie der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) und setzt sich aus Transmembranproteinen mit sechs Ig-ähnlichen Domänen und vier bis fünf FN-3 ähnlichen extrazellulären Domänen zusammen (Brummendorf et al., 1998). Darüber hinaus zeichnet sie eine hochkonservierte



zytoplasmatische Domäne (ID) mit Ankyrin-Bindestellen aus. Die L1-Familie hat zur Zeit vier bekannte Mitglieder in Vertebraten L1 (Moos et al., 1988), NrCAM (Favre-Sarrailh et al., 1999), CHL1 (Holm et al., 1996) und Neurofascin (Zonta et al., 2008), sowie drei Mitglieder in Invertebraten, Neuroglian in Arthropoden (Godenschwege et al., 2006), Tractin in Egel (Hirundinea) (Johansen et al., 1992) und LAD-1 in Nematoden (Brummendorf et al., 1998; Chen et al., 2001). Im Nervensystem spielen diese Proteine eine Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen wie neuronaler Migration, Myelinisierung, Axon-Wachstum, Axon-Faszikulation und axonaler Wegfindung spielen (Hortsch, 1996).

Abbildung 1.2: Die Zelladhäsionsmoleküle der L1-Familie.

Die Mitglieder der L1-Familie teilen überwiegend ein gemeinsames zeitliches und räumliches Expressionsmuster. Die Expression setzt relativ spät in der Entwicklung des

Nervensystems, hauptsächlich in der Zeit der Axogenese, ein (Martini and Schachner, 1986; Seilheimer and Schachner, 1988). Sowohl im ZNS als auch im PNS ist ihre Expression hauptsächlich auf Neurone beschränkt, besonders auf Axone (Hortsch, 1996).

Kapitel 1 Einleitung

Mehrere Mitglieder der L1-Familie gehen mit Ig-ähnlichen Domänen ihrer extrazellulären Region homophile Bindungen ein, d.h. sie binden Moleküle ihrer eigenen Art (Kadmon et al., 1990b; Kunz et al., 1998). Dieses geschieht entweder in *cis* Position, wobei die Moleküle auf derselben Zelloberfläche miteinander reagieren und dadurch auf der Zelloberfläche akkumulieren, oder die Interaktion geschieht in *trans*, so dass zwei Moleküle auf unterschiedlichen Zelloberflächen eine Bindung eingehen. Bei L1 z.B. wurde die zweite Ig-ähnliche Domäne als homophile Bindungsstelle identifiziert (Zhao et al., 1998). Zusätzlich zur homophilen Bindung kann bei Vertretern der L1-Familie die Bindung mit anderen Molekülen, die sogenannte heterophile Bindung beobachtet werden. Heterophile Bindungspartner sind entweder lösliche oder unlösliche Komponenten der extrazellulären Matrix wie Laminin, Neurocan oder Phosphacan oder sie stammen aus Gruppen der Zelladhäsionsmoleküle, z.B. der IgCAMs oder Integrine (Kadmon et al., 1990a; Hortsch, 2000). Gleich den homophilen Bindungen können heterophile Bindungen auch in *cis* oder *trans* stattfinden.

1.3 DAS ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL L1

Das Zelladhäsionsmolekül L1 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches zu Beginn der 80er Jahre im Nervensystem entdeckt wurde (Lindner et al., 1983; Salton et al., 1983; Grumet and Edelman, 1984; Rathjen and Schachner, 1984). Das Molekül L1 wurde im Zentralen Nervensystem auf einer Gruppe von sich entwickelnden Neuronen, aber auch auf Axonen zahlreicher Nervenzellen des adulten Nervensystems nachgewiesen. Im peripheren Nervensystem wird L1 darüber hinaus von Schwann'schen Zellen exprimiert (Seilheimer and Schachner, 1988; Martini et al., 1994).

L1 partizipiert in Zellmigration (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000; Mechttersheimer et al., 2001), Axonbündelung, axonaler Wegfindung (Kamiguchi and Lemmon, 1997; Brummendorf et al., 1998), Synaptogenese und synaptischer Plastizität (Brummendorf et al., 1998; Maness and Schachner, 2007). L1 ist ein wichtiger Mediator von Zellinteraktionen während neuronaler Entwicklung und Regeneration (Fields and Itoh, 1996; Martin and Kandel, 1996; Rutishauser and Landmesser, 1996; Schachner, 1997) und greift auf die biochemische und morphologische Differenzierung z.B. corticaler Neurone ein (Demyanenko

Kapitel 1 Einleitung

et al., 1999) und fördert unter anderem durch die heterophile Interaktion mit NgCAM Neuritenwachstum (Walsh and Doherty, 1997; Haspel et al., 2001).

Das Gen *L1 CAM* ist auf dem X-Chromosom in dem Locus Xq28 lokalisiert (Herman et al., 1991). Mutationen in dem für das Zelladhäsionsmolekül L1 kodierenden Gen führen zu einer X-chromosomal rezessiv vererbaren neurologischen Erkrankung, dem L1-Syndrom. Dieses wurde auch als CRASH Syndrom beschrieben, wobei CRASH als Akronym für *corpus callosum hypoplasia, mental retardation, adducted thumbs, spasticity paraplegia and hydrocephalus* die für diese Erbkrankheit charakteristischen Symptome zusammenfasst (Fransen et al., 1995). Da dieses Akronym nicht kausal fokussiert und als ausfallend aufgefasst werden kann (Schrander-Stumpel, 1998), wurde der Name L1-Syndrom bevorzugt.

Bis heute wurden über 100 verschiedene pathogene Mutationen im L1-Gen identifiziert. Eine kontinuierlich aktualisierte Website zeigt die wachsende Liste der bekannten L1-Mutationen (Van Camp et al., 1996). Die Schwere der Krankheit und dessen Verlauf variiert zwischen Patienten mit unterschiedlichen L1-Mutationen, aber auch zwischen Patienten mit der identischen Mutation (Weller and Gartner, 2001). Eine einfache Genotyp-Phänotyp-Korrelation scheint damit zu fehlen (Fryns et al., 1991).

Die Mutationen im humanen L1-Gen erlauben wertvolle Rückschlüsse auf die Funktionen der verschiedenen Domänen. Sind durch Mutationen Aminosäuren an Schlüsselstellen betroffen, resultiert dies oft in einem schweren Phänotyp. Solche Schlüsselstellen sind z.B. kritisch für die Struktur der Ig- oder Fn3-Domänen (Bateman et al., 1996). Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne von L1 können teilweise mit Peptiden in Verbindung gebracht werden, deren Funktion bereits geklärt ist, wie z.B. das Thyrosin an der Position 1229, welches in der Bindung von Ankyrin an L1 involviert ist (Garver et al., 1997; Tuvia et al., 1997). Am häufigsten treten *missense* Mutationen in den extrazellulären Domänen auf, welche einen negativen Einfluss auf die Integrität der Proteine sowie die Fähigkeit der Bindung von Liganden ausüben. Mutationen im L1-Gen, die eine Zelloberflächeneliminierung des Proteins zur Folge haben, bedingen in den meisten Fällen einen gravierenden Phänotyp. Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne führen tendenziell zur schwächsten Ausprägung des L1-Syndroms (Weller and Gartner, 2001).

Kapitel 1 Einleitung

Die Funktionen von L1 scheinen vor allem durch homophile und heterophile Interaktionen vermittelt zu werden. Zu den Bindungspartnern des L1-Moleküls zählen verschiedene Formen der Integrine (Ruppert et al., 1995; Ebeling et al., 1996), sowie Komponenten der EZM wie Laminin und zahlreiche Proteoglykane wie Neurocan und Phosphacan (Friedlander et al., 1994; Brummendorf and Rathjen, 1996; Kadmon and Altevogt, 1997; Kamiguchi and Lemmon, 1997). Weiterhin interagiert das L1-Molekül mit Liganden wie Contactin (F3/F11) (Brummendorf et al., 1993), DM1-GRASP (DeBernardo and Chang, 1996) und TAG-1 (Axonin-1) (Kuhn et al., 1991; Kunz et al., 1998). Interaktionen mit L1 konnten auch für die Moleküle NCAM (Kadmon et al., 1990a), CD9 (Schmidt et al., 1996) sowie für CD24 (Nectadrin) (Kadmon et al., 1995; Sammar et al., 1997) nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde bekannt, dass Ethanol an L1 bindet und L1-abhängige Adhäsion sowie Neuritenwachstum inhibiert (Tang et al., 2006; Arevalo et al., 2008; Hoffman et al., 2008). Diese Tatsache wird als eine Ursache des Fötalen Alkohol Syndroms (FAS) diskutiert (Bearer, 2001).

1.3.1 DIE INTRAZELLULÄRE DOMÄNE VON L1: BINDUNGSPARTNER UND SIGNALTRANSDUKTION

Verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden werden infolge der extrazellulären Interaktionen aktiviert und über intrazelluläre Bindungspartner weitergeleitet. Die intrazelluläre Domäne (ID) enthält vier bekannte, physiologisch relevante Phosphorylierungsstellen für Serin-Kinasen und zwei Tyrosinreste. Desweiteren sind Bindungsstellen für Aktin, Adapter Protein 2 (AP2), Proteine mit FERM (*4.1/ezrin/radixin/moesin*)-Domänen, Ran-bindendes Protein M (RanBPM) und eine Ankyrin-Bindungsstelle, deren Phosphorylierungszustand die Interaktion von L1 mit dem Aktinzytoskelett reguliert, bekannt.

Die intrazelluläre Domäne von L1 enthält ein Ankyrin-Bindemotiv, welches über die Phosphorylierung eines Tyrosins reguliert wird (Garver et al., 1997). Ankyrin bindet an eine 25-30 Aminosäuren lange Sequenz im cytoplasmatischen Terminus, welcher das Motiv

Kapitel 1 Einleitung

SFIGQY beinhaltet (Garver et al., 1997; Zhang et al., 1998). Dieses Motiv ist von Invertebraten zu Vertebraten hochkonserviert. Für die Ankyrin-Bindung sind zwei aromatische Phenylalanine und die negativ-geladene Aminosäure Glutaminsäure von größter Bedeutung. Desweiteren werden Serin und Tyrosin benötigt, die in dem SFIGQY-Motiv enthaltenen sind. Beide Aminosäuren wurden in Patienten mit L1 Syndrom punktmutiert identifiziert (Saugier-Veber et al., 1998). Die Phosphorylierung des Tyrosins im Motiv SFIGQY verhindert die Bindung von Ankyrin an L1 (Gil et al., 2003).

Es existieren zwei L1-Spleißvarianten, eine nicht-neuronale Form sowie eine neuronale Form mit dem zusätzlichen Mini-Exon 27, welches die vier Aminosäuren Arginin, Serin, Leucin und Glutamin (RSLE) in der zytoplasmatischen Domäne kodiert (Kamiguchi and Lemmon, 1998). Die Oberflächenexpression von L1 auf Neuronen ist während der Entwicklung im höchsten Maße reguliert. Diese wird zum einen durch die Clathrin-medierte Endozytose von L1 und Proteinrecycling erreicht. Das Adapter-Protein 2 (AP2) bewirkt die Internalisierung von L1 durch die Bindung an das neuronale RSLE-Motiv in Verbindung mit dem Protein AP50. Die Bindung von AP2 an L1 hängt von der Phosphorylierung des Tyrosins direkt oberhalb des RSLE-Motivs ab (Schaefer et al., 2002).

Die intrazelluläre Domäne von L1 wird an multiplen Stellen von unterschiedlichen Kinasen *in vivo* und *in vitro* phosphoryliert. Diese Aktivität ist wichtig für die L1-Funktionen wie Neuritenwachstum, intrazellulärer Transport sowie intrazelluläre Signalweiterleitung (Sadoul et al., 1989; Schaefer et al., 1999; Schmid et al., 2000; Needham et al., 2001).

Insbesondere der MAPK/ERK Signalweg (*mitogen-activated protein kinase/ extracellular-signal-regulated kinase*) ist eng mit der Funktion von L1 verbunden. Das Zusammenbringen von membranständigem L1 durch Antikörper-Kreuzvernetzung führt zu einer Aktivierung von ERK2, welches wiederum die L1-ID am Serin Ser¹²⁰⁴ (innerhalb der Ankyrin-Bindestelle) und Ser¹²⁴⁸ phosphoryliert und die Endozytose von L1 reguliert (Schaefer et al., 1999). Desweiteren führt eine L1-Kreuzvernetzung zu einer anhaltenden ERK2-Aktivierung, was zu einer vermehrten Motilität und Invasion von mit L1 stabil transfizierten 3T3 und K1735-C11-Zellen führt (Silletti et al., 2004). Die Kinasen CKII (Casein Kinase II) und das Mitglied der S6

Kapitel 1 Einleitung

Kinasen p90rsk (*p90 ribosomal S6 kinase*) sind an der Phosphorylierung der L1-ID beteiligt. CKII phosphoryliert L1 konstitutiv an Ser¹¹⁸¹ *in vivo* und *in vitro* abwärts vom neuronalen RSLE-Motiv und konnte mit L1 co-präzipitiert werden (Wong et al., 1996a). Die Kinase p90rsk wurde in Immunpräzipitaten der L1-ID identifiziert. Diese phosphoryliert L1 an Ser¹¹⁵², welches innerhalb der L1-Familie nicht konserviert ist. Die Inhibierung der Ser¹¹⁵² Phosphorylierung führt zu einem reduzierten Neuronenwachstum in kultivierten Neuronen (Wong et al., 1996b) und ist als L1-spezifischer regulatorischer Mechanismus für die L1-vermittelte neuronale Entwicklung im Gespräch.

Die Kinase FAK (*focal adhesion kinase*) ist mit L1 in Wachstumskegeln assoziiert, wenn L1 sich im Komplex mit Nrp1 (Neuropilin 1) befindet. Der L1-Nrp1 Komplex ist ein Rezeptor für Sema3a (Semaphorin 3A), welches bei Bindung zu einer ERK-Aktivierung und dem Kollaps des Wachstumskegels führt. Wird die L1-ID entfernt, kommt es zu keiner ERK-Aktivierung durch FAK, was die Wichtigkeit der FAK-Rekrutierung an die L1-ID unterstreicht (Bechara et al., 2008).

Auf der Suche nach Bindungspartnern der L1-ID konnten Dickson et al. (Dickson et al., 2002) die FERM-Domäne von Ezrin identifizieren. Diese bindet an die neuronale L1-Isoform im Bereich des RSLE-Motivs (Kamiguchi and Lemmon, 1998), welches für die Regulierung des Sortierens von L1 in axonalen Wachstumskegeln eine wichtige Rolle spielt. Das Einführen einer Punktmutation an der Stelle des Tyrosins oberhalb von RSLE reicht, um die Bindung von Ezrin an L1 zu unterbinden, was eine Regulierung der Interaktion durch den Phosphorylierungsstatus nahelegt. Eine zweite, membranproximale Region der L1-ID mediiert ebenfalls den Kontakt zu ERM-Proteinen (Hamada et al., 2003). Beide Regionen sind in die Regulation des Wachstums und die Verzweigung von Neuronen involviert (Dickson et al., 2002; Cheng et al., 2005a). Das Motiv KXXKYXV in L1 enthält Tyr¹¹⁵¹ welches durch die Kinase pp60^{c-src} phosphoryliert werden kann. Sind Tyr¹¹⁵¹ sowie Tyr¹¹⁶⁷ in der YRSLE-Region phosphoryliert, wird die Bindung zu Ezrin inhibiert und die Zugkraft für Axonwachstum nimmt ab (Sakurai et al., 2008). Die Interaktion zwischen L1 und Ezrin findet in der embryonalen Entwicklung statt und wird ab postnatalem Tag 1 durch Ankyrin ersetzt (Mintz et al., 2003).

Das Protein RanBPM ist ein putatives Gerüstprotein im Immun- und Nervensystem (Murrin and Talbot, 2007). Es wurde als Bindungspartner der L1-ID in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit einer humanen Gehirn-Bibliothek identifiziert. Die Bindung von RanBPM an L1 inhibiert die L1-abhängige ERK Phosphorylierung und führt als evtl. Konsequenz zu einem reduzierten L1-abhängigen Neuritenwachstum *in vitro* (Cheng et al., 2005b).

1.3.2 REGULIERTE PROZESSIERUNG VON L1 IM NERVENSYSTEM

Proteasen sind Mitspieler in zahlreichen physiologischen und pathologischen Vorgängen des Zentralen Nervensystems. Metalloproteasen, zu denen Vertreter der ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*)-Familie und die MMPs zählen, greifen in zahlreiche Prozesse des Zentralen Nervensystems wie der Migration von neuronalen Vorläuferzellen, dem Neuritenwachstum und der Kommunikation von Zellen untereinander ein (Black and White, 1998; Schlondorff and Blobel, 1999; Primakoff and Myles, 2000). Sie regulieren den Zelltod und das Zellüberleben, greifen in Prozesse wie die Angiogenese und die Zellproliferation ein und sind neben ihrer Beteiligung an Heilungsprozessen auch an der Myelinisierung von Axonen beteiligt (Werb and Yan, 1998; Oh et al., 1999).

Neben dem 220 kDa großen Volle-Länge-L1 konnten lösliche 180, 140, 80, 50 und 30 kDa-Fragmente (Lindner et al., 1983; Rathjen and Schachner, 1984; Kalus et al., 2003) sowie ein 80 und 32 kDa großes membranassoziertes Fragment (Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001; Maretzky et al., 2005) identifiziert werden. Diese Fragmente entstehen durch proteolytische Prozessierung von Volle-Länge-L1, einem Vorgang von regulatorischer Bedeutung für die funktionellen Eigenschaften von L1.

Es ist bekannt, dass L1 membran-proximal geschnitten wird, was zur Freisetzung der löslichen extrazellulären Domäne und zur Entstehung eines membrangebundenen Stumpfs führt (Beer et al., 1999; Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001; Gutwein et al., 2003; Kalus et al., 2003). Die lösliche extrazelluläre Domäne bleibt intakt und dient wahrscheinlich als

Kapitel 1 Einleitung

Substrat für die Integrin-vermittelte Zelladhäsion, von der eine stimulierende Wirkung auf Zellmotilität und Migration (Mechtersheimer et al., 2001) ausgeht.

Lösliches L1, welches von kultivierten Neuronen entlassen wird, fördert Neuritenwachstum und beeinflusst die neuronale Differenzierung im Nervensystem (Sugawa et al., 1997; Dihne et al., 2003; Kalus et al., 2003). ADAM10, ein Mitglied der „*a disintegrin and metalloprotease*“ Familie konnte mit der Freigabe von löslichem L1 in humanen Tumorzelllinien in Verbindung gebracht werden (Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001; Gutwein et al., 2003). ADAMs sind am konstitutiven und stimulierten *ectodomain shedding* verschiedener membranständiger Proteine beteiligt (Schlondorff and Blobel, 1999; Seals and Courtneidge, 2003; Blobel, 2005). ADAM10 spielt in der Entwicklung des Zentralen Nervensystems, durch die Einflussnahme auf die Aktivierung von Notch/Delta und den N-Cadherin abhängigen β -Catenin Signalweg, eine wichtige Rolle (Rooke et al., 1996; Pan and Rubin, 1997; Qi et al., 1999; Hartmann et al., 2002; Reiss et al., 2005). ADAM10 hat eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem *tumor necrose faktor alpha (TNF- α)-converting enzyme (TACE/ADAM17)*, welches im *ectodomain shedding* von etlichen Substraten wie NCAM, TNF- α , TNF- α Rezeptor I und II, *transforming growth factor- α* , Interleukin 6 Rezeptor und *fractalkine* verwickelt ist (Black, 2002; Hundhausen et al., 2003; Sahin et al., 2004; Kalus et al., 2006). Weiterhin wurde beschrieben, dass auf die proteolytische Freisetzung der extrazellulären Domäne von Transmembranproteinen die Spaltung durch die γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne zur Freisetzung der intrazellulären Domäne ins Zytosol kommen kann. Dieser Prozess wird RIP (*regulated intramembrane proteolysis*) genannt und als neue Art der Signaltransduktion diskutiert (Urban and Freeman, 2002), welche bereits für die Proteine Notch (Selkoe and Kopan, 2003), APP (*amyloid precursor protein*) (Gao and Pimplikar, 2001), N-Cadherin (Marambaud et al., 2003; Reiss et al., 2005) und L1 (Maretzky et al., 2005) gezeigt werden konnte.

Im Hippocampus wird L1 von der *proprotein convertase* PC5A (Kalus et al., 2003) und durch Plasmin (Nayeem et al., 1999; Silletti et al., 2000) in der dritten Fn-3 Domäne geschnitten, was zur Entstehung eines löslichen Fragments L1-140 führt. Es ist weitergehend bekannt, dass die Serin-Protease Neuropsin L1 spezifisch und NMDA-abhängig im Hippocampus von

Mäusen spaltet und zur Entstehung eines löslichen L1-Fragments mit dem Molekulargewicht von 180 kDa beiträgt (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Nakamura et al., 2006).

1.4 UBIQUITINYLIERUNG: PROTEINABBAU UND MEHR

Posttranslationale Modifikationen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von diversen zellulären Vorgängen. Die Ubiquitinylierung, d.h. Konjugation von Zielproteinen mit Poly-Ubiquitin-Ketten oder Mono-Ubiquitin, spielt u.a. bei der Regulation des Zellzyklus, Signaltransduktion, Endozytose, Transkription, DNS-Reparatur, Apoptose und Immunantwort eine Rolle (Hershko and Ciechanover, 1998; Hicke, 2001; Pickart, 2001; Glickman and Ciechanover, 2002). Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 8,5 kDa (Einspanier et al., 1987). Sein Aufbau veränderte sich im Laufe der Evolution wenig, es ist somit hoch konserviert. So unterscheiden sich das Protein beim Menschen und bei dem Einzeller Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in nur 3 der 76 Aminosäuren.

Eine Ubiquitinylierung verläuft katalysiert durch drei enzymatische Schritte E1, E2 und E3. Im ersten Schritt wird Ubiquitin durch eine Thioesterbindung zwischen einem Cystein des E1-Enzyms und der C-terminalen Carboxylgruppe des Ubiquitin gebunden und dadurch aktiviert. Diese Aktivierung ist energieabhängig. Die Energie wird durch die Spaltung von ATP zu AMP und Pyrophosphat bereitgestellt. Für jedes modifizierende Protein gibt es genau ein E1-Enzym, was spezifisch für dessen Aktivierung ist (Pickart and Eddins, 2004). Nachdem Ubiquitin an E1 gebunden wurde, wird das Ubiquitin an das Enzym E2 überführt. Im letzten Schritt wird das Ubiquitin durch die E3-Ligase auf das Zielprotein übertragen. Hierbei wird eine Isopeptid-Bindung zwischen einem Lysin des Zielproteins und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins gebildet. Sie unterscheidet sich von einer klassischen Peptidbindung dadurch, dass nicht der α -Aminorest sondern der ϵ -Aminorest des Lysins als Bindungspartner dient. Davon abweichend wurde auch auf andere Verknüpfungsarten geschlossen, da auch lysin-freie Proteine ubiquitiniert vorgefunden wurden (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004; Cadwell and Coscoy, 2005). Die Vielfalt der von Ubiquitin modifizierten Zielproteine spiegelt sich in der Anzahl verschiedener E3-Enzyme wider. Berücksichtigt man alle Enzyme, die strukturell zu den drei Unterfamilien der E3-Enzyme (HECT, RING und U-Box) gehören, ist bei

höheren Organismen von einer Zahl zwischen mehreren hundert und eintausend auszugehen (Pickart and Eddins, 2004).

Da Ubiquitin insgesamt sieben Lysine enthält, sind mindestens sieben verschiedene Verbindungsarten eines Ubiquitins möglich. Je nach Anzahl der verbundenen Ubiquitin-Moleküle unterscheidet man zwischen einer Mono-, Oligo-, Multi- und Poly-Ubiquitinierung (Mukhopadhyay and Riezman, 2007). Wenn mindestens fünf Ubiquitinmoleküle als Kette mit einem Zielprotein verbunden sind, spricht man von einer Poly-Ubiquitinierung. Sind bei dieser die Moleküle durch das Lysin 48 miteinander verknüpft, wird das Zielprotein hauptsächlich dem Abbau durch das 26S Proteasom zugeführt (Hershko and Ciechanover, 1992). Verbindung durch Lysin 63 kann zum lysosomalen Abbau des Proteins führen (Barriere et al., 2007). Des Weiteren wurde beobachtet, dass diese Modifikation Einfluss auf die zelluläre Toleranz von DNA-Schäden, entzündliche Immunantworten, endozytotische Prozesse und die ribosomale Protein-Synthese hat (Pickart and Fushman, 2004). Mono- und Multi-Ubiquitinierungen hingegen beeinflussen weniger die Stabilität einzelner Proteine als deren intrazelluläre Verteilung und können die Interaktion mit anderen Proteinen ermöglichen (Polo et al., 2002). Oligo-Ubiquitinierung hat beispielsweise Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors Met4, ohne dessen Abbau zu initiieren (Flick et al., 2004).

1.5 DIE POST-TRANSLATIONALE MODIFIKATION DER SUMOYLIERUNG

Sumoylierung ist eine post-translationale Modifikation, welche in den letzten Jahren großes Interesse erlangte (Poukka et al., 1999; Kotaja et al., 2002; Chauchereau et al., 2003; Seeler and Dejean, 2003; Johnson, 2004; Muller et al., 2004). Analog zu Ubiquitin, kann SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) reversibel kovalent an Lysinreste von Zielproteinen konjugiert werden, um deren Funktionen zu erweitern. Sumo vermittelt eine Vielzahl von biologischen Prozessen, wie z.B. Proteinlokalisierung (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1998; Goodson et al., 2001; Zhang et al., 2002), transkriptionelle Aktivität (Verger et al., 2003; Muller et al., 2004), nukleo-zytoplasmatische Signaltransduktion und Transport (Matunis et al., 1998; Zhang et al., 2002), Genomreplikation (Tanaka et al., 1999; Yamamoto et al., 2003) und die Regulation von Genexpression (Goodson et al., 2001; Verger et al., 2003).

Kapitel 1 Einleitung

In Vertebraten wurden vier SUMO Isoformen, SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 und SUMO-4, mit distinkten Funktionen identifiziert (Saitoh and Hinchev, 2000; Hay, 2001; Tatham et al., 2003).

Die Proteine SUMO-2 und SUMO-3 haben zu 95% die gleiche Aminosäuresequenz, sind aber mit SUMO-1 nur zu 47% identisch. Das gewebespezifische SUMO-4 wurde in der Niere identifiziert und ist homolog zu SUMO-2/3. Sumo-Proteine können somit gewebespezifische Funktionen haben (Bohren et al., 2004).

SUMO-1 wird als Monomer mit Zielproteinen verknüpft, während SUMO-2 und SUMO-3 als hochmolekulare Polymere mit SUMO-1 an den Enden konjugiert werden, um eine weitere Addition zu terminieren. Alle SUMO Isoformen werden durch die gleiche Maschinerie wie Ubiquitin an ihre Substrate gekoppelt (Hay, 2001).

Es wird angenommen, dass die Modifikation eines Proteins mit SUMO zu einer neuen Bindestelle für neue Proteininteraktionen führt, und somit als Rekrutierungsfaktor für Multiprotein-Komplexe fungiert. Die Sumoylierung von RanGAP1 vermittelt die Interaktion mit dem Kernporenprotein RanBP2/Nup358 (Mahajan et al., 1997; Matunis et al., 1998). Die Sumoylierung der Transkriptionsfaktoren P300 und Elk-1 ermöglicht deren Rekrutierung der Histon-Deacetylase 6 (HDAC6) (Girdwood et al., 2003) und HDAC2 (Yang and Sharrocks, 2004). Die Sumoylierungsstellen sind oft in variablen Loop-Strukturen oder an flexiblen Termini (Rodriguez et al., 1999; Bernier-Villamor et al., 2002) lokalisiert, was keinen Einfluss von SUMO auf die Proteinkonformation nahelegt.

Für Sumoylierungen in vivo und in vitro wurde die Konsensussequenz ψ -K-x-D/E (Lysin ist die modifizierte Aminosäure, ψ ist eine hydrophobe Gruppe und x kann jede Aminosäure sein) identifiziert (Melchior, 2000; Johnson, 2004). Umgekehrt zur Ubiquitylierung, wird für diese ausschließlich das Lysin benötigt, jedoch scheinen keine weiteren Faktoren zu existieren. Der Mechanismus, welcher der Reifung und dem Transfer von SUMO zugrunde liegt, geht mit der Ubiquitynylierung einher (Schwartz and Hochstrasser, 2003; Johnson, 2004) und umfasst vier Schritte: Reifung, Aktivierung, Konjugation und Ligation. Im ersten Schritt wird SUMO durch die SUMO-spezifische carboxyterminale Hydrolase geschnitten und ein c-terminales Diglycin generiert. Die Sumoylierung geht anschließend über drei enzymatische Reaktionen weiter (Zhang et al., 2002). Diese setzt sich aus den Enzymen E1-E2-E3 zusammen, welche

die Aktivierung (E1), Konjugation mit E2 (UBC9) und schließlich die Ligase-Reaktion (E3) an ein Lysin des Zielproteins katalysieren. Während die Enzyme E1 und E2 für alle SUMO Isoformen konserviert sind, wurden eine Vielzahl von SUMO-Ligasen in höheren Eukaryoten identifiziert (Melchior, 2000).

1.6 KERNIMPORT VON PROTEINEN

In eukaryotischen Zellen gibt es einen Austausch zwischen dem Zytosol und dem Zellkern durch Kernporen in der Kernmembran. Diese Kernporen-Komplexe (NPC) setzen sich aus etwa 30 unterschiedlichen Proteinen (Nucleoporine) (Rout and Aitchison, 2000) zusammen, die einen Kanal bilden und den nucleo-zytoplasmatischen Transport von unterschiedlichen RNS (Franke and Scheer, 1974), Membranproteinen (Rezeptoren) (King et al., 2006) und löslichen Proteinen (Suntharalingam and Wentz, 2003) regulieren.

Der NPC ist ein großer Transporter, der durch die Kernmembran verläuft. Ionen wie auch kleine ungeladene Proteine binden nicht an Nucleoporine und können die Kernporen durch Diffusion passieren (Gorlich and Kutay, 1999). Sie passieren einen Tunnel mit einem Durchmesser von 8 bis 10 nm und annähernd 45 nm Länge (Paine et al., 1975; Keminer and Peters, 1999). Kommt es zu einer Bindung von Molekülen an Nucleoporine, vergrößert sich der Durchmesser der Kernpore auf bis zu 40 nm (Kiseleva et al., 1998; Pante and Kann, 2002) und der Transport wird beschleunigt (Ribbeck and Gorlich, 2001; Siebrasse and Peters, 2002). Der Filter für kleine Proteine wird in der Kernpore von ungefalteten, hydrophoben Polypeptid-Nucleoporinen, welche den zentralen Kanal der Kernpore auskleiden, gebildet. Trotz des relativ großen Durchmessers der Kernporen können selbst kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von weniger als 20-30 kDa die Kernporen nicht ohne Mediatoren passieren (Breeuwer and Goldfarb, 1990). Der Transport von Proteinen in den Zellkern wird durch einen Ran-Mediator im Zusammenspiel mit den Transportfaktoren Importin α/β (Karyopherine) ermöglicht, welche an *nuclear localisation signals* (NLS) binden und den Transport in den Zellkern medieren. Karyopherine sind eine Proteinfamilie mit mindestens 20 Mitgliedern in Menschen und 14 in Hefe (Mosammaparast and Pemberton, 2004; Pemberton and Paschal, 2005).

Proteintransport in den Zellkern wurde das erste Mal für Nucleoplasmin und das Virus SV40 *large T antigen* beschrieben. Die NLS-Sequenzen in beiden Proteinen setzen sich aus zwei Gruppen positiv geladener Aminosäuren zusammen (KR-10aa-KKKL₁₇₁ und PKKKRKV₁₃₂). Signale dieser Art kommen häufig vor und werden auch als klassische NLS (cNLS) bezeichnet (Jans et al., 2000). Sie werden von Importin α gebunden und zusammen mit Importin β transportiert (Hall et al., 1990; Makkerh et al., 1996; Goldfarb et al., 2004). Die meisten Karyopherine binden allerdings direkt an NLS-Sequenzen ohne auf Importin α angewiesen zu sein (Fried and Kutay, 2003; Weis, 2003).

1.7 ZIELSETZUNG

In vorangegangenen Experimenten (Kalus, 2005) konnte eine Lokalisation der intrazellulären Domäne von L1 (L1-ID) im Zellkern einer neuronalen Zelllinie gezeigt werden. Es ist grundsätzliches Ziel dieser Arbeit zu bestätigen, dass das Zelladhäsionsmolekül L1 in den Zellkern neuronaler Zellen transloziert und die Funktion von L1 im Zellkern aufzuklären. Da L1 im Nervensystem Substrat verschiedener Proteasen ist, stellen sich weiterhin die Fragen, ob proteolytische Prozesse bei der L1-Kernlokalisierung eine Rolle spielen und welche Proteasen involviert sind. Hierbei kann auf die bereits aufgeklärten Mechanismen der stufenweisen Prozessierung von L1 durch ADAM10 und die γ -Sekretase zurückgegriffen werden (Maretzky et al., 2005; Kalus et al., 2006). Es ist ferner Ziel herauszufinden, wo die proteolytischen Spaltungen stattfinden und ob L1 in löslicher Form, oder membrangebunden über Vesikel in den Zellkern gelangt.

Da Proteine nicht unkontrolliert in den Zellkern gelangen, ist von großem Interesse wie der Transport bewerkstelligt und reguliert wird. In diesem Zusammenhang sollen die posttranslationalen Modifikationen der Monoubiquitinylierung sowie der Sumoylierung, als potentielle, kovalent an L1 gebundene Signal-Proteine untersucht werden.

Die Suche nach Bindungspartnern der L1-ID im Nukleus soll Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von L1 im Zellkern erlauben. Hierbei ist der mögliche Einfluss von L1 auf die Regulation der Transkription von neuronalen Zielgenen oder den epigenetischen Zustand von Neuronen oder anderen Zelltypen zu erwähnen.

Kapitel 2 MATERIAL

2.1 ALLGEMEINE CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Allgemeine Chemikalien sowie deren Hersteller sind im Folgenden aufgelistet und wurden mindestens mit analysenreiner (pro analysis, p.a.) Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien, Verbrauchsmittel und verwendete Lösungen werden am Anfang jeder Methoden-Beschreibung aufgeführt. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Abcam (Cambridge, UK); Abgent Inc. (San Diego, CA, USA); Ambion (Austin, TX, USA); Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg); Applied Biosystems (Darmstadt); BD Becton Dickinson GmbH (Heidelberg); BD Biosciences Clontech (Heidelberg); Beckman Coulter GmbH (Krefeld) inklusive Beckman Instruments, Inc.; BIOCAT GmbH (Heidelberg); Biochrom AG (Berlin); BIOMOL Feinchemikalien GmbH (Hamburg); Bio-Rad Laboratories GmbH (München); BioVision, Inc. (Mountain View, CA, USA) via BIOCAT GmbH; Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf); Calbiochem-Novabiochem GmbH (Bad Soden) via Merck Biosciences GmbH; Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe); CHEMICON via Millipore GmbH; Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) via New England Biolabs GmbH; Dianova GmbH (Hamburg); Eppendorf AG (Hamburg); Frema Reform (Lüneburg); GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG (Braunschweig); Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe); Greiner Bio-One GmbH (Solingen); Herolab GmbH Laborgeräte (Wiesloh); Invitrogen GmbH (Karlsruhe); InVivo Biotech Services GmbH (Berlin); Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (Suolk, UK) via Dianova GmbH; KMF Laborchemie Handels-GmbH via VWR International GmbH; LC Laboratories (Woburn, MA, USA); MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren); Mallinckrodt Baker (Griesheim); Merck Biosciences GmbH (Schwalbach am Taunus); Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.); New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main); Nunc GmbH & Co. KG (Thermo Fischer Scientific, Wiesbaden); PAA Laboratories GmbH (Cölbe); Pierce/Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn); Pineda Antikörper-Service (Berlin); Polysciences Europe GmbH (Eppelheim); QIAGEN GmbH (Hilden); Raytest Isotopenmessgeräte GmbH (Berlin); R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt); Roche Diagnostics GmbH (Mannheim); Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg); Schleicher &

Schuell (Daßel); SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg); Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen); SLM Aminco (NY, USA); Tebu-bio (Offenbach); Th. Geyer Hamburg GmbH & Co. KG (Hamburg); Thermo Fischer Scientific (Bremen); Thermo Scientific (Bonn); Upstate via Millipore GmbH; VWR International GmbH (Darmstadt); Zymo Research (Freiburg).

Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen. Peptide wurden über die Firma Schafer-N (Kopenhagen, Dänemark) bezogen. SDS-Fertiggele ClearPAGE™ wurden von der Firma C.B.S. Scientific bezogen (Del Mar, CA, USA), vertrieben von VWR International GmbH (Darmstadt).

2.2 ZELLINIEN

2.2.1 BASISZELLINIEN

Die verwendeten Basiszelllinien und deren Eigenschaften sind in der Tabelle 2.1 aufgeführt.

| Zelllinie | Eigenschaften | ATCC Nummer | Referenz |
|---|---|-------------|------------------------|
| <i>chinese hamster ovary</i> (CHO/dhFr) | Dehydrofolatreduktase – defiziente Hamster-Zelllinie | CRL-9096 | (Shulman et al., 1997) |
| Neuro 2a | Maus Neuroblastoma-Zelllinie, etabliert von einem spontanen Tumor eines Albino A Mäusestammes | CCL-131 | (Olmsted et al., 1970) |
| <i>human embryonic kidney</i> (HEK 293) | Humane Nierenzellen transformiert mit Adenovirus 5 DNS | CRL-1573 | (Graham et al., 1977) |
| SH-SY5Y | Humane Neuroblastom-Zelllinie | CRL-2266 | (Biedler et al., 1978) |

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften

2.2.2 STABIL TRANSFIZIERTE ZELLINIEN

Die folgende Tabelle 2.2 liefert einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten stabil transfizierten Zelllinien, ihre Beschaffenheit und Herkunft.

| Zelllinie | Vektor | Referenz |
|---------------------|---|---|
| HEK/PS1/SW-D385N-10 | pcDNA-APP695 swedish FAD double mutation (AS 595/596) pcDNA3.1/Zeo-E9-D385A-PS1 | (Citron et al., 1992), (Wolfe et al., 1999) |
| HEK/PS1/SW-WT23 | pcDNA-APP695 swedish FAD double mutation (AS 595/596) pcDNA3.1/Zeo-PS1 | (Citron et al., 1992), (Wolfe et al., 1999) |
| CHO/L1 | pcDNA3-L1 | - |

Tabelle 2.2: Verwendete stabil transfizierte Zelllinien

2.2.3 ZELLKULTURMEDIEN

Für die Kultivierung der *chinese hamster ovary* (CHO)-Zelllinie wurde *Glasgow Minimum Essential Medium* (GMEM) verwendet. Diesem Basalmedium wurden die der Tabelle 2.3 zu entnehmenden Zusätze zugegeben.

| Zusatz | Konzentration | Herkunft |
|--|---------------|---------------|
| <i>Glasgow Minimum Essential Medium</i> (GMEM) | 1 x | PAA |
| Fötale Kälberserum (hitzeinaktiviert) | 10 % (v/v) | PAA |
| Natriumpyruvat (100 mM) | 1 mM | PAA |
| L-Glutamin (200 mM) | 2 mM | Invitrogen |
| Penicillin (10000 Units/ml) (100 x) | 1 x | Invitrogen |
| Streptomycin (10 mg/ml) (100 x) | 1 x | Invitrogen |
| <i>Non essential aminoacids</i> (100 x) | 1 x | Invitrogen |
| Glutamat / Aspartat (100 x) | 1 x | Sigma-Aldrich |
| Nukleoside (50 x) | 1 x | Invitrogen |

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Zellkulturmediums für CHO-Zellen

Für die Kultivierung der Zelllinien HEK 293, N2a und SH-SY5Y wurde *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) verwendet. Diesem Basalmedium wurden die der Tabelle 2.4 zu entnehmenden Zusätze zugegeben.

| Zusatz | Konzentration | Herkunft |
|---|---------------|------------|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) hoher Glukosegehalt (4,5 g/l) | 1 x | PAA |
| Fötale Kälberserum (hitzeinaktiviert) | 10 % (v/v) | PAA |
| Natriumpyruvat (100 mM) | 1 mM | PAA |
| L-Glutamin (200 mM) | 2 mM | Invitrogen |
| Penicillin (10000 Units/ml) (100 x) | 1 x | Invitrogen |
| Streptomycin (10 mg/ml) (100 x) | 1 x | Invitrogen |

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Zellkulturmediums für HEK-, N2a- sowie SH-SY5Y-Zellen

2.2.4 KULTIVIERUNG

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. Die für die Kultivierung der Zelllinien verwendeten Kulturflaschen mit einer Größe von 75 cm² wurden von der Firma Nunc bezogen. Die Passage der Zellen erfolgte bei 80 – 90 % Konfluenz derselben. Dafür wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (PAA Laboratories) gewaschen. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C durch eine 2 - 5-minütige Inkubation derselben mit Trypsin-EDTA (1x, PAA Laboratories). Den abgelösten Zellen wurde Kulturmedium (s. 2.2.3) hinzugefügt und diese durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die in der Zellsuspension enthaltenen Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 g und Raumtemperatur sedimentiert, wieder in Kulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:3 ausgesät.

2.2.5 LANGZEITLAGERUNG VON ZELLEN

Für die Konservierung von Zellen über einen längeren Zeitraum wurde eine konfluente Kulturflasche (s. 2.2.4) mit HBSS gewaschen, durch Inkubation mit Trypsin-EDTA (PAA Laboratories) vom Boden der Kulturflasche abgelöst und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1000 g sedimentiert. Im Anschluss an den Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen, die Zellen in 10 % DMSO-haltigem Kulturmedium (s. 2.3) mit zusätzlich 20 % fötalem Kälberserum und ohne Antibiotika resuspendiert und Proben von 1 ml Volumen abgefüllt. Die Aliquots der einzufrierenden Zellen wurden in speziellen Einfrierbehältern in

Isopropanol langsam auf eine Temperatur von -80 °C herunter gekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad.

2.3 E. COLI-STÄMME

Die folgende Tabelle (Tab. 2.5) liefert einen Überblick über die verwendeten *E. coli*-Stämme und deren Eigenschaften.

| Stamm | Genotyp | Herkunft / Referenz |
|---------------------------|---|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5α® | F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻ | Clontech |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1</i> sam7 nin5]) | Novagene, VWR International GmbH |
| <i>E. coli</i> M15[pREP4] | NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ . | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> DH10B | F' <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74 recA1 endA1</i> <i>araD139 (ara,leu)7697 galU galK</i> <i>rpsL nupG</i> | Invitrogen |
| <i>E. coli</i> JM105 | endA1 glnV44 sbcB15 rpsL thi-1 Δ(<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI^q lacZ</i> ΔM15] hsdR4(r _K ⁻ m _K ⁺) | Promega |

Tabelle 2.5: Verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften

2.3.1 KULTIVIERUNG

Zum Animpfen von Flüssigkulturen wurden unter anderem auch Stammkulturen auf LB-Agar (s. 2.14), der im Fall rekombinanter Stämme mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, angelegt. Die beimpften Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C bis zu 8 Wochen gelagert. Für die Anzucht von 2 – 5 ml Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten in Flüssigkulturen überimpft, die im Fall von rekombinanten *E. coli*-Stämmen ebenfalls mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurden. Die Inkubation der angeimpften Flüssigkulturen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C und 200 rpm ü. N. in einem Schüttelinkubator.

2.3.2 STAMMHALTUNG

Für die Stammhaltung von *E. coli* über einen längeren Zeitraum wurden Glycerin-Stocks angelegt. Zur Herstellung von Glycerin-Stocks wurde eine in der stationären Phase befindliche Übernachtskultur im Verhältnis 1:1 mit Glycerin (80 % (v/v) gemischt und dadurch beim Einfrieren langsam herunter gekühlt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.4 HEFESTÄMME

Dieses Kapitel gibt einen Überblick über die beim Hefe-Zwei-Hybrid-System (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Invitrogen) verwandten Hefestämme.

2.4.1 BASIS HEFESTAMM

Der im ProQuest™ Hefe Zwei-Hybrid-System mitgelieferte *S. cerevisiae* Stamm ist MaV203 (MAT α). Der Genotyp von MaV203 ist wie folgt: MaV203 (MAT α , leu2-3,112, trp1-901, his3 Δ 200, ade2-101, gal4 Δ , gal80 Δ , SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2, can1R, cyh2R).

2.4.2 STABIL TRANSFORMIERTE HEFESTÄMME

Die im ProQuest™ Hefe-Zwei-Hybrid-System mitgelieferten *S. cerevisiae* Kontroll-Stämme stammen von MaV103 ab. Sie haben den gleichen Genotyp wie MaV203 mit der Ausnahme, dass sie MAT α sind.

| Hefestamm | Plasmide | cDNS insert | Interaktionsstärke | Referenz |
|-----------|-----------------|---|--------------------|-----------------------------|
| Control A | pPC97 | Kein insert | keine | (Chevray and Nathans, 1992) |
| | pPC86 | Kein insert | | |
| Control B | pPC97-RB | RB (human) Acc# M28419 AS 302-928 | schwach | (Vidal et al., 1996) |
| | pPC86-E2F1 | E2F1 (human) Acc# M96577 AS 342-437 | | |
| Control C | pPC97-CYH2 -dDP | DP (<i>Drosophila</i>) | moderat | (Du et al., 1996) |

Kapitel 2 Material

| Hefestamm | Plasmide | cDNS <i>insert</i> | Interaktionsstärke | Referenz |
|-----------|------------|---|--------------------|-----------------------------|
| | | Acc# X79708 AS 1-377 E2F (<i>Drosophila</i>) Acc# U10184 AS 225-433 | | |
| Control D | pPC86-dE2F | | | |
| | pPC97-Fos | cFos (Ratte) Acc# X06769 AS 132-211 | stark | (Chevray and Nathans, 1992) |
| | pPC86-Jun | cJun (Maus) Acc# X12761 AS 250-325 | | |
| Control E | pCL1 GAL4 | GAL4 Acc# K10486 AS 1-881 | sehr stark | (Fields and Song, 1989) |
| | pPC86 | Kein Insert | | |

Tabelle 2.6: Verwendete stabil transformierte Hefestämme und deren Eigenschaften

2.4.3 KULTIVIERUNG UND MEDIEN

Der Basishefestamm MaV203 wurde in dem komplexen YPAD-Medium bei 30 °C kultiviert.

| | |
|-------------|--|
| YPAD-Medium | Hefeextrakt 10 g |
| | Pepton 20 g |
| | Adeninsulfat 100 mg |
| | Dextrose 20 g |
| | auf 1 l autoklaviertes dH ₂ O |

Für Agarplatten wurde einem Liter nicht autoklaviertem YPAD-Medium 20 g Agar beigelegt, der pH-Wert auf 6 (HCL) eingestellt, bei 121 °C für 25 min autoklaviert und bei einer Temperatur von 55 °C Platten gegossen.

Synthetisches Vollmedium (*Synthetic Complete Medium*, SC Medium) enthält eine Stickstoff- und Kohlenstoffquelle, sowie eine mögliche „Mangellösung“ die essentielle Aminosäuren, Nukleinsäuren, Spurenelemente und Vitamine enthält. Für Selektionszwecke kann der „Mangellösung“ bestimmte Aminosäuren vorenthalten werden (z.B. Leucin, Tryptophan,

Histidin). Voll- und Mangelmedium wurden nach Angaben des Herstellers zubereitet (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Invitrogen).

2.4.4 STAMMHALTUNG

Hefestämme können über kurze Zeiträume (4 Wochen) auf YPAD oder SC-Platten gelagert werden oder über längere Zeiträume (6-12 Monate) auf verschlossenen Agarplatten bei 4 °C gelagert werden.

Hefestämme können in 15-50 % (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert werden. Dazu wurden Flüssigkulturen von den Hefestämmen in korrespondierenden Medien angelegt, welche nach Zentrifugation in 50 % Glycerin (v/v) aufgenommen wurde. Die bei -80 °C gelagerten Hefestämme können durch Entnahme und Überführung von gefrorenem Material auf eine Agarplatte mit anschließender Inkubation bei 30 °C für 48 h wieder in Kultur genommen werden.

2.5 ANTIBIOTIKA

Die Antibiotika wurden den Nährmedien vor Gebrauch aus steril filtrierten Stammlösungen zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten erfolgte die Zugabe der Antibiotika nach dem Autoklavieren der Medien bei einer Temperatur von 45 °C oder weniger. Die folgende Tabelle (Tab. 2.7) liefert eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika, ihre eingesetzte Konzentration und Herkunft.

| Antibiotikum | Endkonzentration | Herkunft |
|--------------|------------------|-------------------|
| Ampicillin | 100 µg/ml | Roche Diagnostics |
| Kanamycin | 25 µg/ml | Roche Diagnostics |
| Zeocin™ | 25 µg/ml | Invitrogen |
| Gentamicin | 10 µg/ml | PAA |
| Streptomycin | 100 µg/ml | PAA |
| Penicillin | 100 U/ml | PAA |

Tabelle 2.7: Verwendete Antibiotika

2.6 INHIBITOREN

Die in den Experimenten verwendeten Inhibitoren und ihre Eigenschaften sind der

Kapitel 2 Material

Tabelle 2.8 zu entnehmen.

| Name | Inhibition | Endkonzentration | Herkunft |
|----------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| 1,10-o-Phenanthrolin | Metalloproteasen | 200 µM | Sigma-Aldrich |
| Aprotinin | Serin Proteasen | 1 µM | Sigma-Aldrich |
| Complete - EDTA frei | Breitband | 1 Tablette / 50 ml | Roche Diagnostics |
| DAPT | γ-Sekretase | 10 µM | Calbiochem |
| GM 6001 | Metalloproteasen | 10 – 20 µM | Calbiochem |
| Leptomycin B | Kernexport | 10 µM | LC Laboratories |
| MG-132 | Proteasom | 10 µM | Calbiochem |

Tabelle 2.8: Verwendete Inhibitoren

2.6.1 STIMULANZIEN

| Stimulans | Endkonzentration | Hersteller |
|-------------------------------------|------------------|----------------|
| L1-557 | 50 µg/ml | InVivo Biotech |
| Ionomycin | 1 µM | Calbiochem |
| Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) | 50 ng/ml | Calbiochem |
| Glutamat | 10 µM | Sigma-Aldrich |
| hL1-Fc | 20 µg/ml | InVivo Biotech |

Tabelle 2.9: Verwendete Stimulanzen

2.7 PEPTIDE

Folgende L1-Peptide wurden für diese Studie synthetisiert und verwendet:

| Name | Aminosäuresequenz |
|-----------|-------------------------------------|
| L1-icd 1 | CFIKRSKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETGE |
| L1-icd 2 | CRPMKDETGEYRSLESDNEEKAFGSSQPSLNGDIK |
| L1-icd 3a | CDIKPLGSDDSLADYGGSV |
| L1-icd 3b | CSVDVQFNEEDGSFIGQYSGK |
| L1-icd 4 | CSGKKEKEAAGGNDSSGATSPINPAVALE |

Tabelle 2.10: Verwendete Peptide

2.8 OLIGONUKLEOTIDE

| Name | Sequenz | Anmerkungen |
|-------------|--|--|
| Primer P1 F | 5'-GAAGCTTTAGCCACCATGGCTATGGTCGTGATGCTGCGGTAC-3' | HindIII Kozak Start L1cam Signalpeptid |
| Primer P2 R | 5'-GAATTCGAGCAGGCAGGGGCTGCAGAG-3' | EcoRI L1cam Signal Peptide |
| Primer P3 F | 5'-GAATTCATATCCACAAAAGCCACATA-3' | EcoRI L1cam 80 kDa |
| Primer P4 F | 5'-GAATTC AAGGTCCTCCTGCACCATCTG-3' | EcoRI L1cam 36 kDa |
| Primer P5 F | 5'-GAATCTTTGCCTCCGAGGGGCTGGTTC-3' | EcoRI L1cam 30 kDa |

Kapitel 2 Material

| Name | Sequenz | Anmerkungen |
|------------------|---|--|
| Primer P7 F | 5'-GAAGCTTTAGCCACCATGGCTAAACGCAGCAAGGGTGGCAAA-3' | HindIII Kozak Start L1cam ICD löslich |
| Primer P9 R | 5'-CTCGAGTTCTAGGGCTACTGCAGGATT-3' | XhoI L1 ICD neu |
| AttB1 L1+TM F | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTCTTGCTCCTCAT CCTGCTCATCC-3' | L1 ICD mit halber Transmembrandomäne |
| AttB1 L1 TM F | 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAAACGCAGCAAG GGTGGCAAATAC-3' | L1 ICD |
| AttB2 L1 R | 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTCTAGGGCTACTG CAGGATTG-3' | L1 ICD |
| L1 CFI F | 5'-GGATCCTGCTTCATCAAACGCAGCAAG-3' | BamHI L1 CFI |
| L1 CFI R | 5'-AAGCTTTTCTAGGGCTACTGCAGGATTG-3' | HindIII L1 CFI |
| pDEST™32 F | 5'-AACCGAAGTGCGCCAAGTGCTG-3' | Sequenzierprimer F |
| pDEST™32 R | 5'-TCGGCTGTTACTAACCTCTG-3' | Sequenzierprimer R |
| M13 F | 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' | Sequenzierprimer F |
| M13 R | 5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3' | Sequenzierprimer R |
| T7 F | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' | Sequenzierprimer F |
| SP6 R | 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3' | Sequenzierprimer R |

Tabelle 2.11: Verwendete Oligonukleotide

2.9 PLASMIDE

Die Tabelle 2.11 zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide samt Charakteristika und Herkunft. Plasmidkarten der Hersteller sind im Anhang zu finden (s. Kapitel 9.1).

| Plasmide | Charakteristika | Expressionssystem | Herkunft / Referenz |
|----------------------------------|---|---|------------------------|
| pEGFP-N1 | CMV-Promotor; EGFP-Gen; Kanamycinresistenz; SV40 early Promotor; pUC ORI | eukaryotisch | Clontech (Heidelberg) |
| pcDNA3 (5446 bp) | CMV-Promotor; SP6- Promotor; BGH pA; SV40- Promotor, origin und polyA; Neomycin ORF; Ampicillin ORF; ColE1 origin | eukaryotisch | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pcDNA3.1/Flag-His A (5493 bp) | pcDNA3.1/myc-His [myc durch Flag ersetzt (ZMNH)]; CMV-Promotor; myc-Epitop; - origin; BGH reverse priming site und pA; Neomycinresistenz-Gen; Ampicillinresistenz-Gen; SV40-Promotor, origin und Polyadenylierungssignal, pUC origin | eukaryotisch, Expressionssystem mit C-terminalem Flag und His-TAGs | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pcDNA3.1/Hygro (+) (5597 bp) | CMV-Promotor; -origin; BGH reverse priming site und pA; Hygromycinresistenz-Gen; Ampicillinresistenz-Gen; SV40-Promotor, origin und Polyadenylierungssignal, pUC origin | eukaryotisch | Invitrogen (Karlsruhe) |

Kapitel 2 Material

| Plasmide | Charakteristika | Expressionssystem | Herkunft / Referenz |
|-------------------------------|---|---|---|
| pcDNA3.1/Zeo (+) (5015 bp) | CMV-Promotor; -origin; BGH reverse priming site und pA; Zeocinresistenz-Gen; Ampicillinresistenz-Gen; SV40-Promotor, origin und Polyadenylierungssignal, EM7-Promotor, pUC origin, <i>bla</i> Promotor | eukaryotisch | Invitrogen (Karlsruhe) (PvD Dr. Kins, ZMBH, Heidelberg) |
| pGEM-T Easy (3015 bp) | T7 RNA Polymerase transcription initiation site und Promotor; SP6 RNA Polymerase Promotor und Transcription initiation site; pUC/M13 Reverse und Forward Sequencing PBS; lacZ start codon; lac operator; beta-lactamase coding Region | prokaryotisch | Promega (Mannheim) |
| pGEX-4T3 (~4900 bp) | Glutathione S-transferase Gen; tac-Promoter; lac-operator; Ribosomenbindestelle für GST; Startcodon (ATG) für GST; Coding region für Faktor Xa Spaltung; Beta-lactamase-Gen; lacIq Gen | prokaryotisch, Expressionssystem mit C-terminalem GST | GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden) |
| pQE-30 (3400 bp) | T5 Promotor, RBSII, 6xHis-tag am 5' der MCS, Amp Resistenz, Cole1 ORI | prokaryotisch, Expressionssystem mit N-terminalem His-TAG | Qiagen (Hilden) |
| pPC86 (7093 bp) | ADH1 Promotor, SV40 NLS, GAL4 aktivierende Domäne, f1 origin, TRP Gen und Promotor, CEN6/ARSH4, <i>bla</i> Promotor, Amp Resistenz, pUC origin | eukaryotisch, Hefe Zwei-Hybrid-System | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pDBLeu (9903 db) | DNS-bindende Domäne (DB), stammt ab von pPC97, alle Charakteristika wie pDEST32, ohne <i>attr</i> , Kanamycinresistenz | eukaryotisch, Hefe Zwei-Hybrid-System | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pEXP-AD502 (7146 bp) | GAL4 aktivierende Domäne (AD), SV40 NLS, ARS4/CEN6, TRP1, Ampicillinresistenz, <i>attB1</i> und <i>attB2</i> | eukaryotisch, Hefe Zwei-Hybrid-System | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pDEST32 (12288 bp) | DNS-bindene Domäne (AD), LEU2 Gen, CYH2s Allel, ARS4/CEN6, Gentamicinresistenz, <i>attB1</i> und <i>attB2</i> | eukaryotisch, Hefe Zwei-Hybrid-System | Invitrogen (Karlsruhe) |
| pDONR221 | <i>attP1</i> , <i>ccdB</i> Gen, Chloramphenicol Resistenz, <i>attP2</i> , Kanamycin Resistenz, EM7 Promotor, Zeocinresistenz, pUC ORI | eukaryotisch, Hefe Zwei-Hybrid-System | Invitrogen (Karlsruhe) |

Tabelle 2.12: Verwendete Plasmide

2.9.1 EXPRESSIONSKONSTRUKTE

| Insert | Spezies | Plasmid | Restriktionsschnittstellen 5' und 3' | Referenz |
|--------------|---------|----------------|--------------------------------------|-------------------------|
| L1-ICD (CFI) | Maus | pQE-30 | BamHI / HindIII | - |
| NCAM140-ICD | Maus | pQE-30 | ApoI / BamHI | - |
| L1 | Maus | pcDNA3 | EcoRI / EcoRI | - |
| L1-ICD | Maus | pDEST32 | Gateway® | - |
| L1-ICD½TM | Maus | pDEST32 | Gateway® | - |
| L1-SP | Maus | pcDNA3Flag/His | HindIII / EcoRI | - |
| L1-ICD | Maus | pcDNA3Flag/His | HindIII / XhoI | - |
| L1-30 | Maus | pcDNA3Flag/His | HindIII / EcoRI / XhoI | - |
| L1-36 | Maus | pcDNA3Flag/His | HindIII / EcoRI / XhoI | - |
| L1-80 | Maus | pcDNA3Flag/His | HindIII / EcoRI / XhoI | - |
| L1 | Maus | pcDNA3Flag/His | HindIII / EcoRI / XhoI | - |
| SUMO1 | - | pEGFP | - | - |
| SUMO2 | - | pEGFP | - | - |
| SUMO3 | - | pEGFP | - | - |
| hUBC9 | Mensch | pcDNAHA | EcoRI / XhoI | (Gostissa et al., 1999) |

Tabelle 2.13: Verwendete Expressionskonstrukte

Die pEGFP-SUMO 1 – 3 Konstrukte stammen von Prof. Ronald Hay (University of St. Andrews, Schottland) und wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Hans Will (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

Das hUBC9-Konstrukt stammt von Prof. Gianni Del Sal (LNCIB, Triest, Italien) und wurde mit freundlicher Unterstützung von Prof. Hans Will (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.10 ANTIKÖRPER

2.10.1 PRIMÄRANTIKÖRPER

| Bezeichnung | Herkunft | Katalog # | Spezies | Epitop | IH | WB | Referenz |
|-------------------|-------------------|-----------|-----------|-------------|-----------|---------|----------------------------------|
| L1-PC | M. Schachner | | Kaninchen | EZD | | 1:4000 | (Rathjen and Schachner, 1984) |
| L1-555 | M. Schachner | | Ratte | Fn 3 | | 1:10000 | (Kadmon et al., 1990a) |
| L1-557 | InVivo Biotech | | Ratte | Fn 2/3 | | 1:3000 | (Appel et al., 1995) |
| L1-H200 | Santa Cruz | Sc-15326 | Kaninchen | AS 921-1120 | 1:50~500 | 1:1000 | (Fogel et al., 2003a) |
| L1-2C2 | M. Grumet | | Maus | IZD | | 1:1000 | (Buhusi et al., 2008) |
| L1-172R | HISS Diagnostics | MMS-172R | Maus | IZD | 1:500 | 1:2000 | (Kamiguchi et al., 1998) |
| L1-C20 | Santa Cruz | Sc-1508 | Ziege | IZD | 1:50~500 | 1:500 | (Ibrahim et al., 2003) |
| Importin α | Sigma | I1784 | Maus | | | 1:10000 | (Kohler et al., 1997) |
| Importin β | Abcam | Ab2811 | Maus | | 1:1000 | 1:5000 | (Gorlich and Mattaj, 1996) |
| P4D1 Ubiquitin | Santa Cruz | Sc-8017 | Maus | | 1:50~500 | 1:500 | (Ciechanover, 1994) |
| Pan SUMO | Abgent | AP1299a | Kaninchen | | 1:50~100 | 1:500 | (Yang and Sharrocks, 2004) |
| APP 6687 | C. Haass | | Kaninchen | AS 678-695 | | 1:1000 | (Steiner et al., 2000) |
| HP1 gamma | Cell Signaling | 2619 | Kaninchen | | 1:400 | 1:1000 | (Maison and Almouzni, 2004) |
| NonO | Aviva | ARP40716 | Kaninchen | | 1:400~800 | 1:8000 | (Yang et al., 1993) |
| MeCP2 | Abcam | Ab2828 | Kaninchen | | 1:500 | 1:2000 | (Griffiths and Whitehouse, 2007) |
| PSP1 | Dundee Cell Produ | AB1013 | Kaninchen | | 1:50~500 | 1:2000 | (Fox et al., 2002) |
| SFPQ | Abcam | Ab11825 | Maus | | 1:500 | 1:5000 | (Lee et al., 1996) |
| FLAG M2 | Sigma | F1804 | Maus | FLAG-Tag | 1:1000 | 1:1000 | (Brizzard et al., 1994) |
| c-MYC | Santa Cruz | Sc-40 | Maus | MYC-Tag | 1:50~500 | 1:1000 | (Cosma et al., 2003) |
| HIS-Tag | Cell Signaling | 2365 | Kaninchen | HIS-Tag | 1:100 | 1:1000 | (Kroll et al., 1993) |
| FK1 Ubiquitin | MBL | D071-3 | Maus | Poly-Ub | | 1:1000 | (Fujimuro et al., 1994) |

Tabelle 2.14: Verwendete Primärantikörper

Kapitel 2 Material

Der β APP-Antikörper 6687 wurde mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. C. Haass (Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt.

Der L1-Antikörper 2c2 wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. M. Grumet (Rutgers State University of New Jersey, Piscataway, USA) zur Verfügung gestellt.

Der Antikörper anti-NCAM 5B8 wurde von der *Developmental Studies Hybridoma Bank* (University of Iowa, Biological Sciences, Iowa City, USA) bezogen.

Der Polyubiquitin-Antikörper Fk1, wurde mit freundlichen Unterstützung von Prof. Thorsten Hoppe (Institute for Genetics, Köln) zur Verfügung gestellt.

2.10.2 SEKUNDÄRANTIKÖRPER

Die für die Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) verwendeten Sekundärantikörper wurden von Dianova bzw. Jackson Immuno Research und Perbio bezogen. Wie die Sekundärantikörper eingesetzt wurden ist Tabelle 2.14 zu entnehmen.

| Kopplung | Spezies | Spezifität | Verdünnung | Herkunft |
|----------|-------------|----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| HRP | Ziege, Esel | Maus, Ratte, Kaninchen, Ziege | 1:5000 ~ 10000 (WB) | Jackson Labs, Perbio |
| Cy2 | Ziege | Maus | 1:100 (IH) | Jackson Labs |
| Cy3 | Ziege | Maus | 1:100 (IH) | Jackson Labs |
| Cy5 | Ziege | Maus | 1:100 (IH) | Jackson Labs |

Tabelle 2.15: Verwendete Sekundärantikörper

2.11 MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS

Die in dieser Arbeit verwendeten Molekulargewichtsstandards wurden von Invitrogen und Bio-Rad bezogen. Von den DNS-Leitern (100 bp sowie 1 kb Plus) wurden pro Spur auf einem durchschnittlichen Agarosegel 15 µl aufgetragen. Von den Proteinleitern wurden pro Spur auf einem Mini-Gel (Bio-Rad) 8 µl eingesetzt.

100 bp DNA Ladder, Invitrogen



Abbildung 2.1: 100 bp DNA Ladder, Invitrogen

1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen



Abbildung 2.2: 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen

BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen

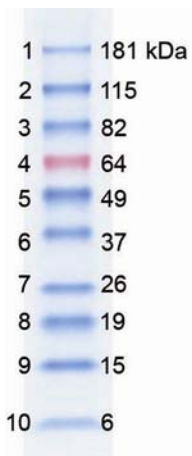


Abbildung 2.3: BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen

Precision Plus Dual Color, Bio-Rad

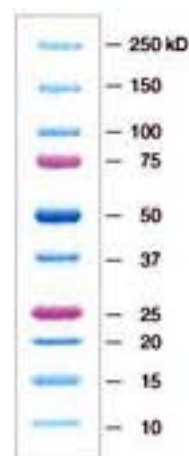


Abbildung 2.4: Precision Plus Dual Color, Bio-Rad

2.12 ONLINE DATENBANKEN UND WERKZEUGE

| Name | Aufgabe | Web-Adresse |
|---------------------|--|---|
| ExpASY | Proteomik-Server | http://www.expasy.ch/ |
| GeneCards | Humane Gen-Informationen | http://www.genecards.org/ |
| MiniMotif Miner 2.0 | Suche nach kurzen Sequenzmotiven | http://sms.engr.uconn.edu/servlet/SMSSearchServlet |
| PubMed | Publikations-Datenbank | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez |
| SignalP 3.0 | Signalpeptid-Vorhersage | http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ |
| SUMOPlot™ | Sumoylierungsvorhersage | http://www.abgent.com/tools/sumoplot |
| Open Wetware | <i>E. coli</i> Genotypen | http://openwetware.org/wiki/E._coli_genotypes |
| LGC Standards | ATCC-LGC Standards | http://www.lgcstandards-atcc.org/ |
| PROSITE | Proteindomänen, Familien und funktionelle Orte | http://www.expasy.ch/prosite/ |

Tabelle 2.16: Online-Datenbanken und -Werkzeuge

2.14 HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER

Alle Lösungen wurden mit sterilem deionisiertem Wasser (dH₂O) angesetzt.

| | |
|-------------------------------------|---|
| Homogenisierungspuffer | 50 mM Tris, pH 7,5 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 0,32 M Saccharose |
| LB-Medium (<i>lysogeny broth</i>) | 10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l dH ₂ O pH 7,5 |

LB-Agar Zusammensetzung s. LB-Medium, zusätzlich 1 % (w/v) Agar

Kapitel 2 Material

| | |
|--|---|
| PBS (<i>phosphate buffered saline</i>) | 8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l mit dH ₂ O pH 7,3 |
| RIPA-Puffer | 50 mM Tris, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % NP-40 |
| Probenpuffer für SDS-PAGE (5x Laemmli-Puffer) | 0.312M Tris/HCl pH 6.8 5 % (w/v) SDS 20 % Glycerol 0,000 5% (w/v) Bromphenolblau 4 % (w/v) DTT oder β-Mercaptoethanol |
| TBS (<i>tris buffered saline</i>) | 0,1 mM Tris/HCl 1,5 mM NaCl pH 7,5 |

Kapitel 3 METHODEN

3.1 BIOCHEMISCHE METHODEN

3.1.1 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (Cuatrecasas et al., 1968)

Lösungen:

| | |
|------------------------|---|
| Homogenisierungspuffer | s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer |
| Kopplungspuffer (CNBr) | 0,10 M NaHCO ₃ 0,50 M NaCl pH 8,3 |
| Blockierungspuffer | 0,20 M Glycin 0,50 M NaCl pH 8,0 |
| Puffer A | 0,10 M Natriumacetat 0,50 M NaCl pH 4,0 |
| Elutionspuffer | 0,10 M Glycin pH 3,0 |
| Säulen-Lagerungspuffer | 150 mM NaCl 8,0 mM Na ₂ HPO ₄ 1,70 mM NaH ₂ PO ₄ 0,10 % NaN ₃ pH 7,5 |

Durchführung: Die Affinitätschromatographie ist eine sehr spezifische Methode der Proteinaufreinigung, die auf den hochselektiven Wechselwirkungen zwischen Proteinen und ihren Liganden basiert. Diese Liganden sind bei der Affinitätschromatographie z.B.

monoklonale Antikörper oder Rezeptorproteine, die über einen *Linker* an die Matrix der Chromatographiesäule gebunden sind.

Vorbereitung der Chromatographie-Säule: Das verwendete Säulenmaterial (CNBr-activated Sepharose 4B, GE Healthcare, Freiburg) wurde dreimal je 15 min bei 4 °C mit 1 mM HCl gewaschen. Die zuvor in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Proteine wurden in je 20 ml Kupplungspuffer aufgenommen und bei 4 °C über Nacht mit der Sepharose inkubiert. Anschließend wurde die Matrix luftblasenfrei in eine Chromatographiesäule gegeben und mit Kupplungspuffer gewaschen (10 ml; 0,3 ml/min). Im nächsten Schritt müssen eventuell verbliebene aktivierte Gruppen der Matrix blockiert werden. Zu diesem Zweck wurde Blockierungspuffer über Nacht auf die Säule gegeben (0,3 ml/min). Anschließend wurde das Säulenmaterial dreimal abwechselnd mit Puffer A und Kupplungspuffer gewaschen. Falls die Säule nicht direkt im Anschluss verwendet wurde, wurde sie mit etwa 3,0 ml Säulen-Lagerungspuffer gespült und verschlossen. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Affinitätschromatographie: Die Säule wurde zunächst mit 10 ml Homogenisierungspuffer gewaschen (0,3 ml/min). Anschließend wurde eine 1:2 Verdünnung der Maushirnfraktionen auf die Säule aufgetragen (0,1 ml/min) und über Nacht zirkuliert. Im Anschluss wurde erneut mit Homogenisierungspuffer gewaschen (10 ml; 0,3 ml/min). Die Elution erfolgt durch Reduktion des pH-Wertes mit 0,1 M Glycin, pH 2,3, wobei die Eluate sofort mit 1 M Tris pH 8,0 neutralisiert wurden. Die Eluate wurden bei 4 °C in PBS umgepuffert und auf ein Volumen von 50 µl eingengt (Amicon Ultra 5000 MWCO, Millipore). Anschließend wurden

. PAGEREF _Toc232799969 \h

t und die enthaltenen Proteine mittels eines

10 – 20 %igem SDS-Gradientengels (C.B.S. Scientific / VWR) aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden mit kolloidalem Coomassie angefärbt, ausgeschnitten und mit Hilfe eines Electrospray-QTOF-Tandem-Massenspektrometers (QTOF II, Micromass; Analyse durch Dr. Friedrich Buck, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, UKE) analysiert.

3.1.2 EINDIMENSIONALE SDS-PAGE (POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE)

(Laemmli, 1970)

Lösungen:

| | |
|--------------------|--|
| APS 10 % (w/v) | APS in dH ₂ O |
| Sammelgelpuffer | 1 M Tris/HCl, pH 6,8 |
| Trenngelpuffer | 2 M Tris/HCl, pH 8,8 |
| SDS 20 % (w/v) | SDS in dH ₂ O |
| 1 x SDS-Laufpuffer | 3 g Tris/HCl 14,4 g Glycin 1 g SDS ad 1 l mit dH ₂ O |

Durchführung: Proteine wurden zur Analyse, nach ihrem Molekulargewicht, eindimensional in reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelen unter Verwendung von Mini-Protean III Elektrophoresekammern (BioRad) nach Angaben des Herstellers elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen wurden Gele von 1 mm Dicke mit einer Laufstrecke von 0,5 cm im Sammelgel und 5 cm im Trenngel verwendet.

Die Zusammensetzungen der Trenngele und des Sammelgels sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen. Es wurden, je nach zu analysierendem Protein, passende Gelsysteme gewählt, meistens 10 - 20 %ig. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und kurz zentrifugiert. Zum Größenvergleich wurde ein Proteinmarker (s. 2.11) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für das Sammelgel bei 80 V durchgeführt. Beim Übergang der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach elektrophoretischer Auftrennung können Proteine durch Silber- oder Coomassiefärbung (s. 3.1.2.1 und 3.1.2.2) in dem Gel angefärbt oder anhand der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) spezifisch über einen Antikörper nachgewiesen werden.

Kapitel 3 Methoden

| Komponenten | Sammelgel 5 % | Trenngel 10 % | Trenngel 12,5 % | Trenngel 15 % | Trenngel 20 % |
|-------------------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
| 30 % Polyacrylamid | 0,83 ml | 2,665 ml | 3,335 ml | 4 ml | 5,33 ml |
| 1 M Tris/HCl pH 6,8 | 0,625 ml | - | - | - | - |
| 1 M Tris/HCl pH 8,8 | - | 1,49 ml | 1,49 ml | 1,49 ml | 1,49 ml |
| 10 % SDS in dH ₂ O | 50 µl | 80 µl | 80 µl | 80 µl | 80 µl |
| dH ₂ O | 3,45 ml | 3,71 ml | 3,1 ml | 2,4 ml | 1,2 ml |
| TEMED | 5 µl | 4 µl | 4 µl | 4 µl | 4 µl |
| 10 % APS in dH ₂ O | 40 µl | 24 µl | 24 µl | 24 µl | 24 µl |
| Gesamtvolumen | 5 ml | 8 ml | 8 ml | 8 ml | 8 ml |

Tabelle 3.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngellösungen

3.1.2.1 SILBERFÄRBUNG (Heukeshoven and Dernick, 1988)

Lösungen:

| | |
|--------------------|--|
| Fixierungslösung | 300 ml Ethanol 100 ml Essigsäure ad 1 l dH ₂ O |
| Inkubationslösung | 75 ml Ethanol 17 g Natriumacetat 1,25 ml Glutaraldehyd (25 % w/v) 0,5 g Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O ad 250 ml dH ₂ O |
| Silberlösung | 0,5 g AgNO ₃ 50 µl Formaldehyd (37 % w/v) ad 250 ml dH ₂ O |
| Entwicklungslösung | 7,5 g Na ₂ CO ₃ 30 µl Formaldehyd (37 % w/v) ad 300 ml dH ₂ O, pH > 11,5 |
| Stopp-Lösung | 2,5 g Glycin ad 250 ml dH ₂ O |

Durchführung: Nach der Gelelektrophorese wurde das SDS-Polyacrylamidgel (s. 3.1.2) für mindestens 30 min bei RT in Fixierungslösung und daran anschließend 30 min bei RT oder

Kapitel 3 Methoden

ü. N. bei 4 °C in der Inkubationslösung inkubiert. Alle Inkubations- und Waschschriffe erfolgten unter leichtem Schütteln. Das Gel wurde dann dreimal für jeweils 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend für 20 min in der Silberlösung inkubiert. Nach einem kurzen Waschschriffe mit Wasser wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch Inkubation des Gels in der Entwicklungslösung angefärbt. Die Reaktion dauerte in der Regel 5 – 10 min, während dieser Zeit wurde die Entwicklungslösung ausgetauscht. Die Reaktion wurde nach Austausch der Entwicklungslösung durch die Stopp-Lösung beendet. Anschließend wurde das Gel noch mehrmals mit Wasser gewaschen.

Für eine langfristige Aufbewahrung der Gele wurden diese in einem Gelrockner (GelAir Dryer, BioRad) nach Angaben des Herstellers zwischen Cellophanfolien getrocknet.

3.1.2.2 COOMASSIE-FÄRBUNG

(kolloidale Färbung Roti©-Blue, Carl Roth)

Lösungen:

| | |
|-----------------------|--|
| Fixierungslösung | 79ml dH ₂ O 1ml o-Phosphorsäure 85% 20ml Methanol |
| Färbelösung | 60ml dH ₂ O 20ml dH ₂ O |
| Roti©-Blue 5x | 20 ml ad 100 ml dH ₂ O |
| Waschlösung | 25ml Methanol 75ml dH ₂ O |
| Stabilisierungslösung | 20 g Ammoniumsulfat ad 100ml dH ₂ O |
| Trocknerlösung | 10 ml Glyzerin 20 ml Ethanol 70 ml dH ₂ O |

Durchführung: Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel für mindestens 1 Stunde in der Roti©-Blue-Färbelösung inkubiert, anschließend in eine neue Färbeschale überführt und überschüssiges Kolloid durch Schütteln in der Waschlösung und mehrmaliges Wechseln dieser entfernt. Zur Aufbewahrung konnte das Gel in der Stabilisierungslösung einige Tage gelagert werden. Für eine langfristige Aufbewahrung der Gele wurden diese in einem Gelrockner (GelAir Dryer, BioRad) nach Angaben des Herstellers zwischen Cellophanfolien getrocknet.

Roti©-Blue ist eine kolloidale Coomassie Brilliant Blue G -250 Färbung für Proteine in Polyacrylamidgelen. Die Sensitivität von Roti©-Blue ist mit der von Silberfärbungen vergleichbar (< 30ng/Protein) und geeignet für die anschließende Analyse der angefärbten Proteinbanden mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) (Mortz et al., 1994; Jensen et al., 1997).

3.1.2.3 IMMUNBLOT-ANALYSE (WESTERN BLOT) (Towbin et al., 1979); (Burnette, 1981)

3.1.2.3.1 ELEKTROPHORETISCHER TRANSFER VON PROTEINEN AUF MEMBRANEN

Lösungen:

| | |
|--------------------|---|
| Blotpuffer | 3 g Tris/HCl 14,4 g Glycin ad 1 l mit dH ₂ O |
| TBST | s. 2.14 0,05 % TWEEN® 20 |
| Blockierungslösung | 4 % Magermilchpulver in TBST |

Durchführung: Bei der Immunblot-Analyse werden Proteine durch SDS-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt (s. 3.1.2) und anschließend aus dem SDS-Gel auf eine Membran (Nitrocellulose bzw. PVDF; 0,2 oder 0,45 nm Porengröße) transferiert.

Für den elektrophoretischen Transfer der Proteine von SDS-Gelen auf Nitrocellulose-Membranen (Protan® Nitrocellulosemembran, Schleicher & Schuell) wurden MINI TRANSBLOT-Apparaturen (BioRad) verwendet. Das Transfer-Sandwich, bestehend aus drei

3.1.2.3.3 ECL-DETEKTION

Die Nachweisreaktion erfolgte über die an den Zweitantikörper kovalent gebundene Meerrettichperoxidase, welche katalytisch ECL (*Enhanced chemiluminescence*) als Substrat unter Lichtemission umsetzt.

Durchführung: Nach Beendigung der Waschschritte wurde die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischte Chemilumineszenzlösung (Pierce® ECL Western Blotting Substrate bzw. SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific) auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die inkubierte Membran in einer Klarsichthülle in eine Filmkassette fixiert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm (Kodak® BioMax Light Film, Sigma-Aldrich) aufgelegt, exponiert und entwickelt.

3.1.2.3.4 ENTFERNEN GEBUNDENER ANTIKÖRPER VOM *WESTERN BLOT*

Lösungen:

| | |
|-------------------------|----------------------|
| <i>Stripping</i> Lösung | Eisessig |
| | 5 M NaCl |
| | ad dH ₂ O |

Durchführung: Die Nitrozellulosemembran wurde 30 min mit *Stripping* Lösung unter leichtem Schütteln für 20 min bei RT inkubiert und danach dreimal für je 5 min mit 100 mM Tris pH 8,0 neutralisiert. Nach kurzem Waschen mit TBST konnte die Membran wieder mit Blockierungslösung und Antikörperlösung inkubiert werden.

3.1.3 PROTEINFÄLLUNG

3.1.3.1 PROTEINFÄLLUNG NACH WESSEL (Wessel and Flugge, 1984)

Lösungen:

| | |
|-----------------------|---------|
| Probenpuffer für PAGE | s. 2.14 |
|-----------------------|---------|

Durchführung: Die zu fällende Proteinlösung wurde mit 4 Volumina Methanol und anschließend mit einem Volumen Chloroform gemischt. Nach der Zugabe von 3 Volumina

dH₂O wurde der Ansatz erneut gemischt und für 3 min bei 16000 g zentrifugiert. Der methanollösliche Überstand wurde abgenommen, und zu der das Protein enthaltenden Interphase und der chloroformlöslichen Phase wurden 3 Volumina Methanol hinzugefügt, der Ansatz wiederum gut gemischt und erneut bei 16000 g für 3 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Sediment getrocknet und anschließend in Probenpuffer für PAGE aufgenommen. Die Proben wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) untersucht.

3.1.3.2 ACETONFÄLLUNG

Lösungen:

Probenpuffer für PAGE s. 2.14

Durchführung: Zur Fällung von Proteinlösungen wurde die Probe mit 7 Volumina eiskaltem Aceton vermischt und min. 30 min bei -30 °C eingefroren. Die ausgefällten Proteine wurden für 30 min bei 6000 - 10000 g und 4 °C sedimentiert, der Überstand verworfen und das an der Luft getrocknete Sediment in Probenpuffer für PAGE aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3).

3.1.4 PROTEINBESTIMMUNG (BCA-TEST) (Smith et al., 1985)

Durchführung: Die Bestimmung der Konzentration von Proteingemischen wurde mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent Kits* (Pierce) in 96-well Mikrotiter-Platten (Nunc) durchgeführt. Zur Herstellung der BCA-Lösung wurden Reagenz A und B in dem Verhältnis 1:50 gemischt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 210 µl. 10 µl der zu analysierenden Probe wurden mit 200 µl BCA-Lösung versetzt, der Ansatz gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 562 nm (ELISA-Reader, Micronaut Skan, Roche Diagnostics). Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe bestehend aus 0 – 1000 µg/ml BSA (0, 50, 100, 200 - 1000 µg/ml) in oben beschriebener Weise angesetzt und mit den zu

analysierenden Proben inkubiert. Mit Hilfe der linearen Regression wurde anhand der gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt.

3.1.5 GEHIRNFRAKTIONIERUNG

Als Versuchstiere für die Gehirnfractionierung wurden adulte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J in einem Alter von drei bis vier Wochen verwendet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Tierstall bei Tag- / Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten die Standarddiät und Wasser ad libitum.

3.1.5.1 HERSTELLUNG EINES GEHIRNHOMOGENATES

Lösungen:

Homogenisierungspuffer s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Durchführung: Die Tötung junger Tiere (bis postnatalem Tag 14) erfolgte durch Dekapitation, adulte Tiere wurden mit CO₂ vergast. Die Schädeldecke wurde geöffnet und das Gehirn entnommen. Für die Herstellung eines Homogenates der Gehirnregionen des Kleinhirns bzw. des Hippocampus wurden die entsprechenden Gehirnregionen nach der Entnahme des Organs präpariert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das entnommene Gehirn wurde in 3 ml Homogenisierungspuffer, das Kleinhirn bzw. der Hippocampus wurden in 100 µl Homogenisierungspuffer überführt und in einem Glashomogenisator durch zwanzigmalsiges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Um Zellkerne und Zelltrümmer zu sedimentieren, wurde eine Zentrifugation des Homogenates für 15 min bei 1000 g und 4 °C angeschlossen.

Ein Gesamtgehirnhomogenat ist das Ausgangsmaterial für die Erstellung von einem 17000 g-Überstand und -Sediment und ferner zytosolischen Gehirnfractionen, Membranfractionen, Endosomalen Fractionen sowie Zellkernfractionen, welche über Ultrazentrifugation erhalten wurden (s. 3.1.5.2 ff.).

Eine Untersuchung der Proben erfolgte mit Hilfe der Immunblot-Analyse (s. 3.1.2.3).

3.1.5.1.1 PROTEASEANSATZ MIT GEHIRNHOMOGENAT

Eine definierte Menge Gehirnhomogenat (s. 3.1.5.1) wird bei 37 °C mit Proteaseinhibitoren (s. 2.6) versetzt und auf einem Rotator für eine Stunde inkubiert. Das Gehirnhomogenat kann nach der Inkubation mit Inhibitoren weiter fraktioniert werden (s. 3.1.5.2 ff).

3.1.5.2 HERSTELLUNG EINES 17000 G-ÜBERSTANDES UND -SEDIMENTES

Lösungen:

Homogenisierungspuffer s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Durchführung: Ein Gesamtgehirnhomogenat (s. 3.1.5.1) diene als Ausgangsmaterial für das Erstellen von 17000 g Überstand und Sediment. Das Gehirnhomogenat wurde für 60 min bei 17000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment in Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut homogenisiert. Der resultierende 17000 g-Überstand diene als Ausgangspunkt für die Isolierung von Fraktionen angereichert an Endosomen und löslichen Proteinen (s. 3.1.5.3 und 3.1.5.4).

Das in Homogenisierungspuffer gelöste und homogenisierte 17000 g-Sediment wurde verarbeitet um Zellkerne anzureichern (s. 3.1.5.5) und zur Erstellung von Zellkernextrakten (s. 3.1.5.6).

3.1.5.3 HERSTELLUNG EINES 100000 G-ÜBERSTANDES UND -SEDIMENTES

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Fraktion des 17000 g-Überstandes (s. 3.1.5.2) wurde für 1 h bei 100000 g und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand enthält lösliche Proteine des Zytosols sowie der extrazellulären Matrix (EZM) („zytosolische Fraktion“). Das 100000 g-Sediment wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und erneut homogenisiert. Das resuspendierte 100000 g-Sediment diene zur Präparation von Endosomen (s. 3.1.5.4).

3.1.5.4 PRÄPARATION VON ENDOSOMEN

Lösungen:

| | |
|---------------------------|---|
| Homogenisierungspuffer | s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer |
| Puffer Saccharosegradient | 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM Tris, pH 7,5 |
| 0,25 M Saccharoselösung | 0,25 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| 0,5 M Saccharoselösung | 0,5 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| 0,80 M Saccharoselösung | 0,80 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| 1,16 M Saccharoselösung | 1,16 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| 1,30 M Saccharoselösung | 1,30 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| 2,0 M Saccharoselösung | 2,0 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| RIPA-Puffer | s. 2.14 |
| Probenpuffer für PAGE | s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer |

Durchführung: Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Endosomen diente das resuspendierte 100000 g-Sediment (s. 3.1.5.3). Für die Isolierung der Fraktionen wurden in der Regel 20 - 40 7 Tage oder vier Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

Das 100000 g-Sediment wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einem Teflonpistill in einem Glashomogenisator homogenisiert. Das resultierende Homogenat wurde auf einen Stufengradienten geschichtet, der sich aus den folgenden Saccharoselösungen zusammensetzte (vom Boden

zur Öffnung des Zentrifugationsröhrchens): 2,0 M Saccharose, 1,3 M Saccharose, 1,16 M Saccharose, 0,8 M Saccharose, 0,5 M Saccharose und 0,25 M Saccharose. Nach einem 2-stündigen Zentrifugationsschritt bei 100000 g und 4 °C wurden die in den Interphasen der verschiedenen Saccharoselösungen getrennten Fraktionen von oben nach unten d.h. von der Öffnung zum Boden des Zentrifugationsröhrchens, in 1 ml Aliquots, abgenommen. Die resultierenden Fraktionen wurden mit Homogenisierungspuffer in einem Mindestverhältnis von 1:2 gemischt und für 30 min bei 100000 g und 4 °C zentrifugiert. Das mit den verschiedenen Organellen angereicherte Sediment wurde in RIPA-Puffer solubilisiert, mit Probenpuffer für PAGE versetzt und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3.2) untersucht.

3.1.5.5 ISOLATION VON ZELLKERNEN AUS GEHIRN

Lösungen:

| | |
|---------------------------|---|
| Homogenisierungspuffer | s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer |
| Puffer Saccharosegradient | 1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ 5 mM Tris, pH 7,5 |
| 0,8 M Saccharoselösung | 0,8 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| 1,30 M Saccharoselösung | 1,30 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |
| 2,0 M Saccharoselösung | 2,0 M Saccharose ad Homogenisierungspuffer |

Durchführung: Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Zellkernen diente das resuspendierte 17000 g-Sediment (s. 3.1.5.2). Für die Isolierung der Fraktionen wurden in der Regel 30 - 40 7 Tage oder vier Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

Das 17000 g-Sediment wurde in Homogenisierungspuffer resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einem Teflonpistill in einem Glashomogenisator

homogenisiert. Das resultierende Homogenat wurde auf einen Stufengradienten geschichtet, der sich aus den folgenden Saccharoselösungen zusammensetzte (vom Boden zur Öffnung des Zentrifugationsröhrchens): 2,0 M Saccharose, 1,3 M Saccharose, und 0,8 M Saccharose. Nach einem 2-stündigen Zentrifugationsschritt bei 100000 g und 4 °C wurden die in den Interphasen der verschiedenen Saccharoselösungen getrennten Fraktionen von oben nach unten d.h. von der Öffnung zum Boden des Zentrifugationsröhrchens, in 1 ml Aliquots, abgenommen. Die Zellkerne können als einzige Komponente das 2,0 M Saccharosekissen durchwandern und sammeln sich am Boden des Zentrifugenröhrchens. Die resultierenden Fraktionen, insbesondere die Zellkerne, wurden in Homogenisierungspuffer aufgenommen und für 30 min bei 100000 g und 4 °C zentrifugiert um den Gehalt an Saccharose in den Fraktionen zu minimieren. Die Zellkerne wurden in Roeder C Lösung (s. 3.1.5.6) aufgenommen.

3.1.5.6 HERSTELLUNG EINES ZELLKERNEXTRAKTES

Lösungen:

| | |
|-----------------|------------------------|
| Roeder C Lösung | 10 mM Tris/HCl, pH 8 |
| | 10 % Glycerin |
| | 300 mM NaCl |
| | 2 mM MgCl ₂ |
| | 0,5 mM EDTA |

Durchführung: Als Ausgangspunkt für die Herstellung eines Zellkernextraktes wurde eine mit Zellkernen angereicherte Fraktion (s. 3.1.5.5) verwendet. Das mit Zellkernen angereicherte Sediment wurde in Lösung Roeder C aufgenommen. Mit einem Glashomogenisator wurde die Fraktion durch zwanzigmaliges Auf- und Abziehen des Glaspistills homogenisiert und für 30 min bei 4 °C auf einem Magnetrührer extrahiert. Eine Zentrifugation für 30 min bei 200000 g und 4 °C wurde angeschlossen. Der Überstand, das Kernextrakt, wurde abgenommen und für Co-Immunpräzipitationsexperimente (s. 3.1.6 Co-Immunpräzipitation) sowie Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) verwendet.

3.1.6 Co-IMMUNPRÄZIPITATION

Lösungen:

| | |
|-----------------------|---|
| PBS | s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer |
| PBST | 0,3 % Triton® X-100 in PBS |
| Probenpuffer für PAGE | s. 2.14 Häufig verwendete Lösungen und Puffer |

Durchführung: Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C und in gekühlten Geräten durchgeführt. Für Immunpräzipitationen aus Gehirnfractionen (s. 3.1.5 ff) wurden pro Immunpräzipitation 5 µg eines Antikörpers eingesetzt. Tabelle 2.14 bietet eine Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und deren Eigenschaften.

Als Reaktionsvolumen wurde 1 ml gewählt und der eingesetzte Proteingehalt entsprach min. 100 µg. Um quantitative Rückschlüsse zu erlauben, wurden für zu vergleichende Immunpräzipitationen identische Gesamtproteinmengen sowie Antikörper- und *Bead*-Mengen eingesetzt. Um die unspezifische Bindung von Proteinen an die verwendeten magnetischen Protein A/G *beads* (MagnaBind™, Pierce) zu minimieren, wurde das Ausgangshomogenat mit 20 µl *beads* für 30 min vorbehandelt (*preclearing*). Die *beads* wurden nach dem *preclearing* verworfen. Die vorbehandelten Homogenate wurden nun mit dem Antikörper versetzt und für 2 h oder ü. N. inkubiert. Zum Aufreinigen des Proteins bzw. Proteinkomplexes wurden 20 µl Protein A/G *beads* zum Reaktionsansatz gegeben und für 1 h inkubiert. Dann folgten 4 Waschschrirte à 10 min mit einem geeigneten, stringenten Puffer, meistens der/dem? Lysispuffer des Homogenats oder PBST. Die Waschschrirte wurden in einem Volumen von je 500 µl auf einem Magnetständer durchgeführt. Nach dem Waschen wurden die *beads* in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert und im Immunoblot (s. 3.1.2.3) analysiert.

3.1.7 QPROTEOME NUCLEAR PROTEIN KIT, KERNFRAKTIONIERUNGSKIT (Qiagen)

Lösungen:

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>Lysis Buffer NL</i> | 1000 µl Puffer NL 10 µl Protease Inhibitor 5 µl 0,1 M DTT |
| <i>Extraction Buffer NX1</i> | 50 µl Puffer NX1 0,5 µl Protease Inhibitor |
| <i>Extraction Buffer NX2</i> | 100 µl Puffer NX2 1 µl Protease Inhibitor 1 µl 0,1 M DTT 1 µl Benzonase® |
| <i>Detergent Solution NP</i> | |
| DTT Stocklösung | 1 M DTT |
| <i>Benzonase® Nuclease</i> | 25 U/µl |
| <i>Protease Inhibitor Solution</i> | 100 x |

Durchführung: Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Puffer und Arbeitsgeräte wurden vor Verwendung gekühlt. Die erhaltenen Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Ausgangsmenge für eine Kernfraktionierung mit dieser Methode beträgt $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen. Die angegebenen Mengen der Puffer beziehen sich auf eine Präparation.

Diese Methode wurde nach Herstellerangaben (*Qproteome Nuclear Protein Handbook*, Qiagen, Stand 06.2006) durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen, zytosolische Fraktion (zyto), lösliche DNS-bindende Proteine (nab) sowie unlösliche DNS-bindende Proteine (insol), wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) untersucht.

3.1.8 CO-IMMUNPRÄZIPITATION AUS EINEM ZELLKERNEXTRAKT

(Nuclear Complex Co-IP Kit, Active Motif)

Lösungen:

| | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| PBS | 0,8 ml 10 x PBS |
| | 6,8 ml dH ₂ O |
| | 0,4 ml Phosphatase Inhibitoren |
| 1 x Hypotonischer Puffer | 50,0 µl 10 x Hypotonischer Puffer |
| | 450,0 µl dH ₂ O |
| <i>Complete Digestion Buffer</i> | 0,5 µl 100 mM PMSF |
| | 98,5 µl <i>Digestion Buffer</i> |
| | 1,0 µl Protease Inhibitor Cocktail |

Durchführung: Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Puffer und Arbeitsgeräte wurden vor Verwendung gekühlt. Die erhaltenen Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Ausgangsmenge für eine Kernfraktionierung mit dieser Methode beträgt ca. $8,8 \times 10^6$ Zellen. Die angegebenen Mengen der Puffer beziehen sich auf eine Präparation.

Diese Methode wurde nach Herstellerangaben (*Nuclear Complex Co-IP Kit*, Instruction Manual, Active Motif, Version A1) durchgeführt. Die erhaltene Kernfraktion wurde für Co-Immunpräzipitationen (s. 3.1.6 Co-Immunpräzipitation) verwendet und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) untersucht.

3.1.9 HEFE-ZWEI-HYBRID SYSTEM

(ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, Invitrogen)

Bei den Bezeichnungen DB-X und AD-Y handelt es sich im Folgenden immer um das Köderprotein (DB-X) und den potentiellen Bindungspartner (AD-Y) aus einer kommerziellen, murinen cDNS-Bibliothek aus Gehirn (ProQuest™ pre-made cDNA Libraries, Invitrogen)

3.1.9.1 KLONIERUNG DES KÖDERPLASMIDS

Die als Köder fungierenden L1-Fragmente wurden aus cDNS aus Mausgehirn durch PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer (s. 2.8) enthielten einen genspezifischen Teil und *attB*-Sequenzen für die Rekombination in den Entryvector pDONR™ 222. Die verwendeten Primer wurden nach Angaben des Herstellers konstruiert (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, 12.2002, Invitrogen).

Die PCR-Produkte wurden über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt (s. 3.2.2) und aus diesem ausgeschnitten und aufgereinigt (s. 3.2.10). Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden über T/A-Klonierung in pGEM®-T easy eingefügt (s. 3.2.11). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5α® transformiert (s. 3.2.4) und auf LB-Amp Platten ü. N. inkubiert. Es wurden je 10 Kolonien gepickt und 3 ml Kulturen angeimpft aus denen mittels DNS-Minipräparation (s. 3.2.8) die DNS isoliert und sequenziert wurde (s. 3.2.13). Klone mit fehlerfreier Sequenz wurden für die BP-Clonase™-Reaktion in pDONR™ 221 mit anschließender LR-Clonase™-Reaktion in pDEST™32 nach Protokoll des Herstellers eingesetzt.

Die BP- und LR-Clonase™ sowie der pDONR™221 wurden freundlicher Weise von Priv. Doz. Dr. Volker Heussler (Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin) zur Verfügung gestellt.

Die Köderplasmide wurden nach Herstellung sequenziert um sicherzustellen, dass das Insert keine Fehler aufweist und Insert und DNS-bindende Domäne (DB) im gleichen Leseraster sind, um als Fusionsprotein exprimiert werden zu können.

3.1.9.2 ABSCHÄTZUNG DER DB-X ABHÄNGIGEN *HIS3* AUTOAKTIVIERUNG

In dem Hefestamm MaV203 kann es im Fall der Abwesenheit von Histidin im Medium zu einer basalen Aktivierung des *HIS3*-Reportergens, in Anwesenheit von DB-X, kommen. Das Gen *HIS3* codiert Imidazol Glycerol-Phosphat Dehydrogenase, ein wichtiges Enzym für die Histidin-Biosynthese. Dieses Enzym kann dosisabhängig durch 3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT) inhibiert werden, welches dem Medium zugefügt wird (Kishore and Shah, 1988; Durfee et al., 1993). Um die notwendige Menge 3AT zu ermitteln, wurden Hefen mit den L1-Köderplasmiden sowie mit pEXP-AD502 kleinmaßstäblich transformiert und auf SC-Leu-Trp-His-Platten mit 3AT Konzentrationen von 10 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM und 100 nM für 24 h bei 30 °C inkubiert. Diese Prozedur wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, 12.2002, Invitrogen).

Die Konzentration von 3AT, bei der kein Wachstum der Hefen zu beobachten war, wurde bei allen folgenden Experimenten zugefügt, um die Möglichkeit falsch-positiver Klone zu minimieren bei gleichzeitiger Identifizierung von schwachen Bindungspartnern.

3.1.9.3 KLEINMAßSTÄBLICHE TRANSFORMATION VON MAV203

Lösungen:

0,9 % NaCl

0,9 % (w/v) ad dH₂O

Durchführung: Diese Prozedur wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, 12.2002, Invitrogen). Die kompetenten Mav203 Zellen wurden in einem 30 °C warmen Wasserbad für 90 sek aufgetaut und 100 µl-Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäßen angefertigt. Von der zu transformierenden DNS wurde je 100 ng zu den Zellen gegeben und diese vorsichtig gemischt. 600 µl PEG/LiAc-Lösung wurde zu den Zellen geben und durch Invertierung gemischt. Die Zellen wurden für 30 min bei 30 °C inkubiert und alle 10 min durch Invertierung gemischt. Anschließend wurden 35 µl DMSO zu den Ansätzen gegeben und diese für 20 min bei 42 °C inkubiert (Hitzeschock). Die Zellen wurden bei 400 g für 5 sek pelletiert und in 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung aufgenommen und je nach Bedarf in unterschiedlichen Verdünnungen ausplattiert und bei 30 °C für 60 – 72 h inkubiert.

3.1.9.4 CO-TRANSFORMATION MIT DB-X UND DER AD-BIBLIOTHEK

Lösungen:

0,9 % NaCl

0,9 % (w/v) ad dH₂O

Durchführung: Diese Prozedur wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, 12.2002, Invitrogen). Das folgende Co-Transformations-Protokoll resultiert in $\geq 2 \times 10^6$ Hefetransformanden aus 500 µl kompetenten MaV203 Zellen. Um eine mehrfache Transformation einer Zelle mit dem identischen Plasmid zu vermeiden, wurden 5 µg DNS je Plasmid eingesetzt (statt 10 µg). Zu Beginn wurden die kompetenten Zellen in zwei Ansätze (je 250 µl) aufgeteilt. Die Prozedur ist identisch mit der kleinmaßstäbliche Transformation von MaV203 (s. 3.1.9.3) mit

folgenden Unterschieden: Die Transformationsansätze wurden in 15 ml Falcon™ Tubes angesetzt. Die verwendeten Mengen PEG/LiAc, DMSO und 0,9 % NaCl betragen 1,5 ml, 88 µl und 8,0 ml.

Es wurden 400 µl Aliquots auf 15 cm SC-Leu-Trp-His+3AT ausplattiert. Pro *screen* wurden 20 Platten benötigt. Diese wurden bei 30 °C für 60 – 72 h inkubiert. Dieses Zeitfenster ist kritisch für die Methode und wurde weder unter- noch überschritten.

3.1.9.5 SCREENING VON AD-BIBLIOTHEKEN NACH BINDUNGSPARTNERN VON DB-X

Um eine AD-Bibliothek (ProQuest™ pre-made cDNA Libraries, Invitrogen) nach Bindungspartnern zu *screenen* wurde eine Co-Transformation mit DB-X und AD-Y (s. 3.1.9.4) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, 12.2002, Invitrogen). Die SC-Leu-Trp-His+3AT Platten wurden bei 30 °C für 60 – 72 h inkubiert. Dieses Zeitfenster ist kritisch für die Methode und wurde weder unter- noch überschritten. Hefekolonien, die in dem Zeitfenster gewachsen sind, wurden auf eine Masterplatte übertragen und von dieser auf weitere Selektionsplatten übertragen. Diese waren SC-Leu-Trp-His + 3AT, SC-Leu-Trp-Ura, SC-Leu-Trp + 0,2 % 5FOA, YPAD + X-gal und wurden bei 30 °C für 24 h inkubiert.

3.1.9.6 CHARAKTERISIERUNG DER TRANSFORMANDEN, DIE DAS HIS3 REPORTER GEN INDUZIEREN

Nach Inkubation der Transformanden auf den Selektionsplatten SC-Leu-Trp-His + 3AT, SC-Leu-Trp-Ura, SC-Leu-Trp + 0,2 % 5FOA, YPAD + X-gal für 24 h (s. 3.1.9.5) wurden solche als positiv selektiert, welche auf –His und –Ura wachsen, auf 5FOA-haltigen Platten nicht wachsen und im X-gal blau werden. Diese Parameter wurden für alle Bibliothek-Screens beibehalten und sind die stringentesten.

Diese Prozedur wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, 12.2002, Invitrogen).

3.1.9.7 BESTÄTIGUNG DER INTERAKTIONEN

Aus den Hefeklonen, welche nach der Prozedur beschrieben in 3.1.9.6 als positiv gewertet wurden, wurde die AD-Y Plasmid-DNS isoliert und sequenziert (s. 3.2.13). Nach diesem Schritt wurde bekannt, ob die DNS im gleichen Leseraster mit der aktivierenden Domäne AD war und um welchen Bindungspartner es sich handelt. Potentielle Bindungspartner, welche in den Vorversuchen den richtigen Phänotyp zeigten, aber einen *frameshift* aufwiesen, wurden nicht weiter berücksichtigt.

MaV203 wurden mit DB-X transformiert (s. 3.1.9.3) und auf SC-Leu kultiviert. Nach der Sequenzierung wurden die positiven AD-Y Plasmide in Hefezellen transformiert, die bereits DB-X trugen. Diese Klone wurden erneut auf den Selektionsmedien SC-Leu-Trp-His + 3AT, SC-Leu-Trp-Ura, SC-Leu-Trp + 0,2 % 5FOA für 24 h inkubiert um sicher zu stellen, dass die Interaktion bestätigt werden kann.

Diese Prozedur wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, 12.2002, Invitrogen).

3.1.10 BIOCHEMISCHES *CROSSLINKING*

(ProFound™ Mts-Atf-Biotin Label Transfer Reagent #33093, Pierce)

Bei dem ProFound™ *crosslinker* (Pierce) handelt es sich um ein trifunktionales Molekül, welches eine Biotin-, eine Sulfhydryl-reaktive Methanthiosulfonat- (Mts) und eine fotoaktivierbare Tetrafluorophenyl-Azid- (Atf) Gruppe enthält. Alle Arbeitsschritte wurden in Abwesenheit von Licht durchgeführt. Der *Crosslinker* wurde in DMSO gelöst und in einem 5-fachen molaren Überschuss zu dem Köderprotein, 100 µg in PBS, gegeben. Eventuell oxidierte SH-Gruppen im Köderprotein wurden durch *Immobilized TCEP Disulfide Reducing Gel* (Pierce), nach Angaben des Herstellers, reduziert. Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig geschüttelt und für 4 h bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundener, reaktiver *Crosslinker* wurde durch eine Puffer Austausch Prozedur (s. 3.1.11) entfernt. Das Köderprotein, mit gekoppelten *Crosslinker*, wurde nun für 1 h bei RT mit einem Homogenat oder einer Gehirnfraction (s. 3.1.5 ff) inkubiert. Die Fotoreaktion wurde auf Eis bei einer UV-Wellenlänge von 365 nm für 10 min durchgeführt. Unter reduzierenden Bedingungen (50 mM DTT oder 100 mM β-Mercaptoethanol) wurde der entstandene Proteinkomplex

aufgelöst und der durch das übertragene Biotin markierte Bindungspartner konnte mit Streptavidin *beads* (Dynabeads® M-270 Streptavidin, Dynal) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und im Immunoblot (s. 3.1.2.3) analysiert werden.

3.1.11 PUFFER AUSTAUSCH PROZEDUR

(Zeba™ Desalt Spin Columns, Pierce)

Durchführung: Die Zeba™ Desalt Spin Columns der Firma Pierce erzielen sehr gute Ergebnisse als Puffer-Austauscher. Die Probenmenge muss in einem Reaktionsvolumen von 30 – 130 µl nicht mehr als 20 µg/ml betragen. Laut Herstellerangaben geht wenig Protein bei der Prozedur verloren und ≥ 95 % aller Salze und kleine Moleküle (≤ 1000 Da) werden zurückgehalten.

Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zeba™ Desalt Spin Säule wurde in ein 1,5 – 2 ml Sammelgefäß überführt und mit 1500 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule viermal mit je 300 µl PBS gewaschen und bei 1500 g für je 1 min zentrifugiert.

Die Probe wird nun in einem Volumen von 30 – 130 µl auf die Säulenmatrix pipettiert und für 2 min bei 1500 g zentrifugiert. Im Falle der UV-sensitiven *crosslinker* wurde dieser Schritt im Dunklen durchgeführt.

3.1.12 IN-VIVO CROSSLINKING

(L-Photo-Methionin, Thermo Scientific) (Suchanek et al., 2005)

Durchführung: Zellen wurden 4 h nach transienter Transfektion (s. 3.3.3) einem Mediumwechsel unterzogen. Das verwendete Medium war DMEM (minus L-Leucin und L-Methionin) (Thermo Scientific), welches mit 105 mg/l L-Leucin und 30 mg/l L-Photo-Methionin supplementiert wurde. L-Photo-Methionin ist ein Aminosäurederivat, welches durch die eukaryotische Translationsmaschinerie direkt in Proteine eingebaut werden kann. Ein Diazirin-Ring reagiert nach UV-Fotoaktivierung über eine hochreaktive Carbengruppe mit einem gebundenen Bindungspartner.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen UV-Licht der Wellenlänge 365 nm für

10 min ausgesetzt um die *crosslinking* Reaktion auszulösen. Der Abstand der geöffneten 10 cm Petrischale zur Lichtquelle betrug ca. 5 cm. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS (s. 2.14) gewaschen, mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst und fraktioniert (s. 3.1.7) oder direkt in SDS-Probenpuffer (s. 2.14) aufgenommen und im Immunoblot analysiert (s. 3.1.2.3). War das transfizierte Protein mit einem 6xHis-tag versehen, wurde dieses zur Analyse mittels Protino® Ni-TED 150 Säulchen (Macherey-Nagel) (s. 3.1.16) aufgereinigt.

3.1.13 VERIFIZIERUNG PUTATIVER BINDUNGSPARTNER DURCH *PULLDOWN*-EXPERIMENTE

Durchführung: Die *Pulldown*-Experimente dienen zur Verifizierung identifizierter Bindungspartner der intrazellulären Domäne von L1 aus einem Zellkernlysate (s. 3.1.1). Die Versuche wurden mit rekombinant in *E. coli* exprimierten Proteinen (s. 3.1.14), welche an CNBr-activated Sepharose™ 4B (GE Healthcare) gekoppelt wurde (s. 3.1.13.1), durchgeführt.

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt. Die rekombinant exprimierten intrazellulären Domänen der Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM-140 wurden als Köderproteine und gegenseitige Kontrollen verwendet. Für ein *Pulldown*-Experiment wurden 30 µl Sepharose™ *beads* (mit Köderprotein gekoppelt) eingesetzt, welche ü. N. auf einem Rotationsschüttler mit einem Homogenat oder einer Gehirnfraction in einem Volumen von 1 ml inkubiert wurde. Die *beads* wurden 4-mal für 15 min mit PBST gewaschen und mit 100 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurden die *beads* in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert und im Immunoblot (s. 3.1.2.3) untersucht.

3.1.13.1 KOPPLUNG VON LIGANDEN AN CNBR-AKTIVIERTE SEPHAROSE BEADS

Durchführung: Die verwendeten Sepharose *beads* (CNBr-activated Sepharose 4B, GE Healthcare) wurde dreimal je 15 min bei 4 °C mit 1 mM HCl gewaschen. Die zuvor in *E. coli* exprimierten (s. 3.1.14) und aufgereinigten Proteine (s. 3.1.14.2) wurden in je 0,5 ml Kupplungspuffer (s. 3.1.1) aufgenommen und bei 4 °C über Nacht mit der Sepharose inkubiert. Im nächsten Schritt müssen eventuell verbliebene aktivierte Gruppen der Matrix blockiert werden. Zu diesem Zweck wurde 1 ml Blockierungspuffer (s. 3.1.1) über Nacht über

zur Matrix gegeben. Anschließend wurde die Matrix dreimal abwechselnd mit je 1 ml Puffer A (s. 3.1.1) und Kupplungspuffer gewaschen. Falls die Matrix nicht direkt im Anschluss verwendet wurde, wurde sie mit 1 ml Säulen-Lagerungspuffer (s. 3.1.1) gespült und verschlossen. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

3.1.14 REKOMBINANTE PROTEINEXPRESSION IN *E. COLI*

Lösungen:

| | |
|--------------------|---|
| LB-Medium und Agar | s. 2.14 |
| Lysispuffer | 100 mM Na ₂ PO ₄ 10 mM Tris·Cl 8 M Urea pH 8,0 mit NaOH einstellen |

Durchführung: Um ein Protein rekombinant in Bakterien zu exprimieren, wurde die entsprechende cDNS in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) kloniert und das Konstrukt in den Expressionsstamm *E. coli* M15 (pREP4) transformiert. Das Protein wurde mit einem N-terminalen His-tag zur Proteinaufreinigung exprimiert. Nach Transformation (s. 3.2.4) der Bakterien wurden diese auf LB-Agarplatten ausgestrichen, welche mit Ampicillin (s. 2.5 Antibiotika) und Kanamycin (s. 2.5 Antibiotika) supplementiert waren. Eine Kolonie wurde gepickt und zum Animpfen einer Vorkultur (100 ml LB mit Antibiotika) genutzt, welche ü. N. bei 37 °C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurde die Vorkultur zum Animpfen einer 2 l Kultur verwendet, diese auf eine OD von 0,1 einstellt und bei 37 °C bei 200 rpm inkubiert bis eine OD von 0,6 – 0,7 erreicht war. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 2 ml 1 M IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Kultur bei identischen Einstellungen für 2 h weiter inkubiert.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (6000 g für 15 min bei 4 °C) geerntet und die Bakteriensedimente bei -20 °C eingefroren. Die Sedimente wurden auf Eis in Lysispuffer aufgenommen und in der French Press (s. 3.1.14.1) aufgeschlossen. Die Proteine wurden mit Ni-NTA Agarose (Qiagen) nach Angaben des Herstellers (QIAexpressionist™ Handbook, Qiagen) aufgereinigt (s. 3.1.14.2) und mit Centricon®-Filtern (Millipore) eingeeengt (s. 3.1.14.3).

3.1.14.1 FRENCH PRESS, HOCHDRUCK AUFSCHLUSS-SYSTEM

Um eine Bakteriensuspension aufzuschließen, wurde diese in einen vorgekühlten French-Pressure-20K-Zylinder mit einer Kapazität von 40 ml überführt. Dieser Zylinder wurde in der French-Press (SLM Aminco) unter Druck gesetzt (10000 psi) und das Ventil langsam geöffnet und Bakterien somit geschert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert, um genomische DNS und Zelltrümmer aus der Suspension zu eliminieren.

3.1.14.2 AUFREINIGUNG VON HIS-TAG PROTEINEN AUS *E. COLI*

(QIAexpressionist™ Handbook, Qiagen)

Lösungen:

| | |
|--------------------------|---|
| Puffer B, Lysis Puffer | 100 mM Na ₂ PO ₄ 10 mM Tris·Cl 8 M Urea pH 8,0 mit NaOH einstellen |
| Puffer C, Waschpuffer | 100 mM Na ₂ PO ₄ 10 mM Tris·Cl 8 M Urea pH 6,3 mit HCl einstellen |
| Puffer D, Elutionspuffer | 100 mM Na ₂ PO ₄ 10 mM Tris·Cl 8 M Urea pH 5,9 mit HCl einstellen |
| Puffer E, Elutionspuffer | 100 mM Na ₂ PO ₄ 10 mM Tris·Cl 8 M Urea pH 4,5 mit HCl einstellen |

Durchführung: Das von Trümmern befreite Bakterienlysat (s. 3.1.14.1) wurde mit 5 ml Ni-NTA Agarose (Qiagen) versetzt und auf einem Rotationsschüttler bei 4 °C ü. N. inkubiert. Die

Agarose wurde anschließend 2-mal mit 20 ml Puffer C gewaschen. Eluiert wurde je viermal mit den Puffern D und E in einem Volumen von je 1 ml. Nach der Elution wurde der pH-Wert des Eluats neutralisiert und dieses auf ein kleineres Volumen eingeeengt (s. 3.1.14.3).

3.1.14.3 EINENGEN VON PROTEINLÖSUNGEN

(Centricon® Centrifugal Filter Devices, Millipore)

Proteinlösungen wurden nach Herstellerangaben in passenden Centricon®-Einheiten (Volumen und *cutoff* meistens 5000 MWCO) bei 4 °C eingeeengt. Die maximale Zentrifugationsgeschwindigkeit ist vom Centricon®-Modell abhängig. Die Zentrifugationsdauer muss für jede Präparation individuell bestimmt werden.

3.1.15 DENSITOMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON BANDEN

Der entwickelte Film wurde mit 200 dpi und Graustufen eingescannt, um anschließend mit dem Bildbearbeitungsprogramm TINA 2.09 (Raytest Isotopenmessgeräte) quantifiziert zu werden. Die densitometrische Auswertung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.16 AUFREINIGUNG VON HIS-TAG PROTEINEN AUS HEK-293 ZELLEN

(Protino® Ni-TED 150, Macherey Nagel)

Lösungen:

| | |
|-----------------------------------|--|
| LEW Puffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ |
| (Lysis-Equilibration-Wash buffer) | 300 mM NaCl |
| | pH 8,0 mit NaOH einstellen |
| Elutionspuffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ |
| | 300 mM NaCl |
| | 250 mM Imidazol |
| | pH 8,0 mit NaOH einstellen |

Durchführung: Die Ni-TED Säule wurde mit 320 µl LEW Puffer equilibriert. Anschließend wurde die Proteinsuspension auf die Säule gegeben. Im Fall von transient transfizierten HEK-293 Zellen, wurden diese in RIPA Puffer (s. 2.14) aufgenommen und mit 20 Hüben im Homogenisator auf Eis aufgeschlossen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4 °C und 1000 g. Der Überstand wurde auf die equilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde nun zweimal mit 320 µl LEW Puffer gewaschen. Eluiert wurde in 3 Schritten mit je 240 µl Elutionspuffer. Das Eluat wurde entweder eingeeengt (s. 3.1.14.3) oder die Proteine wurden gefällt (s. 3.1.3), um im Immunoblot (s. 3.1.2.3) analysiert zu werden.

3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.2.1 RESTRIKTIONSVERDAU (Sambrook, 1989)

Die Restriktion der DNS erfolgte unter den von den Herstellern (NEB) empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen. Für analytische Zwecke wurde einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers pro µg DNS 10 U

Restriktionsendonuklease hinzugefügt. Bei der Restriktion mit zwei verschiedenen Endonukleasen wurde der Puffer verwendet, in dem beide Enzyme nach Angaben des Herstellers mindestens eine Aktivität von 75 % aufwiesen. Waren die Puffer nicht kompatibel, wurde zwischen den Teilverdaus ein Pufferwechsel mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, s. 3.2.6) durchgeführt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.2) und analysiert.

3.2.2 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNS (Sambrook, 1989)

Lösungen:

| | |
|--------------------|--|
| 5 x DNS-Ladepuffer | 50 % (v/v) Glycerin 1 Spatelspitze Orange G ad dH ₂ O |
| 50 x TAE-Puffer | 2 M Tris-Acetat, pH 8,0 100 mM EDTA ad dH ₂ O |

Durchführung: Zu analytischen Zwecken wurden die nach Restriktionsspaltungen erhaltenen DNS-Fragmente durch Elektrophorese in horizontalen 1 %igen Agarosegelen (SubCell GT Elektrophoresekammern, BioRad) aufgetrennt. Die Agarosegele wurden durch Lösung von 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer hergestellt.

Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Molekülgröße wurde zusätzlich ein Größenmarker (DNS-Leiter 1kb, Gibco BRL) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufes wurde zur Visualisierung der DNS das Gel in einer Ethidiumbromidhaltigen Lösung (0,5 µg/ml in 1 x TAE Puffer) für 30 min gefärbt und mit Hilfe eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, Herolab) unter UV-Licht fotografiert.

3.2.3 HERSTELLUNG VON KOMPETENTEN BAKTERIEN (*E. coli*-Stamm: DH5 α [®])

(Inoue et al., 1990)

Lösungen:

| | |
|-------------|--|
| LB-Medium | s. 2.14 |
| TFB1-Puffer | 100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin pH 5,8; Lösung steril filtrieren |
| TFB2-Puffer | 10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin pH 8,0 (mit KOH); Lösung steril filtrieren |

Durchführung: Zur Herstellung chemokompetenter Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 α [®] wurden 1 ml einer Übernachtskultur (s. 2.3.1) in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium überführt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Nach Kühlung der Kultur für 5 min auf Eis wurden die Bakterien für 5 min mit 4000 g bei 4 °C abzentrifugiert und vorsichtig in 30 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Es folgte eine 90-minütige Inkubation der Bakterien auf Eis. Daraufhin wurden sie erneut in Überstand und Sediment getrennt (5 min, 4000 g, 4 °C) und das Sediment in 4 ml kaltem TFB2-Puffer aufgenommen. Aliquots à 100 μ l wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.4 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN (Sambrook, 1989)

Lösungen:

LB-Medium s. 2.14

LB-Agar s. 2.14

Durchführung: Zur chemischen Transformation von Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 α [®] wurden 10 – 100 ng Plasmid-DNS mit 100 μ l langsam aufgetauten chemokompetenten Bakterien gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterien für 90 s auf 42 °C erwärmt und nach dem Hitzeschock wiederum für 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert, kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die restlichen Bakterien in dem verbleibenden Restvolumen resuspendiert. Diese wurden auf Selektivagar ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

3.2.5 POLYMERASE KETTENREAKTION PCR (Mullis et al., 1986)

Durchführung: Die Amplifikation von DNS erfolgte in 50 μ l Ansätzen. Dazu wurden die in der Tabelle 3.2 aufgelisteten Reagenzien auf Eis zusammenpipettiert und die DNS je nach Anwendung entweder mit Hilfe der AccuPrime[™]Taq- (Invitrogen) oder der Phusion[®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Biolabs) vervielfältigt. Die Reaktionen wurden in MJ Research PTC-200 Thermocyclern (Biozym) durchgeführt. Bei Verwendung von Oligonukleotiden mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen (T_m) erfolgte die PCR bei der niedrigeren T_m .

Die Schmelztemperaturen der Primer sind von deren GC-Gehalt abhängig und wurden mit folgender Formel bestimmt: $T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$

Kapitel 3 Methoden

| Komponente | 50 µl Reaktion | Komponente | 50 µl Reaktion |
|---------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| 10X AccuPrime™ PCR Buffer | 5 µl | 5x Phusion™ HF Buffer | 10 µl |
| Primer Mix (10 µM each) | 1 µl | 10 mM dNTPs | 1 µl |
| Template DNS | 10 pg – 200 ng | Primer Mix (10 µM each) | 1 µl |
| AccuPrime™ Taq | 1 µl | Template DNS | 10 pg – 200 ng |
| dH ₂ O | auf 50 µl | Phusion™ Hot Start | 0,5 µl |
| | | dH ₂ O | auf 50 µl |

Tabelle 3.2: PCR-Ansätze im Überblick.

Verwendete Reagenzien für PCR-Ansätze mit AccuPrime™Taq Polymerase (Invitrogen) und Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Biolabs).

Die Amplifikation von DNS erfolgte nach Angaben der Hersteller (Invitrogen und Finnzymes Biolabs).

| PCR-Schritte | AccuPrime™Taq | Phusion® Hot Start | Zyklen |
|------------------------|-------------------|--------------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C für 2 min | 98 °C für 30 sek | 1 |
| Denaturierung | 94 °C für 30 sek | 98 °C für 10 sek | 30 |
| Anlagerung | 55-60 °C 30 sek * | 60-72 °C 30 sek * | |
| Extension | 68 °C; 1 min/kb | 72 °C; 30 sek/kb | |
| Finale Extension | - | 72 °C für 10 min | 1 |
| 4 °C nach Programmende | | | |

Tabelle 3.3: Verwendete PCR-Programme.

Verwendete PCR-Programme für PCR-Ansätze mit AccuPrime™Taq Polymerase (Invitrogen) und Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Biolabs). * Die Anlagerungstemperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt T_m der eingesetzten Primer.

3.2.5.1 TOUCH DOWN-PCR

Ein Grund für das Auftreten unspezifischer Amplifikate kann in der nicht optimalen Bindung der eingesetzten Oligonukleotide liegen. Die *Touch Down*-PCR wird eingesetzt, um eine unspezifische Bindung der Oligonukleotide während der ersten PCR-Zyklen zu verhindern.

Das Prinzip beruht auf einer schrittweisen Herabsetzung der Anlagerungstemperatur um jeweils 2 °C in den ersten 15 PCR-Zyklen. Die anfängliche Anlagerungstemperatur sollte ca. 10 °C über dem berechneten optimalen T_m -Wert liegen. Die *Touch Down*-PCR wurde angewendet, um DNS-Fragmente aus Mausgehirn cDNS zu amplifizieren. Die mRNA wurde aus den Gehirnen von sieben Tage alten Mäusen isoliert (s. 3.2.14.1 f) und mittels reverser Transkription, mit einem Oligo-(dT)-Primer, in cDNS umgeschrieben (s. 3.2.14.3).

Touch Down-PCR-Programm:

| PCR-Schritte | AccuPrime™Taq | Phusion® Hot Start | Zyklen |
|---|-------------------|--------------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94 °C für 2 min | 98 °C für 30 sek | 1 |
| Denaturierung | 94 °C für 30 sek | 98 °C für 10 sek | 15 |
| Anlagerung | 55-60 °C 30 sek * | 60-72 °C 30 sek * | |
| Jeden dritten Zyklus wird die Anlagerungstemperatur um 2 °C gesenkt | | | |
| Extension | 68 °C; 1 min/kb | 72 °C; 30 sek/kb | 20 |
| Denaturierung | 94 °C für 30 sek | 98 °C für 10 sek | |
| Anlagerung | 55-60 °C 30 sek * | 60-72 °C 30 sek * | |
| Extension | 68 °C; 1 min/kb | 72 °C; 30 sek/kb | 1 |
| Finale Extension | - | 72 °C für 10 min | |
| 4 °C nach Programmende | | | |

Tabelle 3.4: Verwendete Touch Down-PCR-Programme.

Verwendete Touch Down-PCR-Programme für PCR-Ansätze mit AccuPrime™Taq Polymerase (Invitrogen) und Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes Biolabs). * Die Anlagerungstemperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt T_m der eingesetzten Primer.

3.2.6 AUFREINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen)

Durchführung: Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick® PCR Aufreinigungskit (Qiagen) verwendet und dabei gemäß dem Protokoll des Herstellers mittels Mikrozentrifuge verfahren. Im Detail wurden zu einem Volumen des PCR-Ansatzes fünf Volumina des Puffers PBI gegeben, die Mischung auf die bereitgestellte Säule gegeben und diese für 1 min bei 12000 g und RT zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen, die Matrix mit 750µl des Puffers PE gewaschen und anschließend durch erneute Zentrifugation getrocknet. Die Elution erfolgte mit 10 µl dH₂O.

3.2.7 LIGATION VON DNS

(Sambrook, 1989), (Rapid DNA Ligation Kit, Roche)

Durchführung: Zur Ligation von DNS-Fragmenten wurde das Rapid Ligation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Ligation wurden 50 ng linearisierte Plasmid-DNS mit dem 5 – 10-fachen molaren Überschuss an *Insert*-DNS in entsprechender Menge Ligationspuffer (2 x) mit T4-DNS-Ligase (1 U) inkubiert (15 min RT oder ü. N. 16 °C). Der Ligationsansatz wurde im Anschluss direkt für die Transformation (s. 3.2.4) von kompetenten Bakterien (s. 3.2.3) eingesetzt.

3.2.8 MINIPRÄPARATION VON PLASMID-DNS AUS *E. COLI*-BAKTERIENKULTUREN

(PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen)

Durchführung: Die Plasmidisolierung im analytischen Maßstab erfolgte aus 2 ml Übernachtkulturen mit Hilfe des PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Im Detail wurden die Bakterien der Übernachtkulturen durch Zentrifugation für 1 min bei 12000 g und RT sedimentiert, in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen, 5 min inkubiert und dann 250 µl Lysepuffer zugegeben. Nach Addition von 350 µl Präzipitationpuffer erfolgte die Sedimentation der DNS durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 12000 g und RT. Der resultierende Überstand wurde auf die bereitgestellte Säule geladen und der, nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erhaltene, Durchlauf verworfen. In gleicher Weise wurde die Matrix der Säule mit den Waschpuffern W10 (500µl) und W9 (700µl) gewaschen, durch Zentrifugation getrocknet und die DNS mit 10 – 50 µl dH₂O eluiert.

3.2.9 MAXIPRÄPARATION VON PLASMID-DNS AUS *E. COLI*-BAKTERIENKULTUREN

(QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit, Qiagen)

Durchführung: Die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab erfolgte aus 250 – 500 ml Übernachtkulturen mit Hilfe des Maxipräparationskits QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Im Detail wurden die Bakterien der Übernachtkulturen durch 15-minütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C sedimentiert, in 10 ml des Puffers P1 resuspendiert, nach Zugabe von weiteren 10 ml des Puffers P2 vorsichtig durch Invertieren des Gefäßes lysiert und schließlich durch Zugabe von 10 ml des Puffers P3 präzipitiert. Das Lysat wurde in die mitgelieferten QIAfiltereinsätze gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit konnte die bereitgestellte QIAGEN®-tip 500 Säule durch Zugabe von 10 ml des Puffers QBT equilibriert werden. Anschließend wurde das Bakterienlysat durch den QIAfilter™ von allen festen Bestandteilen befreit, die resultierende Lösung auf die Säule geladen und die Matrix zweimal mit 30 ml des Puffers QC gewaschen. Die Elution der DNS erfolgte mit 15 ml des Puffers QF.

Durch Zugabe von 10,5 ml (0,7 Volumenanteile) Isopropanol wurde die eluierte DNS präzipitiert, durch Zentrifugation für eine Zeit von 30 min bei 15000 g und 4 °C sedimentiert und dann mit 5 ml 70 %igen Ethanol gewaschen, ohne das DNS-Pellet zu zerstören. Nachdem dieses für 5 bis 10 min an der Luft getrocknet worden ist, erfolgte die Aufnahme der DNS in 100 – 200 µl dH₂O.

3.2.10 DNS-ISOLATION AUS AGAROSEGELEN (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen)

Durchführung: DNS-Fragmente aus Restriktionsansätzen oder PCR-Reaktionen wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits gemäß des Protokolls aus dem Gel eluiert. Im Detail wurden drei Volumina des Puffers QG zu einem Volumen DNS-Gelstück gegeben (100 mg entsprechen 100 µl), die Mischung bei einer Temperatur von 50 °C unter Schütteln inkubiert bis sich die Agarose komplett gelöst hat (ca. 10 min) und dann ein Gelvolumen Isopropanol addiert. Nach Mischen der Lösung durch Invertierung des Gefäßes wurde diese auf die Säule geladen und der Durchlauf nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min 12000 g und RT verworfen. Dann wurde die Matrix der Säule mit 500 µl des Puffers QG und 750 µl des Puffers PE gewaschen und anschließend durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution erfolgte mit 10 – 50 µl dH₂O.

3.2.11 pGEM[®]-T EASY VEKTOR SYSTEM (T/A-KLONIERUNG) (Promega)

Über PCR amplifizierte DNS-Fragmente können in den pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) kloniert werden. Dies hat den Vorteil, dass durch Transformation des Konstrukts in kompetente *E. coli*-Zellen und anschließende Plasmidisolierung das inserierte DNS-Fragment einfach vervielfältigt werden kann. Mit Hilfe von geeigneten Schnittstellen kann das Fragment wieder aus dem pGEM[®]-T Easy Vektor ausgeschnitten und anschließend in den Zielvektor kloniert werden. Der pGEM[®]-T Easy Vektor weist 5'-T Überhänge an der Insertionsstelle auf. Da die *Taq*-Polymerase 3'-Adenylierungsaktivität aufweist, lassen sich PCR-Fragmente, die mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert wurden (s. 3.2.5 f) leicht in den Vektor ligieren. Wenn für die Amplifikation von PCR-Produkten Polymerasen mit Korrekturleseaktivität verwendet werden (z. B. Pfu), die keine 3'-Adenosine an die

Kapitel 3 Methoden

Fragmentenden anhängen, müssen diese mit Hilfe der *Taq*-Polymerase nachträglich an das amplifizierte und aufgereinigte PCR-Produkt angehängt werden. Hierfür werden die PCR-Produkte in Anwesenheit von dATP für 30 min bei 72 °C mit der *Taq*-Polymerase inkubiert. Anschließend können die modifizierten Fragmente für die T/A-Klonierung eingesetzt werden.

Schema für das Anhängen von Adenosin-Überhängen an PCR-Fragmenten ohne 3'-Adenosine:

| Volumina | Komponenten |
|----------|---|
| 7 µl | PCR-Produkt (aufgereinigt mittels Gelelektion, s. 3.2.10) |
| 0,5 µl | dATP (10 mM) |
| 1 µl | MgCl ₂ (15 mM) |
| 1 µl | 10 x Reaktionspuffer |
| 0,5 µl | <i>Taq</i> -Polymerase |

Tabelle 3.5: Anhängen von Adenosin-Überhängen an PCR-Fragmenten ohne 3'-Adenosine

Schema für die Ligation von PCR-Fragmenten in den pGEM®-T Easy-Vektor:

| Volumina | Komponenten |
|----------|---|
| 1 µl | pGEM®-T Easy Vektor (50 ng) |
| X ml | PCR-Produkt (mit Adenosin 3'-Überhängen), 3-facher Überschuss |
| 1 µl | T4 DNS Ligase (3 Weiss units/µl) |
| 5 µl | 2x Rapid Ligation Puffer |
| add | 10 µl dH ₂ O |

Tabelle 3.6: Ligation von PCR-Fragmenten in den pGEM®-T Easy-Vektor

Die Ligation findet bei 4 °C über Nacht statt. Anschließend wird der gesamte Ansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (s. 3.2.4).

3.2.12 DNS-REINHEITSANALYSE UND -KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Nukleinsäurekonzentrationen wurden im Spektralphotometer (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia Biotech) bestimmt. DNS und RNS haben ein Extinktionsmaximum bei 260 nm. Eine Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 1,0 entspricht einem DNS-Gehalt von 50 µg dsDNS/ml bzw. 40 µg ssRNS/ml. Proteine haben dagegen ein Extinktionsmaximum bei 280 nm, absorbieren aber bei 260 nm immer noch UV-Licht. Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt den Reinheitsgrad der DNS- oder RNS-Probe an. Liegt bei einer DNS-Konzentrationsbestimmung

der Quotient $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$, so liegt reine DNS vor. Ein Quotient von $< 1,8$ deutet auf eine Kontamination durch Proteine oder Aromaten (z.B. Phenol) in der Probe hin. RNS von ausreichender Reinheit liegt dagegen bei einem Quotienten von $A_{260}/A_{280} \geq 2,0$ vor. Ist A_{260}/A_{280} kleiner als 2,0, deutet dies auf eine Kontamination durch Proteine oder Aromaten (z.B. Phenol) hin (MEGAscript® Handbuch, Ambion).

Die photometrische Mengenbestimmung der DNS, welche 1:20 bis 1:50 in dH₂O verdünnt ist, erfolgte in einer Quarzküvette mit einem Photometer. Bei der Verdünnung von 1:50 entspricht die abgelesene Absorption der Konzentration in µg/µl. RNS wurde dagegen 1:25 in DEPC-H₂O verdünnt, da dann die abgelesene Absorption der Konzentration in µg/µl entspricht.

3.2.13 DNS-SEQUENZIERUNG

(Step-by-Step protocols for DNA-sequencing with Sequenase-Version 2.0, 5th ed., USB, 1990)

Die Sequenzierung von DNS erfolgte in der Sequenzierabteilung des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH). Hierzu wurde 1 µg DNS mit dem entsprechenden Sequenzierprimer (10 pM) in einem Gesamtvolumen von 8 µl versetzt.

3.2.14 RNASE-FREIES ARBEITEN

Bei der Isolierung von Gesamt-RNS sowie bei dem Nachweis von mRNS in Gewebeschnitten muss sowohl endogene wie auch exogene Ribonukleaseaktivität möglichst gering gehalten werden. So werden alle benötigten Lösungen und Puffer mit Diethylpyrocarbonat (DEPC 0,1%ig) angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert. Sämtliche Glasgeräte wie Kolben, Messzylinder, Glaspipetten etc. werden im Trockenschrank 3 Stunden bei 180 °C sterilisiert. Pipettenspitzen, Eppendorftubes und andere Kunststoffgefäße werden 30 Minuten bei 120 °C autoklaviert, oder sind im Handel bereits sterilisiert erhältlich. Ebenso wichtig ist es, bei allen Arbeitsschritten Handschuhe zu tragen, um direkte Berührungen mit den Händen zu vermeiden, sowie eine gründliche Reinigung der Arbeitsflächen mit RNaseZAP® (Ambion) vorzunehmen.

3.2.14.1 PRÄPARATION VON GESAMT-RNS

Die frisch präparierten, in flüssigem Stickstoff gefrorenen Gehirne, wurden mit vorgekühltem (-80 °C) Mörser und Pistill pulverisiert und pro 100 mg Gehirn in 3 ml TRIZOL® (Invitrogen) aufgenommen. Die RNS-Isolation erfolgte nach dem TRIZOL®-Protokoll des Herstellers.

Die isolierte RNS wurde mit dem RNeasy® Midi Kit (Qiagen) laut Hersteller aufgereinigt. Die extrahierte RNS wurde in RNase-freiem H₂O (Ambion) aufgenommen, die Konzentrationen und Reinheitsgrade (s. 3.2.12) überprüft und bei -80 °C gelagert.

3.2.14.2 DNASE-BEHANDLUNG

RNS, die revers transkribiert werden sollte, durfte keine Spuren von genomischer DNS enthalten, damit Produkte nachfolgender PCR-Reaktionen nur auf die Amplifikation einer cDNS-, nicht aber einer genomischen DNS-Vorlage zurückgeführt werden konnten. Zu 100 – 200 µg RNS wurde 1 µl DNase (2U/µl, Ambion) gegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert.

3.2.14.3 cDNS-SYNTHESE, REVERSE TRANSKRIPTION

(Omniscript® RT Kit, Qiagen)

Pro Ansatz wurden bis zu 2 µg DNase-behandelte RNS eingesetzt. Zusammen mit 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 2 µl eines dNTP-Mixes (jedes dNTP, 5 mM), 2 µl 10 µM Oligo-(dT)-Primer, 1 µl RNase-Inhibitor (RNasin, 10 U/µl) und 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase wurde ein Mastermix angesetzt. Die RNS wurde zunächst 5 min bei 65 °C denaturiert, in einem Eisbad herabgekühlt und anschließend dem Mastermix beigefügt. Das Reaktionsvolumen umfasste insgesamt 20 µl. Das Reaktionsgemisch wurde 60 min bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert. Die cDNS wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. Die für die Kultivierung von Zellen verwendete Plastikware wurde von der Firma Nunc bezogen.

3.3.1 AUFARBEITUNG VON ZELLEN UND ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN

Lösungen:

PBS s. 2.14

Probenpuffer für PAGE s. 2.14

Durchführung: Für die biochemische Analyse von transient transfizierten Zellen (s. 3.3.3), Zellen der Primärzellkultur (s. 3.3.5) bzw. mit Inhibitoren u/o Stimulanzen behandelten Zellen (s. 3.3.2) wurden die Zellkulturüberstände und Zellen getrennt voneinander aufgearbeitet. Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden abgenommen, gesammelt und durch Zentrifugation für 1 h bei 100000 g und 4 °C von abgestorbenen Zellen und Zelltrümmern getrennt. Daraufhin wurden die in den Überständen der Zentrifugation enthaltenen Proteine durch Acetonfällung (s. 3.1.3.2) konzentriert und anschließend mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) untersucht. Die behandelten Zellen wurden einmal mit eisgekühltem PBS gewaschen, abgeschabt und homogenisiert. Zur Abtrennung der Zellkerne wurde das Zelllysat anschließend für 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und ebenfalls mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) untersucht.

3.3.2 BEHANDLUNG VON ZELLEN MIT INHIBITOREN U/O STIMULANZIEN

Lösungen:

Kulturmedium s. 2.2.3

Durchführung: Für die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Inhibitoren wurden Zelllinien (s. 2.2.1) sowie primäre Zellen (s. 3.3.5) verwendet. Die Zellen wurden in einer für die spätere Anwendung adäquaten Zelldichte auf Zellkulturplatten (Nunc) ausgesät und in Kulturmedium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch serumfreies Kulturmedium ersetzt, dem Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt wurden. Nach einer 2-stündigen Inkubation der Zellen in An- bzw. Abwesenheit der Inhibitoren wurden die Zellkulturüberstände und Zellen getrennt voneinander aufgearbeitet (s. 3.3.1). Die Tabellen 2.6 und 2.6.1 geben eine Übersicht über die verwendeten Inhibitoren und Stimulanzen.

3.3.3 TRANSFEKTION VON ZELLINIEN (FuGENE® HD, Roche)

Das Transfektionsreagenz FuGENE® HD eignet sich besonders zur transienten Transfektion von adhären und konfluent gewachsenen Zelllinien. FuGENE® HD hat weder toxischen Eigenschaften noch Einfluss auf die Genregulation (*off-target effects*) der Zellen (Selinger et al., 2005). Zellen wurden nach Angaben des Herstellers wie folgt transfiziert.

Durchführung: Die verwendete Zelllinie wurde in einem geeigneten Zellkulturgefäß bis zu 90 %iger Konfluenz kultiviert. Abhängig von der Größe des Zellkulturgefäßes wurde die zu transfizierende DNS (im Fall von 6-Well Schalen 2 µg DNS) in Basalmedium ohne Zusatzstoffe verdünnt. Anschließend wurde FuGENE® HD zur verdünnten DNS gegeben, ohne die Wand des Reaktionsgefäßes zu berühren. Der Ansatz wurde 10 Sekunden gemischt und anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Der Reaktionsansatz wurde nun zu den Zellen gegeben und minimal 24 Stunden kultiviert. Die Transfektionseffizienz wurde entweder im Immunoblot (s. 3.1.2.3) überprüft oder im Falle von z.B. EGFP-gekoppelten Proteinen im UV-Licht am Mikroskop.

Für HEK-293 und CHO-Zellen hat das vorgeschlagene Verhältnis von Transfektionsreagenz (μl) zu DNS (μg) von 3:2 zu einer Transfektionseffizienz von 80 % geführt. Für Neuroblastomazelllinien wie N2a oder SH-SY5Y hat sich ein Mischungsverhältnis von 8:2 als besonders effektiv herausgestellt.

3.3.4 IMMUNHISTOCHEMIE VON ZELLEN

Lösungen:

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Kulturmedium | s. 2.2.3 |
| PBS | s. 2.14 |
| 4 % Paraformaldehyd (PFA) | 4 % PFA in PBS |
| PBST | 0,3 % Triton® X-100 in PBS |
| Blockierungslösung | 0,1 % BSA in PBST |

Durchführung: Für die immunhistochemische Analyse der Lokalisierung der zytoplasmatischen Domäne des Moleküls L1 und deren Bindungspartner, wurden Zellen der Neuroblastoma-Zelllinien Neuro 2a, SH-SY5Y (s. 2.2.1) sowie primäre Kleinhirnneurone verwendet (s. 3.3.5.2). Zellen der Zelllinien Neuro 2a und SH-SY5Y wurden in einer Zelldichte von 10^5 Zellen / *well* in 6-*well* -Platten (Nunc) auf mit poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Deckgläschen (s. 3.3.5.1) ausgesät und in Kulturmedium kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch serumfreies Kulturmedium ersetzt und die Zellen nach weiteren 24 h für 1 h bei RT mit 4 % PFA fixiert. Rückstände des Paraformaldehyds wurden im Anschluss durch drei Waschschrte mit PBS à 10 min entfernt. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen durch eine 60-minütige Inkubation der Zellen bei RT mit Blockierungslösung wurde eine Inkubation der Zellen mit dem/den primären Antikörper/n in Antikörper-abhängigen Konzentrationen (s. Tab. 2.14) ü. N. bei 4 °C angeschlossen. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal mit PBS à 10 min gewaschen und für maximal 1 h bei RT und in Abwesenheit von Licht mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Zweitantikörper/n in einer Verdünnung von 1:500 in PBS inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten à 10 min mit PBS wurden die Zellen mit Aqua Poly / Mount Medium (Polysciences) eingebettet. Die in diesen Versuchen

verwendete Sekundärantikörper wurde von Dianova bezogen (s. Tab. 2.15). Die Lagerung der Präparate erfolgte im Dunkeln bei 4 °C.

3.3.4.1 FÄRBUNG VON *PARASPECKLES* (Fox et al., 2002)

Lösungen:

| | |
|------------|---|
| CSK-Puffer | 10 mM PIPES, pH 6,8 10 mM NaCl 300 mM Saccharose 3 mM MgCl ₂ 2 mM EDTA |
| 3,7 % PFA | 3,7 % PFA (w/v) in CSK-Puffer |

Durchführung: Kleinhirnneurone wurden auf PLL-beschichteten Deckgläschen für mindestens 24 Stunden kultiviert und mit 3,7 %iger Paraformaldehydlösung in CSK-Puffer für nicht länger als 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Das *Paraspeckle Protein 1* ist ein Marker für *Paraspeckles* und wurde mit dem Antikörper PSP1 (s. Tab. 2.14) detektiert.

3.3.5 PRIMÄRZELLKULTUR

3.3.5.1 BESCHICHTUNG VON OBERFLÄCHEN MIT POLY-L-LYSIN (PLL)

Lösungen:

| | |
|---------------------|----------------------|
| PBS | s. 2.14 |
| poly-L-Lysin-Lösung | 0,01 % PLL ad PBS |

Durchführung: Zur Beschichtung von Zellkulturplatten wurden diese mit sterilfiltrierter poly-L-Lysin (PLL)-Lösung (0,01% PLL in PBS) bei 4 °C über Nacht oder für mindestens 120 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Platten wurden zweimal vorsichtig

Kapitel 3 Methoden

mit sterilem dH₂O gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur unter UV-Licht getrocknet. Die beschichteten Zellkulturplatten wurden bis zur Benutzung steril gelagert.

Deckgläschen wurden zuerst mit Aceton in einem Erlenmeyerkolben über Nacht bei 4 °C entfettet, danach dreimal mit dH₂O für jeweils 5 min inkubiert, um überschüssiges Aceton zu entfernen, anschließend 30 min mit 3 M HCl Lösung aufgeraut, dann zweimal mit dH₂O sowie zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, zwei Stunden bei 160 °C sterilisiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Danach wurden die Deckgläschen mit PLL beschichtet. Dafür wurde PLL 0,01 %ig in dH₂O gelöst und steril filtriert.

Die Deckgläschen wurden mit dieser Lösung bedeckt und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die PLL-Lösung wurde abgenommen, die Deckgläschen zweimal mit sterilem dH₂O gewaschen und unter dem UV-Licht der sterilen Werkbank getrocknet und unter sterilen Bedingungen aufbewahrt.

3.3.5.2 EINZELZELKULTUREN VON KLEINHIRNNEURONEN

Lösungen:

| | |
|------------------------|--|
| Medium X-1 | MEM 1 x Penicillin / Streptomycin 100 x 0,1 % BSA 10 µg/ml Insulin 4 nM L-Thyroxin 100 µg/ml Transferrin 0,027 TIU/ml Aprotinin 30 nM Natriumselenit 1 x Natriumpyruvat 1 x L-Glutamin 10 % Fötale Kälberserum |
| Trypsin/DNase I-Lösung | 0,2 g Trypsin 20 mg DNase I |

Kapitel 3 Methoden

200 µl 80 mM MgCl₂, pH 7,8

ad 20 ml HBSS

DNase I-Lösung

10 mg DNase I

50 mg Glucose

ad 20 ml MEM

Durchführung: Für die Präparation und Kultivierung von Kleinhirneuronen wurden 6 - 8 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Präparation des Kleinhirns wurde auf Eis durchgeführt. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekaptierung. Das Gehirn wurde entnommen und das Kleinhirn präpariert. Nach Überführen des Kleinhirns in eiskalte HBSS-Lösung wurden unter zu Hilfenahme eines Stereomikroskopes assoziierte Blutgefäße und die Hirnhaut des Organs entfernt, das Kleinhirn in neue HBSS-Lösung aufgenommen und mit einer Schere in drei Stücke geteilt. Die Gewebestücke wurden einmal mit HBSS gewaschen (5 ml HBSS / drei Kleinhirne). Nach Abnahme der HBSS-Lösung wurde den Kleinhirnstücken Trypsin/DNase I-Lösung (1 ml / drei Kleinhirne) hinzugefügt und nach einer 15-minütigen Inkubationszeit erneut drei Waschschriffe mit HBSS-Lösung angeschlossen. Nach Zugabe von DNase I-Lösung (1 ml / drei Kleinhirne) wurden die Gewebestücke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer abgerundeten Glaspasteurpipette mit abnehmendem Durchmesser homogenisiert. Der Zellsuspension wurden 5 ml HBSS-Lösung hinzugefügt, der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 100 g und 4 °C die Zellen sedimentiert. Kommt es nach der Inkubation der Zellsuspension auf Eis zu einer Sedimentation von Gewebestücken, ist eine erneute Homogenisation mit Glaspasteurpipetten erforderlich. Nach der Zentrifugation wurde der resultierende Überstand vorsichtig abgenommen und die Kleinhirneuronen in Medium X1 (5ml / 3 Kleinhirne) mit einer Temperatur von 37 °C resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 10⁶ Zellen / ml ausgesät. Zur Analyse der Kernlokalisierung des Proteins L1 in Kleinhirneuronen wurden sowohl Immunhistochemie (s. 3.3.4) als auch Stimulationsexperimente mit anschließender Zellfraktionierung durchgeführt (s. 3.3.1). Fraktionen wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2.3) untersucht.

Kapitel 4 ERGEBNISSE

4.1 DAS ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL L1 TRANSLOZIERT IN DEN ZELLKERN

Um die Kernlokalisierung von L1 zu untersuchen, wurden primäre Kleinhirnneurone sowie neuronale Zelllinien die L1 endogen exprimieren mit einem Antikörper (L1-172R) gegen die intrazelluläre Domäne von L1 (L1-ID) immunhistochemisch angefärbt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine gezielte und spezifische Stimulation von L1 durch den monoklonalen Antikörper L1-557, der L1-abhängiges Neuritenwachstum und die Endozytose von L1 stimuliert (Appel et al., 1995) in Kleinhirnneuronen die Kernlokalisierung von L1 stimuliert.

4.1.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER L1-KERNLOKALISIERUNG IN PRIMÄREN KLEINHIRNNEURONEN

Die Abbildung 4.1 A zeigt primäre Kleinhirnneurone, welche für 24 h auf PLL-beschichteten Glasplättchen unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden. Die Zellen in der oberen Zeile wurden mit dem Antikörper L1-557 für eine Stunde stimuliert, während die Zellen in der unteren Zeile unstimuliert sind. Die Abbildungen links zeigen jeweils in grün die Zellen, die mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von L1 (L1-ID) immunhistochemisch gefärbt sind. Die Abbildungen in der Mitte zeigen in einem vergrößerten Bildausschnitt den Zellkern eines Neurons. Rechts ist jeweils eine Überlagerung von L1-Färbung und Kernmarker dargestellt.

Die mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersuchten Kleinhirnneurone zeigen im unstimulierten Zustand hauptsächlich eine zytoplasmatische L1-Verteilung wie auch ein schwaches nukleäres Signal (Pfeil C).

Die Stimulation von L1 durch den Antikörper L1-557 führt zu einer deutlichen Zunahme von L1 im Zellkern (Pfeil A), verglichen mit den unstimulierten Zellen (Pfeil C). In den stimulierten Zellen sind Bereiche im Zellkern sichtbar, die auch nach Stimulation L1-negativ sind (Pfeile B).

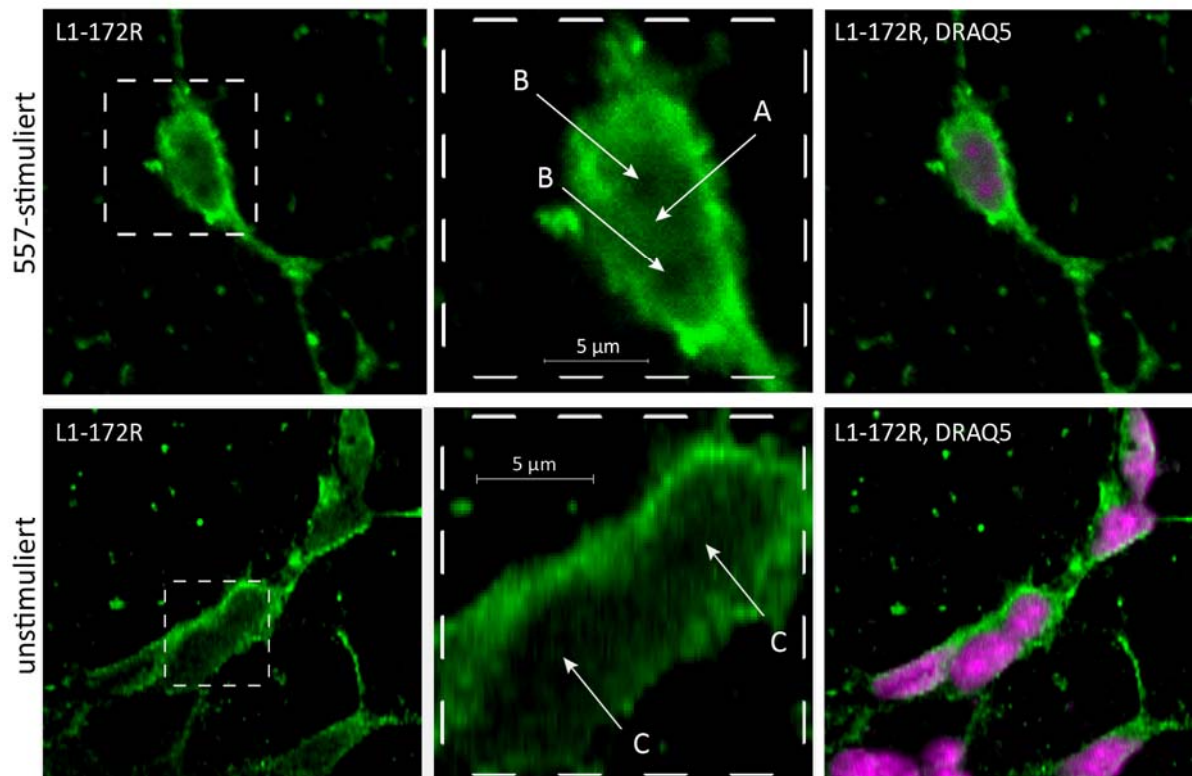


Abbildung 4.1: Immunhistochemische Analyse der L1-ID Kernlokalisierung in unstimulierten und antikörperstimulierten Kleinhirnneuronen.

Kleinhirnneurone wurden mit dem Antikörper L1-172R unter serumfreien Bedingungen immunhistochemisch gefärbt. DRAQ5 wurde als Kernmarker eingesetzt. Zur Stimulation wurde der Antikörper L1-557 eingesetzt (50 µg/ml). Unter stimulierten Bedingungen ist L1 deutlich im Zellkern detektierbar (Pfeil A). Bei den L1-negativen Subkompartimenten im Zellkern (Pfeile B) kann es sich um Nukleoli handeln. Unstimulierte Neurone zeigen eine schwache L1-Kernlokalisierung (Pfeile C).

4.1.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER L1-KERNLOKALISIERUNG IN ZELLINIEN

Um die Frage zu klären, ob das Zelladhäsionsmolekül L1 in Zelllinien im Zellkern lokalisiert ist, wurden murine Neuro-2a (N2a) Zellen mit dem Antikörper L1-2c2 gegen die L1-ID immunhistochemisch gefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert.

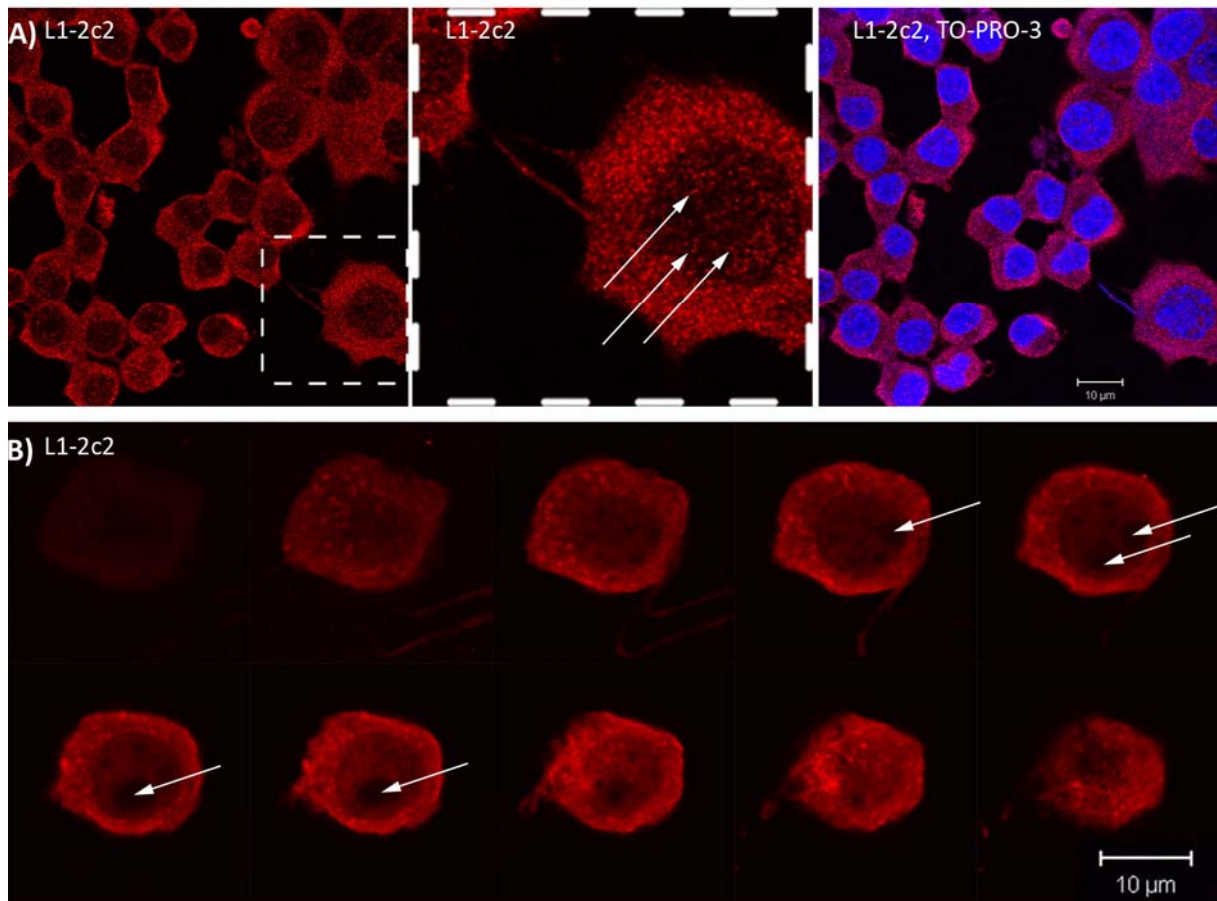


Abbildung 4.2: Immunhistochemische Untersuchung der L1-Verteilung in N2a-Zellen unter Verwendung des Antikörpers L1-2C2.

A) Die N2a-Zellen wurden auf PLL-beschichteten Deckgläschen kultiviert und mit dem Antikörper L1-2c2 inkubiert. Zu sehen sind punktförmige Signale im Zytosol sowie im Zellkern. Diese sind in der Vergrößerung (Mitte) deutlich zu sehen (siehe Pfeile). Der Zellkernmarker TO-PRO®-3 zeigt in einer Überlagerung die Lage des Zellkerns (rechts). **B)** Ein Blick durch eine N2a-Zelle samt Zellkern in zehn Ebenen. Die Zelle ist mit dem Antikörper L1-2c2 gegen die L1-ID gefärbt. Zytosolisches und nukleäres L1 sind deutlich zu erkennen. L1-ID negative Strukturen im Zellekern sind mit Pfeilen hervorgehoben.

In der Abbildung 4.2 A sind N2a-Zellen in einer optischen Ebene zu sehen, die den Zellkern und umgebenes Zytosol zeigt. In Abb. 4.2 ist die L1-ID Färbung in rot zu sehen. Die stärkste Signalintensität geht vom Zytosol aus, in welchem eine deutlich punktierte, auf Vesikel hindeutende, L1-Verteilung zu sehen ist. Weiterhin ist eine deutliche punktförmige Kernlokalisierung von L1 sichtbar, welche im mittleren Bild der Abb. 4.2 A in einem vergrößerten Ausschnitt dargestellt und durch Pfeile hervorgehoben ist. Die Zellkerne der gefärbten Zellen sind in einer Überlagerung der Bilder A und B zur Verdeutlichung, dass L1 im Nukleus lokalisiert ist, blau dargestellt.

Das Bild B der Abbildung 4.2 zeigt einen Blick durch eine mit dem Antikörper L1-2c2 (in rot) gefärbten N2a-Zelle in zehn Ebenen. Diese Darstellung verdeutlicht die L1 Verteilung, insbesondere die L1-Kernlokalisierung. Darüber hinaus werden auch in N2a-Zellen abgegrenzte Bereiche im Zellkern sichtbar, die L1-negativ sind. Bei diesen Substrukturen im Zellkern handelt es sich höchstwahrscheinlich um Nucleoli (siehe Pfeile).

Diese immunhistochemischen Analysen konnten eine deutliche Kernlokalisierung der L1-ID zeigen. Als Negativkontrolle wurden Zellen unter identischen Bedingungen ausschließlich mit den Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Unter diesen Kontrollbedingungen wurde keine Immunfluoreszenz gesehen (Ergebnis nicht gezeigt).

Immunhistochemische L1-ID Färbungen an N2a-Zellen und primären Kleinhirnneuronen zeigen, dass L1 im Zellkern vorliegt. Die Verwendung der Antikörper L1-172R und L1-2c2, die beide gegen die intrazelluläre Domäne von L1 gerichtet sind, zeigen die gleiche Verteilung von L1 in den untersuchten Zelltypen. Es kann aber keine Aussage darüber gemacht werden, in welcher Form L1 im Zellkern vorliegt.

In N2a-Zellen ist die Menge an L1-ID im Zellkern höher als in unstimulierten Neuronen. Antikörperstimulation mit L1-557 resultiert in einer vermehrten L1-Kernlokalisierung. Diese Beobachtung spricht dafür, dass es einen konstitutiven, sowie einen stimulierbaren Weg gibt, über den L1 in den Zellkern gelangt.

4.2 ANALYSE DER L1-KERNLOKALISATION

Um eine Aussage darüber machen zu können, in welcher Form L1 in den Zellkern gelangt, wurden unterschiedliche Gehirnfractionen und Gehirnregionen biochemisch im Immunblot analysiert. Ziel der Versuche war, herauszufinden, ob es unterschiedlich prozessierte L1-Formen in den untersuchten Fraktionen gibt, und welche im Zellkern detektierbar sind. Durch den Einsatz von verschiedenen L1-Antikörpern soll weitergehend die Frage geklärt werden, ob ausschließlich die L1-ID in den Zellkern transloziert oder auch andere Schnittformen. Zwei Antikörper gegen unterschiedliche L1-Epitope wurden für die Untersuchungen verwendet: Der Antikörper L1-172R erkennt die L1-ID, der Antikörper L1-557 bindet in der dritten Fn-3 Domänen.

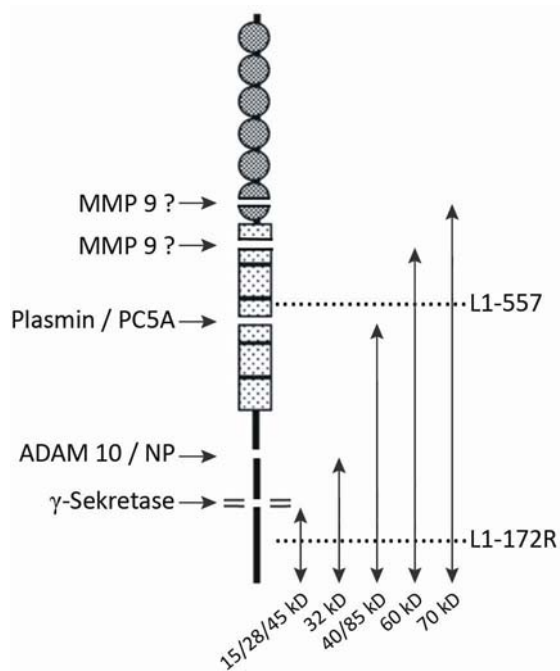


Abbildung 4.3: Carboxyterminale L1-Fragmente nach proteolytischer Prozessierung.

Dargestellt sind die carboxyterminalen L1-Fragmente, welche im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R detektiert werden können. Die carboxyterminalen Fragmente nach γ -Sekretase- und PC5A-Schnitt laufen im SDS-Gel auf mehreren Höhen: (15/28/45 kDa) und (40/85 kDa). Die Epitope der Antikörper L1-557 (3. Fn-3 Domäne) und L1-172R (L1-ID) sind durch die gepunkteten Linien markiert. Abkürzungen: ADAM *A disintegrin and metalloprotease*, NP Neuropsin, PC5A Prohormonkonvertase 5 A, MMP9 Matrix-Metalloprotease 9

4.2.1 BIOCHEMISCHE ANALYSE DER L1-KERNLOKALISATION IN GEHIRNREGIONEN

Zunächst wurden Gehirnfractionen aus 7 Tage alten Wildtyp-Mäusen isoliert. Abbildung 4.4 Bild A zeigt einen Immunblot mit dem Antikörper L1-172R. Gezeigt sind Gesamt-Gehirnhomogenat, Vesikelfraktion und Kernfraktion. Im Gesamt-Gehirnhomogenat sind die L1-Banden mit den Molekulargewichten 200 kDa und 80 kDa vorherrschend. L1 mit dem Molekulargewicht von 200 kDa ist die Form mit der vollen Länge; carboxyterminal detektiertes L1-80 kDa korrespondiert mit dem L1-Stumpf nach proteolytischer Spaltung der Prohormonkonvertase PC5A in der dritten Fn-3 Domäne (Kalus et al., 2003).

Die Vesikelfraktion zeigt ein Bandenmuster mit L1-200 und L1-80 sowie kleinere Schnittformen wie L1-70, L1-60, L1-45, L1-20 und L1-15.

In der Kernfraktion sind L1-Banden mit den Molekulargewichten 70 kDa, 32 kDa und 28 kDa am intensivsten. Diese L1-Formen werden für folgende Experimente und Diskussion von großer Wichtigkeit sein. Die Entstehung der carboxyterminalen L1-70 kDa Form ist nicht geklärt. Die Bande L1-32 kDa ist in der Literatur als L1-Stumpf nach *ectodomain shedding* durch die Proteasen ADAM10 und ADAM17 (Maretzky et al., 2005; Kalus et al., 2006) beschrieben. L1-28 ist die lösliche L1-ID nach Prozessierung des Stumpfes L1-32 durch die γ -Sekretase (s. 4.2.4.1 und 4.2.4) (Riedle et al., 2009).

Kapitel 4 Ergebnisse

Durch die große Zahl an L1-Banden wird deutlich, im welchem Umfang L1 im Gehirn proteolytisch prozessiert und modifiziert wird.

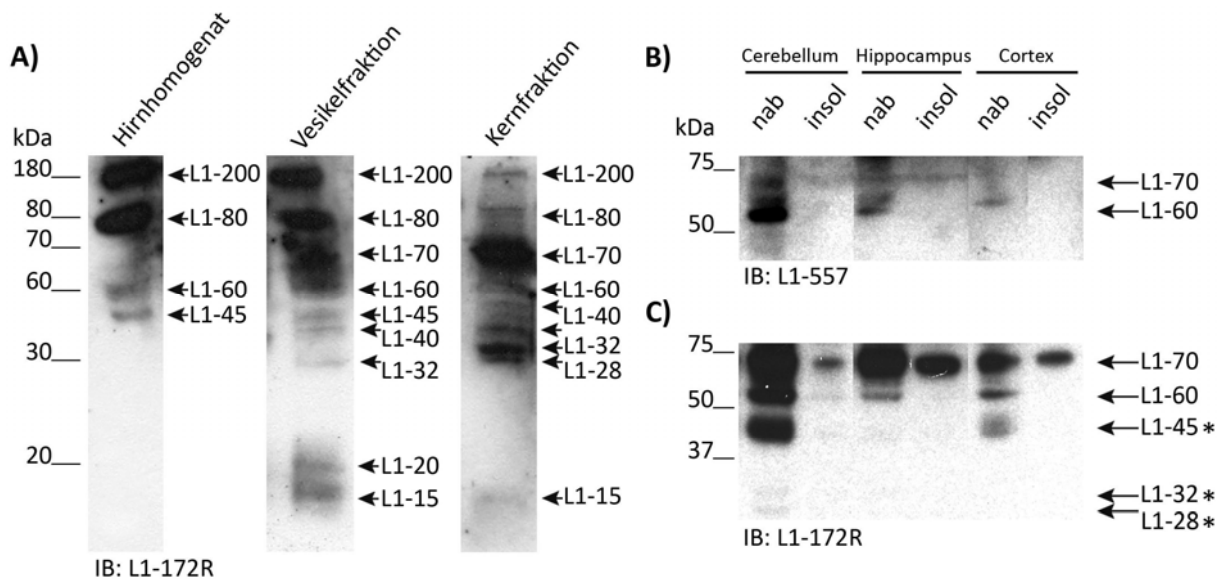


Abbildung 4.4: Welche proteolytischen Spaltprodukte von L1 gibt es – und welche sind im Zellkern?

A) Gesamt-Gehirnhomogenat, Vesikelfraktion und Kernfraktion aus 7 Tage alten Wt-Mäusen wurden im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R analysiert. Gezeigt sind. Im Gesamtgehirnhomogenat sind die Formen L1-200 und L1-80 am stärksten vertreten. Die Vesikelfraktion enthält L1-200 und L1-80 sowie weitere prozessierte L1-Formen, welche auch in der Kernfraktion detektierbar sind (L1-70, L1-30, L1-28 und L1-15).

B) und C) Kernfraktionen aus Cerebellum, Hippocampus und Cortex einer 7 Tage alten Wt-Maus. Die Präparation erfolgte mittels Qproteome™ Nuclear Protein Kit (Qiagen). Im Immunblot sind identische Mengen Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. B) Immunblot mit dem Antikörper L1-557. C) Immunblot mit dem Antikörper L1-172R. Die Banden wurden aus einem Blot zusammengestellt. Die L1-Banden sind durch Pfeile markiert. In allen nukleoplasmatischen Fraktionen aus Gehirnregionen kann L1 nachgewiesen werden. Die Formen L1-70 und L1-60 sind mit den Antikörpern L1-557 sowie L1-172R detektierbar. Das bedeutet, die Fragmente beinhalten die L1-ID und einen extrazellulären Bereich. L1-45, L1-32 und L1-28 sind nur mit dem Antikörper L1-172R detektierbar (*).

Dieser Vergleich von Gehirnfractionen zeigt, dass die Hauptformen von L1 wie sie im Gesamt-Gehirnhomogenat zu sehen sind nicht im Zellkern vorliegen. Desweiteren gibt es die Schnittmenge der Banden L1-70, L1-60, L1-40, L1-32 und L1-15 im Zellkern und in Vesikeln.

In Bild B und C der Abbildung 4.4 sind Immunblots der nukleoplasmatischen (nab) und DNS-gebundenen (insol) Kernproteine aus den Gehirnregionen Cerebellum, Hippocampus und Cortex gezeigt, welche mit den Antikörpern L1-557 in B und L1-172R in C untersucht wurden. Die Blots zeigen, dass sowohl mit dem Antikörper gegen die L1-ID (L1-172R) als auch mit dem Antikörper L1-557 gegen die dritte Fn-3 Domäne insbesondere die Bande L1-60 im Zellkern detektierbar ist. Mit dem Antikörper L1-557 ist in allen untersuchten

Gehirnregionen L1-60 in den nukleoplasmatischen Fraktionen (nab) detektierbar. Geringe Mengen L1-70 sind in der nukleoplasmatischen Fraktion aus Kleinhirn zu detektieren.

Der L1-172R detektiert die Banden mit den Molekulargewichten von 70 kDa und 60 kDa im Nukleoplasma, sowie L1-70 in der Fraktion der DNS-assoziierten Proteine. Im Cerebellum als auch im Cortex ist eine Bande L1-45 detektierbar. Allein in der Fraktion des Kleinhirns sind die L1-Formen 32 kDa und 28 kDa schwach zu erkennen.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass nicht ausschließlich die intrazelluläre Domäne von L1 in den Zellkern transloziert (L1-28/L1-45), sondern auch größere Fragmente einschließlich Transmembrandomäne und extrazellulären Domänen (L1-60 und L1-70).

4.2.2 BIOCHEMISCHE ANALYSE DER L1-KERNLOKALISATION IN KLEINHIRNNEURONEN

Die immunhistochemische Färbung der L1-ID in Kleinhirnneuronen (siehe 4.1.1) zeigte eine schwache L1-Kernlokalisierung, welche konstitutiv ohne Stimulation vorliegt. L1 im Zellkern von Kleinhirnneuronen soll durch Immunblots mit Kernfraktionen näher untersucht werden.

In der Abbildung 4.5 ist eine Fraktionierung von Kleinhirnneuronen dargestellt.

Kleinhirnneurone (5×10^7 Zellen) wurden auf PLL für 48 h kultiviert und anschließend mit dem *Qproteome Nuclear Protein Kit* fraktioniert. Die Fraktionen wurden im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R analysiert. In der Nicht-Kern-Fraktion (cyto) sind Volllänge-L1 (L1-200) und L1-80 kDa zu sehen. In der nukleoplasmatischen Fraktion (nab) sind die Banden L1-70, L1-32 (als Doppelbande) und L1-28 detektierbar. Nach längerer Expositionszeit wird in der Fraktion mit DNS-assoziierten Proteinen (insol) eine Bande L1-15 kDa sichtbar.

Kapitel 4 Ergebnisse

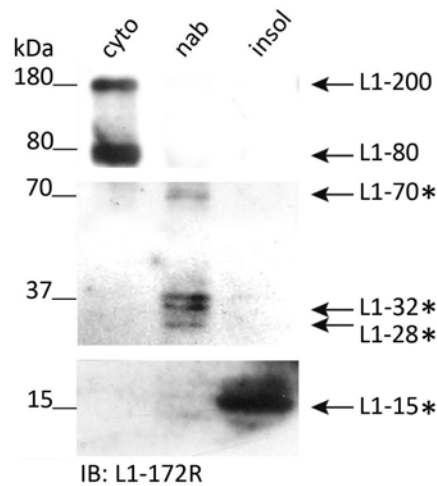


Abbildung 4.5: Biochemische Analyse der L1-Kernlokalisierung in Kleinhirnneuronen.

Kleinhirnneurone (5×10^7 Zellen) wurden auf PLL für 48 h kultiviert und anschließend mit dem Qproteome™ Nuclear Protein Kit (Qiagen) fraktioniert. Die Fraktionen wurden im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R analysiert. Die Bereiche des Blots im Molekulargewicht von 70-30 kDa und 15 kDa wurden länger entwickelt und sind separat gezeigt. L1 liegt im Nukleoplasma in den Formen L1-70, L1-32 und L1-28 vor. DNS-gebunden ist ausschließlich die Form L1-15 (*= L1-Formen im Zellkern).

4.2.3 STIMULATION VON KLEINHIRNNEURONEN MIT L1-557 UND DESSEN EINFLUSS AUF DEN L1-KERNIMPORT

Wie bereits in Abbildung 4.1 gezeigt führt eine Stimulation von Kleinhirnneuronen mit dem Antikörper L1-557 zu einer vermehrten L1-Kernlokalisierung. Dieser Effekt soll nun im Immunblot weiter untersucht werden. In diesem Versuch soll geklärt werden, ob die Stimulation mit L1-557 an primären Kleinhirnneuronen einen Einfluss auf die Kernlokalisierung von L1 ausübt und welche L1-Formen von diesem Effekt betroffen sind.

Zu diesem Zweck wurden dissoziierte Kleinhirnneurone auf PLL-Substrat für 24 h ausgesät und unter serumfreien Bedingungen mit dem Antikörper L1-577 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für eine Stunde stimuliert. Als Kontrollen wurde ein Ansatz nicht stimuliert, ein anderer mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aufgereinigten unspezifischen Ratten-IgGs behandelt. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R analysiert.

Kapitel 4 Ergebnisse

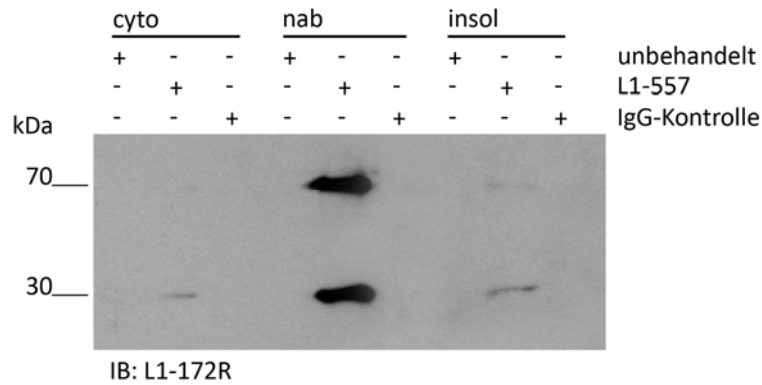


Abbildung 4.6: Untersuchung des Einflusses von L1-557 auf den L1-Kernimport in Kleinhirnneuronen.

Primäre Kleinhirnneurone (1×10^7 Zellen) wurden für 24 h auf PLL kultiviert und unter serumfreien Bedingungen mit dem Antikörper L1-557 ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$) für eine Stunde stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen nicht oder mit aufgereinigten, unspezifischen Ratten-IgGs ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$) stimuliert, dann mit dem Qproteome™ Nuclear Protein Kit (Qiagen) fraktioniert. Im Immunblot wurden identische Mengen Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper L1-172R. Die Formen L1-70 und L1-32 sind nach Stimulation vermehrt in der nukleoplasmatischen Kernfraktion (nab) von Kleinhirnneuronen detektierbar.

Ein exemplarisches Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Diese zeigt einen starken positiven Einfluss auf den L1-Kernimport. Besonders in der nukleoplasmatischen Kernfraktion (nab) ist ein starker Anstieg der L1-Konzentration zu verzeichnen. Es sind zwei Banden mit dem Antikörper L1-172R nach L1-557 Stimulation im Zellkern akkumuliert: Die Formen L1-70 und L1-32. Bei dem in Abbildung 4.6 gezeigten Immunblot betrug die Entwicklungszeit des Films nur 10 Minuten, nach längerer Expositionszeit werden auch in den Nicht-Kern-Fractionen (cyto) die Banden L1-200 und L1-80 und DNS-assoziierten Fractionen (insol) die Bande L1-15 sichtbar. Diese Tatsache unterstreicht nachhaltig, wie effektiv sich die Stimulation mit L1-557 auf den L1-Kernimport auswirkt. Die Behandlung der Zellen mit unspezifischen Ratten-IgGs zeigt keinen Effekt auf den L1-Kernimport. Dies ist ein Ausschlusskriterium für ein falsch-positives Ergebnis, welches durch eine Kreuzreaktion des L1-557 Antikörpers aus Ratte mit dem murinen L1-172R denkbar gewesen wäre.

4.2.4 EINFLUSS DER PROTEASE-INHIBITOREN DAPT UND GM6001 AUF DEN L1-KERNIMPORT

Nachdem in den Kapiteln 4.1.1 und 4.2.3 der stimulierende Einfluss von L1-557 auf den Kernimport von L1 gezeigt werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob Metalloproteasen (z.B. ADAMs), die γ -Sekretase oder Serin-Proteasen einen Einfluss auf die Generierung der proteolytischen Schnittformen L1-70 und L1-32 haben.

Zu diesem Zweck wurden dissoziierte Kleinhirnneurone auf PLL-Substrat für 24 h ausgesät und unter serumfreien Bedingungen mit den Inhibitoren DAPT, GM6001 und Aprotinin für zwei Stunden behandelt und anschließend mit dem Antikörper L1-577 (50 μ g/ml) für eine Stunde stimuliert. Als Kontrolle wurde ein Ansatz nicht stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Zellen auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit dem Kernfraktionierungskit *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) prozessiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R analysiert.

Die Abbildung 4.7 A zeigt nukleoplasmatische Kernfraktionen (nab). Der starke Effekt der L1-557 Stimulation auf den L1-Kernimport ist im Vergleich von unstimulierten zu stimulierten Neuronen deutlich zu sehen. In den Abbildungen 4.7 A und C zeigt der Einsatz des γ -Sekretase Inhibitors DAPT eine Akkumulation der Bande L1-70 im Nukleoplasma nach 557-Stimulation. Der gleiche Effekt ist bei Einsatz von GM6001 in Abbildung 4.7 A deutlich zu sehen. Aprotinin zeigt einen reduzierenden Einfluss auf die Bande L1-70 im Zellkern. Um den Einfluss der Inhibitoren DAPT und GM6001 zu verdeutlichen, ist in Abbildung 4.7 B eine densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten gezeigt. Diese visualisiert die Akkumulation von L1-70 durch DAPT und GM6001 auf die Bande L1-70 kDa im Zellkern. Das Ergebnis eines weiteren Versuchs ist in Abbildung 4.7 C dargestellt. Gezeigt ist ein Immunblot der nukleoplasmatischen (nab) und DNS-assoziierte Proteinfractionen (insol) von DAPT und GM6001 behandelten und mit L1-557 stimulierten Kleinhirnneuronen. Hier wird deutlich, dass DAPT zu einem Anstieg der Menge von L1-70 und L1-32 führt bei gleichzeitiger Verringerung der Bande L1-28. Die Inhibition von ADAM10 durch GM6001 führt zu einer reduzierten Entstehung des Stumpfes L1-32, was die Reduktion von L1-28 mit sich zieht.

Kapitel 4 Ergebnisse

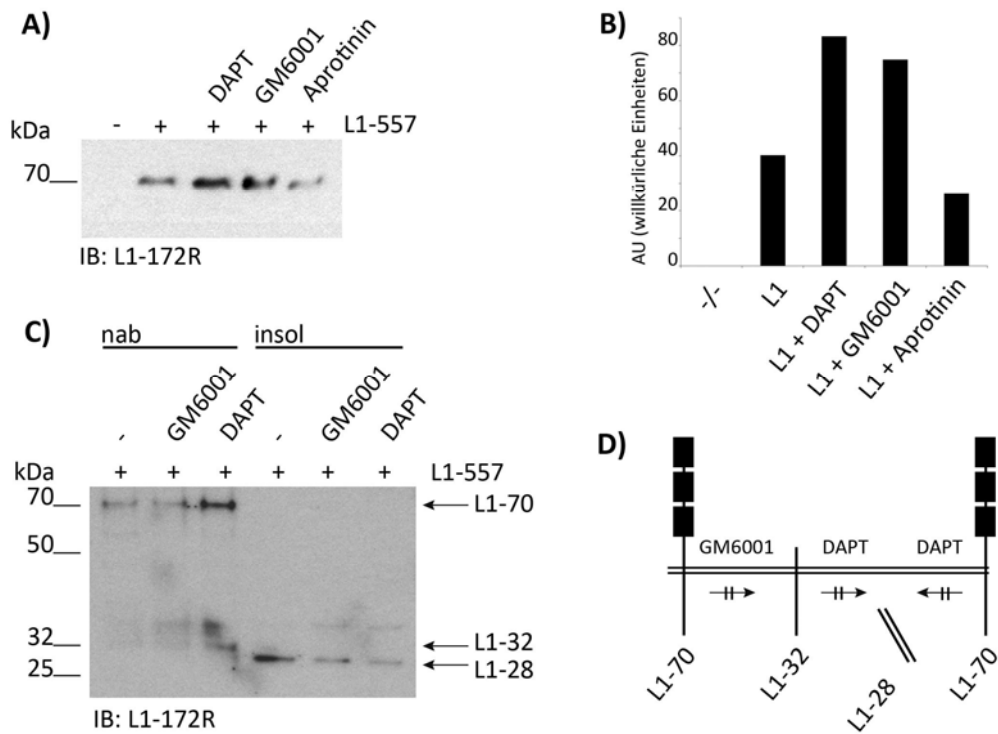


Abbildung 4.7: Einfluss von DAPT und GM6001 auf den L1-Kernimport.

A) Primäre Kleinhirnnurone (1×10^7 Zellen) wurden für 24 h auf PLL kultiviert und unter serumfreien Bedingungen mit den Inhibitoren GM6001, DAPT und Aprotinin inkubiert und dann mit dem Antikörper L1-557 (50 $\mu\text{g/ml}$) für eine Stunde stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) fraktioniert. Im Immunblot wurden identische Mengen Gesamtprotein der nukleoplasmatischen Fraktion (nab) pro Spur aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper L1-172R. **B)** Densitometrische Auswertung der Bande L1-70 kDa dargestellt in A). Die Inhibitoren DAPT und GM6001 führen zu einer mengenmäßigen Verdoppelung der Bande L1-70. Aprotinin hat keinen Einfluss auf L1-70 im Zellkern. **C)** Mit L1-557 stimulierte Kleinhirnnurone in An- und Abwesenheit der Inhibitoren GM6001 und DAPT. Die Zellen wurden mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) präpariert. Im Immunblot wurden identische Mengen Gesamtprotein der Kernfraktionen „nab“ und „insol“ pro Spur aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper L1-172R. **D)** Extrazelluläre Fn-3 Domänen von L1 sind als schwarze Rechtecke dargestellt. Die durchgestrichenen Pfeile bedeuten eine Unterdrückung der Entstehung von proteolytischen Spaltprodukten. Einfluss der Inhibitoren GM6001 und DAPT auf die L1-Prozessierung im Zellkern. GM6001 inhibiert die Generierung des Fragments L1-32, was zu einer Akkumulation des Substrats L1-70 führt. Die Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT bewirkt die Akkumulation von L1-70 und L1-32 und verhindert die Entstehung des Fragments L1-28.

Das Schema in Abbildung 4.7 D verdeutlicht die Zusammenhänge der Proteasen GM6001 und DAPT auf die Entstehung der Fragmente L1-32 und L1-28. Die Substrate L1-FL und L1-70 werden von ADAM10, unter Entstehung des Stumpfs L1-32, prozessiert. GM6001 inhibiert die Entstehung des Stumpfs L1-32 – das Substrat L1-70 akkumuliert. L1-32 sowie L1-70 ist das Substrat der γ -Sekretase, welche durch den Inhibitor DAPT blockiert wird. Dies hat die Akkumulation der Substrate L1-70 und L1-32 zur Folge bei gleichzeitiger Reduzierung des Produkts L1-28.

4.2.5 STIMULATION VON ZELLEN UND KERNIMPORT VON L1

In den im Folgenden beschriebenen Versuchen sollte der Frage nachgegangen werden, ob der Kernimport von L1 stimulierbar oder auch inhibierbar ist. Zu diesem Zweck wurden Ionomycin, Glutamat sowie der Antikörper L1-557 zur Stimulation von neuronalen Zelllinien und primären Kleinhirnneuronen verwendet. Der inhibitorische Einfluss von Protease-Inhibitoren wie GM6001 und DAPT sowie eine mögliche Inhibition des L1-Kernexportes durch Leptomycin B wurde ebenfalls untersucht.

4.2.5.1 EINFLUSS VON IONOMYCIN AUF DIE L1-PROZESSIERUNG

Ionomycin ist ein Ionophor, welches von *Streptomyces conglobatus* gebildet wird. Es bewirkt einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, welcher mit erhöhter Endozytose von Oberflächenproteinen einhergeht (Maretzky et al., 2005; Stoeck et al., 2006a). Da von diesem Effekt auch L1 betroffen ist, soll der Einfluss von Ionomycin auf die L1-Prozessierung und den Kernimport von L1 untersucht werden.

HEK-Zellen wurden mit der neuronalen L1-Form transfiziert und unter serumfreien Bedingungen mit Ionomycin oder gleichem Volumen DMSO stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen, 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, das 1000 g-Sediment mit Detergens solubilisiert und mit dem Antikörper L1-172R analysiert. Der in Abbildung 4.8 A dargestellte Immunblot zeigt L1-32 in unstimulierten, wie in stimulierten Zellen, in welchen die Form L1-28 auftritt. Dieser Versuch macht deutlich, dass es in den transfizierten HEK-Zellen zur konstitutiven Prozessierung von L1 gekommen ist, da in der unstimulierten Kontrolle ebenfalls das proteolytische L1-Fragment L1-32 zu sehen ist. Die Stimulation mit Ionomycin bewirkt, dass die Bande L1-28 vermehrt gebildet wird.

Die Abbildung 4.8 B zeigt einen Immunblot von nukleoplasmatischen Kernfraktionen aus SH-SY5Y Zellen nach Ionomycin-Stimulation in An- und Abwesenheit von DAPT und MG132. Die Zellen wurden im serumfreien Medium für zwei Stunden mit den Inhibitoren inkubiert und im Anschluss mit 1 μ M Ionomycin für 30 Minuten stimuliert und fraktioniert. Die Kernfraktionen wurden im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R analysiert. Es konnte durch Ionomycin keine Stimulation der L1-Kernlokalisierung gezeigt werden. Die Menge an L1-32 im Nukleoplasma, wird nach Ionomycin-Behandlung etwas weniger. Das Ergebnis zeigt

Kapitel 4 Ergebnisse

allerdings eindeutig, dass der γ -Sekretase Inhibitor DAPT die Entstehung der Bande L1-28 in der Kernfraktion verhindert. Die Inhibierung der Proteaseaktivität des Proteasoms führt zu keiner Akkumulation von L1 im Zellkern.

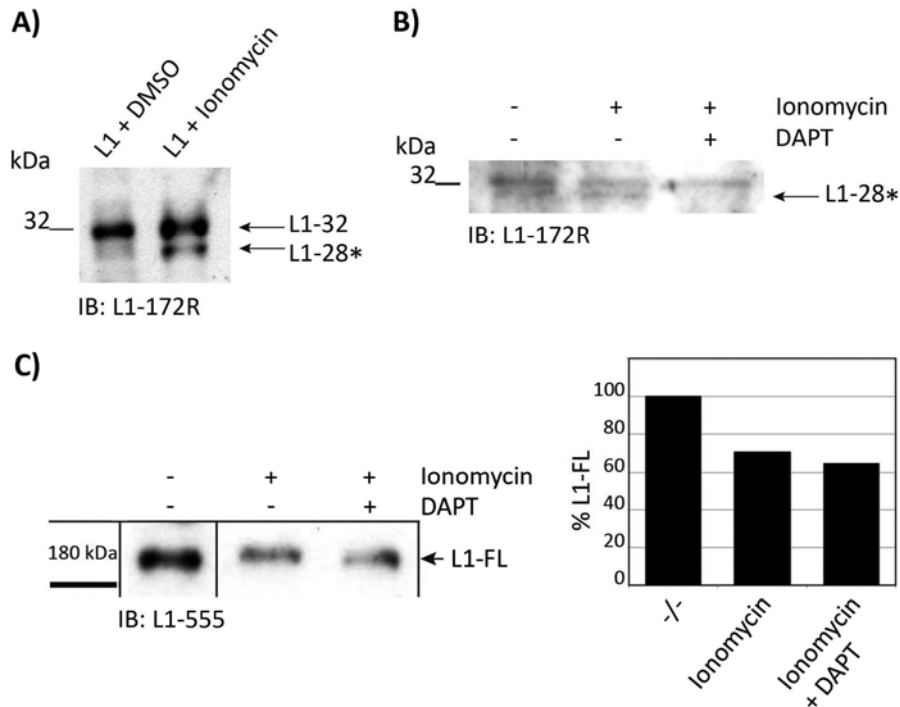


Abbildung 4.8: Einfluss von Ionomycin auf die L1-Prozessierung und Kernlokalisierung.

A) Mit L1 transfizierte HEK Zellen wurden mit 1 μ M Ionomycin in DMSO oder mit DMSO inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen, 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, das 1000 g-Sediment mit Detergens solubilisiert und mit dem Antikörper L1-172R analysiert. Ionomycin stimuliert die Entstehung der Bande L1-28 in transient mit L1 transfizierten HEK-Zellen. **B)** SH-SY5Y Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen in An- und Abwesenheit von DAPT für 2 h inkubiert. Darauf folgten eine Ionomycin-Stimulation und die Kernfraktionierung mittels *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen). Die nukleoplasmatische Kernfraktion (nab) wurde im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R analysiert. L1-32 und L1-28 ist konstitutiv im Nukleoplasma von SH-SY5Y Zellen vorhanden und wird durch die Stimulation mit Ionomycin nicht beeinflusst. Der γ -Sekretase Inhibitor DAPT verhindert die Entstehung des Fragments L1-28. **C)** SH-SY5Y Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit 1 μ M Ionomycin für 20 min in An- und Abwesenheit von DAPT stimuliert. Die Zellen wurden mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen, 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, das 1000 g-Sediment mit Detergens solubilisiert und mit dem Antikörper L1-555 analysiert. Die Stimulation mit Ionomycin bewirkt eine ~35 %ige Abnahme des membranständigen Volle-Länge- L1 (L1-FL). Der Inhibitor DAPT hat keinen Einfluss auf L1-FL nach Stimulation.

Diese Experimente zeigen, dass Ionomycin den γ -Sekretase Schnitt und die Entstehung von L1-28 stimuliert, nicht aber dessen Kernimport. Die konstitutive Entstehung des Fragments L1-28 kann durch den γ -Sekretase Inhibitor DAPT inhibiert werden.

4.2.5.2 KERNIMPORT VON L1 NACH GLUTAMAT-STIMULATION VON SH-SY5Y ZELLEN

L1 ist in präsynaptischen Synapsenendknöpfchen von Schaffer-Kollateralen lokalisiert, welche von CA3 pyramidalen Neuronen im Hippocampus in die Region CA1 projizieren. Die Serin-Protease Neuropsin spaltet spezifisch, NMDA-abhängig L1 im Hippocampus von Mäusen und generiert ein lösliches L1-Fragment mit dem Molekulargewicht von 180 kDa (Matsumoto-Miyai et al., 2003; Nakamura et al., 2006).

In der Literatur ist der Einfluss von Glutamat auf die Endozytose von Oberflächenproteinen wie z.B. N-Cadherin beschrieben (Uemura et al., 2006). In den folgenden Experimenten soll geklärt werden, ob die Stimulation von SH-SY5Y-Zellen mit physiologischen Glutamat-Konzentrationen zu einem vermehrten *shedding* von L1-FL (L1 *full length*) führt und die Kernlokalisierung des L1-Stumpfs als Folge zunimmt.

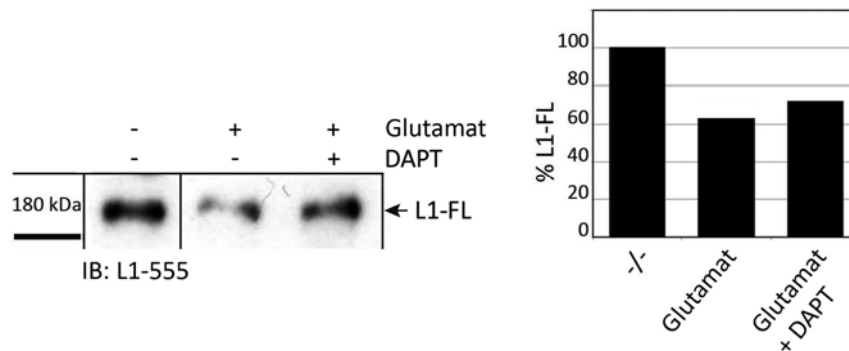


Abbildung 4.9: Die Stimulation von SH-SY5Y Zellen mit Glutamat führt zu einer Abnahme von membranständigem L1 (L1-FL).

SH-SY5Y Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit 10 μ M Glutamat für 20 min in An- und Abwesenheit von DAPT stimuliert. Die Zellen wurden mit einem Glashomogenisator aufgeschlossen, 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, das 1000 g-Sediment mit Detergens solubilisiert und mit dem Antikörper L1-555 analysiert. Die Stimulation mit Glutamat bewirkt eine ~40 %ige Abnahme des membranständigen L1 voller Länge (L1-FL). Der Inhibitor DAPT zeigt keinen Einfluss auf L1 nach Stimulation.

Die Untersuchung von membranständigem L1 in SH-SY5Y Zellen nach Glutamat-Stimulation, zeigte eine deutliche Reduzierung, wie in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Untersuchung der Proteine im solubilisierten 1000 g Sediment der behandelten Zellen mit dem Antikörper L1-172R gegen die L1-ID zeigte keine Mengenzunahme des Stumpfs an.

Im folgenden Experiment soll geklärt werden, ob die Stimulation mit Glutamat zu einer verstärkten L1-Kernlokalisierung führt. Parallel soll durch den Einsatz von Leptomycin B, einem Kernexport-Inhibitor, geklärt werden, ob ein Motiv in der Transmembrandomäne von

L1 vom Kernexport-Mechanismus erkannt wird. Das Motiv LxxLxxLxL (Xiao et al., 2001) wurde *in-silico* mit dem Online-Werkzeug *MiniMotif Miner* (Balla et al., 2006; Rajasekaran et al., 2009) in der Aminosäuresequenz von L1 identifiziert.

SH-SY5Y Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit dem γ -Sekretase Inhibitor DAPT und dem Kernexport-Inhibitor Leptomycin B für zwei Stunden inkubiert und anschließend mit 10 μ M Glutamat für 1 h stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) fraktioniert. Die Kernfraktion der DNS-gebundenen Proteine (insol) wurde im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R analysiert. Der Immunblot zeigt, dass die Stimulation der Zellen mit Glutamat keinen Einfluss auf den Kernimport von L1 hat. Der γ -Sekretase Inhibitor DAPT verhindert die Generierung der löslichen intrazellulären Domäne mit dem Molekulargewicht von \sim 15 kDa. Ein möglicher Einfluss von Leptomycin B auf den Kernexport von L1 konnte nicht gezeigt werden. In Abbildung 4.10 B ist die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten der L1-ID gezeigt. Diese verdeutlicht, dass Glutamat-Stimulation keinen Einfluss auf L1 im Zellkern hat. Auch die Form L1-70 kDa im Nukleoplasma ist nicht beeinflusst (Ergebnis nicht gezeigt).

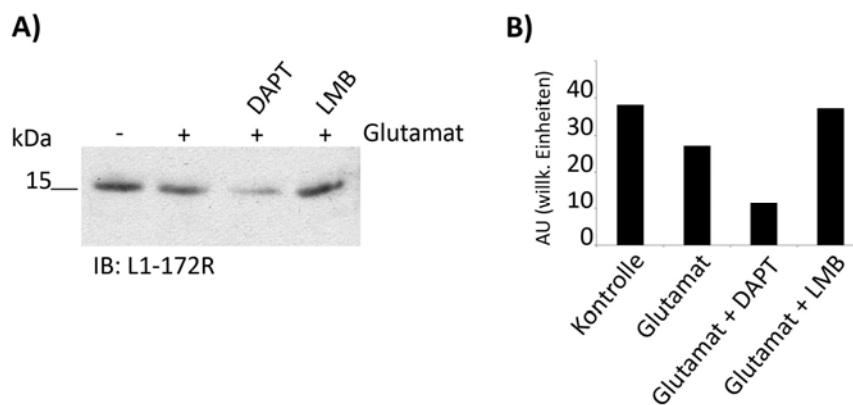


Abbildung 4.10: Einfluss von Glutamat-Stimulation und DAPT auf den L1-Kernimport.

A) SH-SY5Y Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit 10 μ M Glutamat für 1 h stimuliert und anschließend mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) fraktioniert. Die Kernfraktion der DNS-gebundenen Proteine (insol) wurde im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R analysiert. Die Stimulation der Zellen mit Glutamat hat keinen Einfluss auf den Kernimport von L1. Der γ -Sekretase Inhibitor DAPT hat einen deutlichen, inhibitorischen Einfluss auf die Entstehung der löslichen intrazellulären Domäne mit dem Molekulargewicht von 15 kDa. Ein möglicher Einfluss von Leptomycin B auf den Kernexport von L1 konnte unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden. **B)** Die densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten verdeutlicht den Einfluss des γ -Sekretase Inhibitors DAPT auf die Entstehung von L1-15.

4.2.5.3 STIMULATION VON SH-SY5Y ZELLEN MIT L1-Fc

Um der Frage nachzugehen, ob die homophile Interaktion von L1 den gleichen stimulierenden Effekt auf den L1-Kernimport hat, wurden SH-SY5Y Zellen mit humanem und murinem L1-Fc unter serumfreien Bedingungen äquivalent zur Stimulation mit L1-557 für eine Stunde stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) fraktioniert und die Kernfraktionen im Immunblot mittels Antikörper L1-172R analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.11 dargestellt.

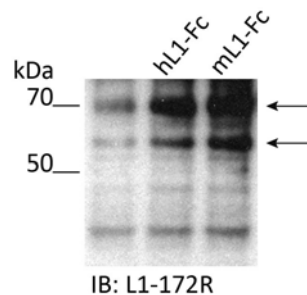


Abbildung 4.11: Stimulation von SH-SY5Y Zellen mit humanem und murinem L1-Fc.

SH-SY5Y Zellen wurden unter serumfreien Bedingungen mit humanem und murinem L1-Fc (20 µg/ml) für eine Stunde stimuliert und anschließend mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) fraktioniert. Die nukleoplasmatische Kernfraktion (nab) wurde im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R analysiert. Pro Spur sind identische Mengen Gesamtprotein aufgetragen. Die Stimulation bewirkt eine vermehrte L1-Kernlokalisierung der Fragmente L1-70 und L1-60 (siehe Pfeile).

Es ist deutlich zu sehen, dass die Stimulation mit L1-Fc zu einer verstärkten L1-Kernlokalisierung im Nukleoplasma von SH-SY5Y Zellen führt, vergleichbar mit dem Effekt von L1-557. Dies bedeutet, dass die Bindung des Antikörpers L1-557 sowie L1-Fc an L1 den gleichen Effekt haben und der gleiche Mechanismus der L1-Kerntranslokation zu Grunde liegt.

4.2.6 UNTERSUCHUNGEN ZUR L1-PROZESSIERUNG DURCH γ -SEKRETASE

In ersten Versuchen (Kalus, 2005) konnten Indizien dafür gefunden werden, dass L1 ein Substrat der γ -Sekretase ist. Diese Protease ist in der Lage Transmembranproteine in der Transmembrandomäne proteolytisch zu spalten. Somit wird die intrazelluläre Domäne eines solchen Proteins ins Zytosol entlassen, oder ist in löslicher Form Inhalt von Vesikeln. Zwei Beobachtungen wurden hinsichtlich L1 und der γ -Sekretase gemacht: In Proteolyse-

Kapitel 4 Ergebnisse

Experimenten an isolierten Membranen wurde in Anwesenheit des γ -Sekretase Inhibitors DAPT kein Fragment generiert, welches der intrazellulären Domäne von L1 entspricht. In Abwesenheit von DAPT war eine Bande sichtbar. Auch konnte gezeigt werden, dass der γ -Sekretase Inhibitor DAPT einen negativen Einfluss auf das L1-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirnexplantaten hat (Kalus, 2005).

Zellkultur-Experimente sollten nun diese mögliche Prozessierung bestätigen. Hierzu wurden zwei HEK-Zelllinien verwendet. Beide Zelllinien überexprimieren eine Mutante von APP mit der schwedischen Doppelmutation K595N/M596L, die in einer schwedischen Familie mit einer Häufung von Alzheimer-Krankheit (FAD) nachgewiesen wurde (Mullan et al., 1992). Hierbei bewirkt der Austausch von Aminosäuren eine höhere Affinität der β -Sekretase (BACE) zu ihrem Substrat und es entsteht vermehrt A β -Peptid (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993; Vassar, 2002). Die Zelllinie SW-PS1 exprimiert funktionsfähiges Presenilin 1, die katalytisch aktive Komponente der γ -Sekretase. Die zweite Zelllinie SW-D385N exprimiert eine mutierte Form von Presenilin 1 (Steiner et al., 2000). Der Versuchsansatz sah vor, die Zelllinien mit pcDNA3-L1 zu transfizieren und im Immunblot mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von L1 mögliche Unterschiede in der Prozessierung zu untersuchen. Desweiteren wurde der γ -Sekretase Inhibitor DAPT verwendet, um unmutiertes PS1 zu inhibieren und so beweisen zu können, dass die Entstehung des L1-Fragments 15 kDa auf das Wirken der γ -Sekretase zurückzuführen ist.

L1 konnte in den transfizierten Zellen exprimiert und nachgewiesen werden, allerdings konnte unter den Versuchsbedingungen keine veränderte Prozessierung oder Generierung der löslichen intrazellulären Domäne von L1 gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

In einem Proteolyseansatz wurde Gesamt-Gehirnhomogenat 7 Tage alter WT-Mäuse mit dem γ -Sekretase Inhibitor DAPT, dem Proteasom-Inhibitor MG132 und dem Metalloproteasen-Inhibitor GM6001 bei 4 °C sowie parallel bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde über Ultrazentrifugation bei 100000 g das Homogenat in lösliche und membrangebundene Bestandteile aufgetrennt. Die 100000 g Überstände wurden im Immunblot mit Hilfe des Antikörpers L1-172R (gegen L1-ID) analysiert. Pro Spur wurden identische Mengen Gesamtprotein aufgetragen.

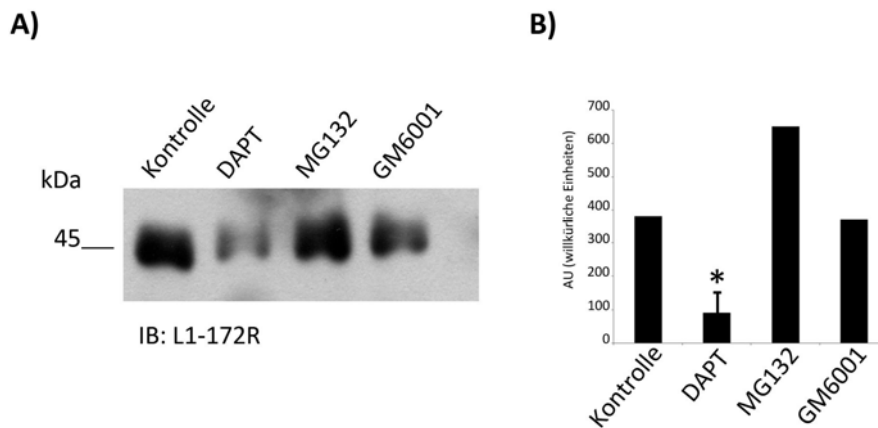


Abbildung 4.12: L1-Proteolyseexperiment mit Homogenat

A) Immunblot eines Proteolyseansatz mit dem Antikörper L1-172R. Gesamt-Gehirnhomogenat wurde in An- und Abwesenheit von Inhibitoren bei 37 °C für eine Stunde auf einem Rotator inkubiert. Im Anschluss folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C für 2 Stunden bei 100000 g. Der Überstand enthält lösliche Proteine und wurde analysiert. **B)** Densitometrische Auswertung der 45 kDa Bande. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente (* $p < 0,05$).

Nach Inkubation der Proben bei 37 °C wird eine L1-Bande bei 45 kDa generiert, die eine lösliche Schnittform der intrazellulären Domäne von L1 darstellt. Sie ist mit dem Antikörper L1-172R detektierbar. Nach Inkubation des Homogenats bei 4 °C ist keine Bande bei 45 kDa detektierbar. Es kann sich bei der 45 kDa Bande nur um γ -Sekretase prozessiertes L1 in löslicher multimerer Form der L1-ID handeln. DAPT zeigt einen signifikant inhibitorischen Einfluss auf die Entstehung des Fragmentes. Die Inhibition der Proteaseaktivität des Proteasoms durch MG132 führt zu einer Zunahme der Menge des Fragments L1-45.

4.3 EUKARYOTISCHE L1-KONSTRUKTE

Untersuchungen zur Prozessierung von L1 konnten einige relevante Proteasen identifizieren. So ist bekannt, dass die Prohormonkonvertase 5 (PC5A) in der dritten Fibronektindomäne schneidet und extrazellulär ein Fragment generiert, welches 140 kDa groß ist und durch homophile Wechselwirkungen mit L1 membranassoziiert verbleibt (Kalus et al., 2003). Weiterhin sind die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in die proteolytische Spaltung von L1 involviert (Gutwein et al., 2005; Kalus et al., 2006). Diese Spaltung bewirkt das sogenannte *ectodomain shedding*, das Abspalten der extrazellulären Domäne (L1-180 kDa).

2005 wurde die Spaltung von L1 in der Transmembrandomäne durch die γ -Sekretase beschrieben (Maretzky et al., 2005). Dieser Schnitt bewirkt die Solubilisierung der intrazellulären Domäne von L1.

Die mögliche Entstehung der proteolytischen Spaltprodukte von L1 ist beschrieben, allerdings herrscht über die Funktion dieser noch Unklarheit. Um zu untersuchen, ob ein bestimmter proteolytischer Schritt für die Kernlokalisierung von L1 notwendig ist, wurden L1-Fragmente in pcDNA3 mit C-terminalem Flag/His-tag kloniert.

4.3.1 KLONIERUNG DER EUKARYOTISCHEN L1-KONSTRUKTE

Alle L1-Fragmente wurden von muriner cDNS aus Gehirn mit genspezifischen Oligonukleotiden mit flankierenden Restriktionsschnittstellen amplifiziert und über T/A-Klonierung in den Vektor pGEM[®]-t Easy eingeführt. In einem Stück wurde die intrazelluläre Domäne amplifiziert und über HindIII und XhoI in den Zielvektor pcDNA3 Flag-His kloniert. Für die membranständigen Fragmente L1-178, L1-202 und L1-434 wurde das Signalpeptid von L1 kloniert und mit den L1-Fragmenten über eine EcoRI-Schnittstelle verbunden. Die EcoRI-Schnittstelle wurde der L1-Sequenz hinzugefügt und kommt endogen nicht vor. Durch diesen Umstand werden die zwei Aminosäuren Glutaminsäure und Phenylalanin zwischen dem Signalpeptid und L1 exprimiert. Die Abbildung 4.13 zeigt eine Übersicht der Klonierungsstrategie.

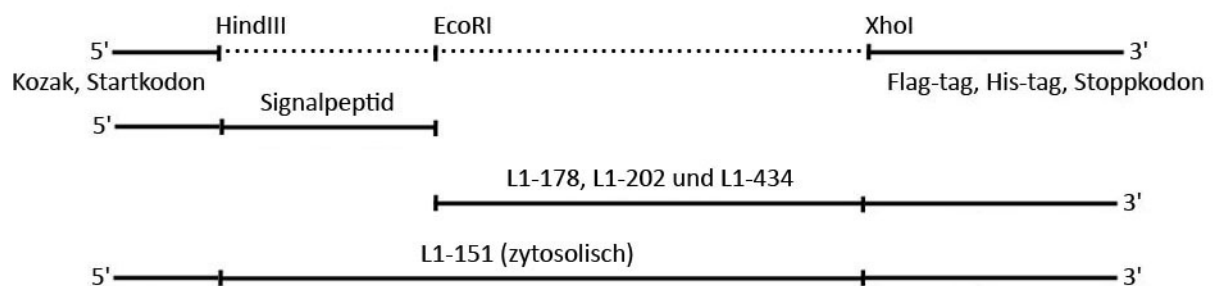


Abbildung 4.13: Klonierungsschema der eukaryotischen L1-Konstrukte.

Mit der Online-Software SignalP 3.0 (Emanuelsson et al., 2007) wurde *in-silico* prognostiziert, dass das Signalpeptid mit EcoRI-Schnittstelle von der Signalpeptidase erkannt und geschnitten wird. Desweiteren wurde mit dem Online-Werkzeug Minimotif Miner 2.0 (Balla

et al., 2006) sichergestellt, dass durch die zwei eingefügten Aminosäuren der EcoRI-Schnittstelle keine vorhandenen Motive zerstört oder neue erschaffen werden.

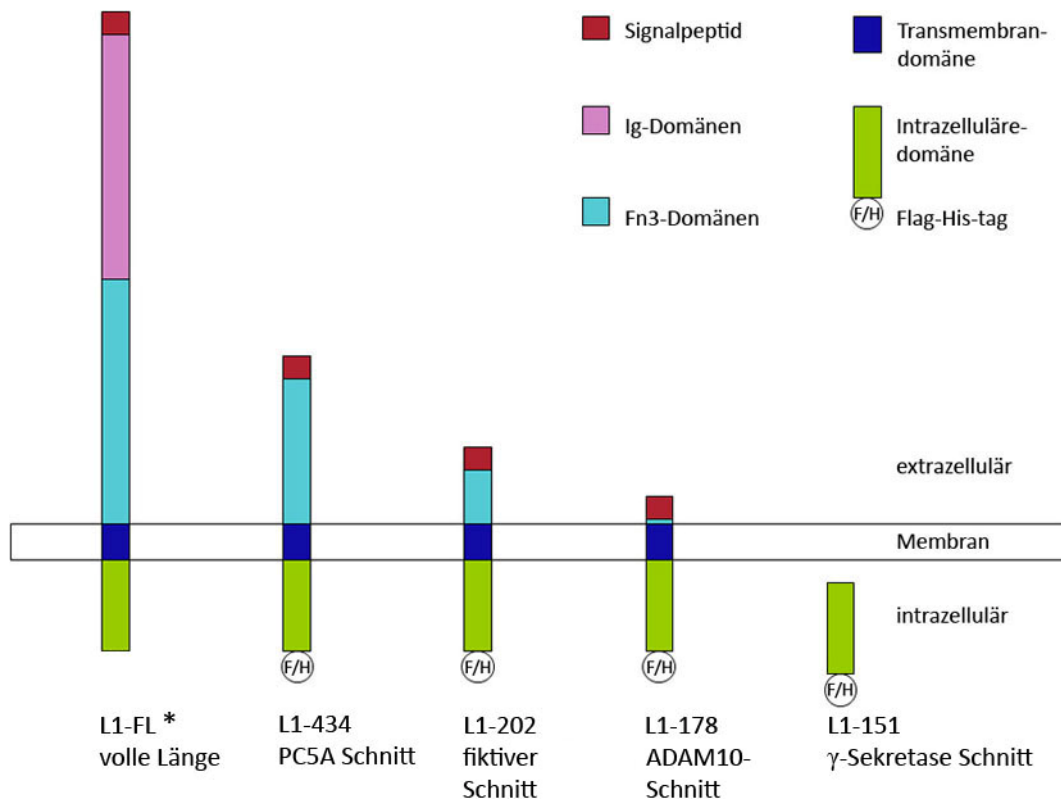


Abbildung 4.14: Übersicht über die Größe und Lokalisierung der L1-Konstrukte.

Die Namen der Konstrukte basieren auf der Anzahl der Aminosäuren des L1-Inserts inklusive Signalpeptid (wenn vorhanden) und Flag/His-tag. L1-FL (P11627) AS 1-1260, L1-434 AS 864-1260, L1-202 AS 1096-1260, L1-178 AS 1120-1260 und L1-151 AS 1147-1260. *Die Klonierung des Konstrukts L1-FL konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vollendet werden. Ersatzweise wurde auf das Konstrukt pcDNA3 L1-FL ohne C-terminalen Flag/His-tag zurückgegriffen.

Die Abbildung 4.14 verdeutlicht die Größen und Lokalisierungen der L1-Konstrukte.

4.3.2 EXPRESSION DER KONSTRUKTE IN HEK-ZELLEN

Um die Funktion der L1-Konstrukte zu überprüfen, wurden diese in HEK-Zellen transfiziert und nach 24 h die Proteinexpression im Immunblot mit Antikörpern gegen den Carboxyterminus von L1 (L1-172R), gegen den His-, sowie gegen den Flag-tag bestätigt (Ergebnis wird nicht gezeigt). Die HEK-Zelllinie eignet sich für diesen Versuch besonders, da sie kein endogenes L1 exprimiert (s. Abbildung 4.15, HEK-WT). Da die intrazelluläre Domäne von L1 stark konserviert ist, kann der Antikörper L1-172R sowohl murines wie humanes L1

detektieren. Die HEK-Zellen wurden weiterhin für Experimente zur Kernlokalisierung von L1 genutzt.

4.3.3 UNTERSUCHUNG DER KERNLOKALISIERUNG DER L1-KONSTRUKTE

Um zu untersuchen, ob eine simulierte proteolytische Spaltung von L1 zu einer Kerntranslokation führt, wurden die L1-Konstrukte zur Transfektion von HEK-Zellen genutzt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) einer Zellkernfraktionierung unterzogen. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.15 dargestellt. Es sind jeweils drei Fraktionen pro transfiziertem L1-Konstrukt aufgetragen. Detektiert wurde mit dem Antikörper L1-172R.

In Abbildung 4.15 A wird deutlich gezeigt, dass untransfizierte HEK-Zellen (HEK-WT) kein L1 exprimieren. Die Banden im Molekularbereich um 55 kDa in den nukleoplasmatischen Fraktionen (nab) sowie der mit DNS-assozierten Proteinfraction (insol) sind unspezifisch.

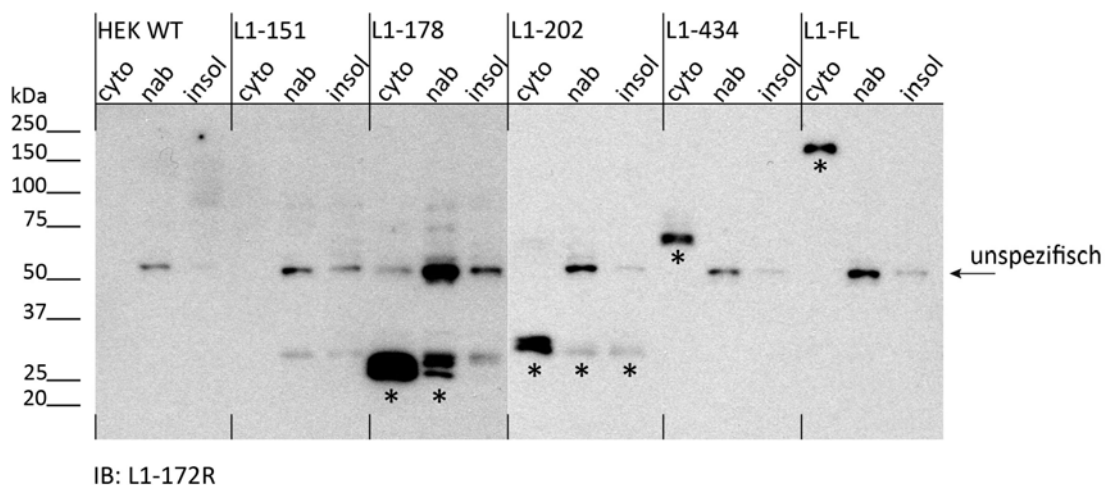


Abbildung 4.15: Biochemische Analyse der L1-Konstrukte auf Kernimport.

Immunblot von Kernfraktionen aus, mit L1-Konstrukten transfizierten HEK-Zellen. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion einer Kernfraktionierung mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) unterzogen. Pro Spur wurden identische Mengen (10 µg) Gesamtprotein aufgetragen. Detektiert wurde mit dem Antikörper L1-172R. L1-spezifische Banden sind mit * markiert.

Nach 48 h Expression des Fragments L1-151 ist dieses im Immunblot nicht nachweisbar. In vorhergegangenen Expressionen in HEK-Zellen konnte die L1-ID nach 24-stündiger

Kapitel 4 Ergebnisse

Expressionsdauer schwach nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den anderen Konstrukten, scheint das Fragment L1-ID in HEK-Zellen die kürzeste Halbwertszeit zu haben.

Das Fragment L1-178 wird stark exprimiert und ist in der Nicht-Kern Fraktion als auch in der nukleoplasmatischen Fraktion (nab) deutlich detektierbar. Interessanterweise sind in der Nicht-Kern Fraktion drei dicht bei einander liegende Banden für das Fragment L1-178 detektierbar. Ein ähnliches Ergebnis zeigen HEK-Zellen, die mit dem Konstrukt L1-202 transfiziert wurden. Die Expression in der Nicht-Kern Fraktion ist deutlich zu sehen, auch hier als Doppelbande. In den Kernfraktionen „nab“ und „insol“ ist ebenfalls L1-202 detektierbar, und zwar ausschließlich in der Form mit dem geringeren Molekulargewicht. Sollte es sich bei der oberen der beiden Banden um eine Vorläufer-Form mit Signalpeptid handeln, so ist deutlich gezeigt, dass nur die gereifte, an die Zellmembran transportierte Form in den Zellkern geht.

Die Konstrukte L1-434 und –FL werden ebenfalls exprimiert und sind ausschließlich in den Nicht-Kern Fraktionen detektierbar. Auch wird sichtbar, dass die Konstrukte L1-434 und L1–FL unter den Versuchsbedingungen in HEK-Zellen nicht weiter proteolytisch gespalten wurden.

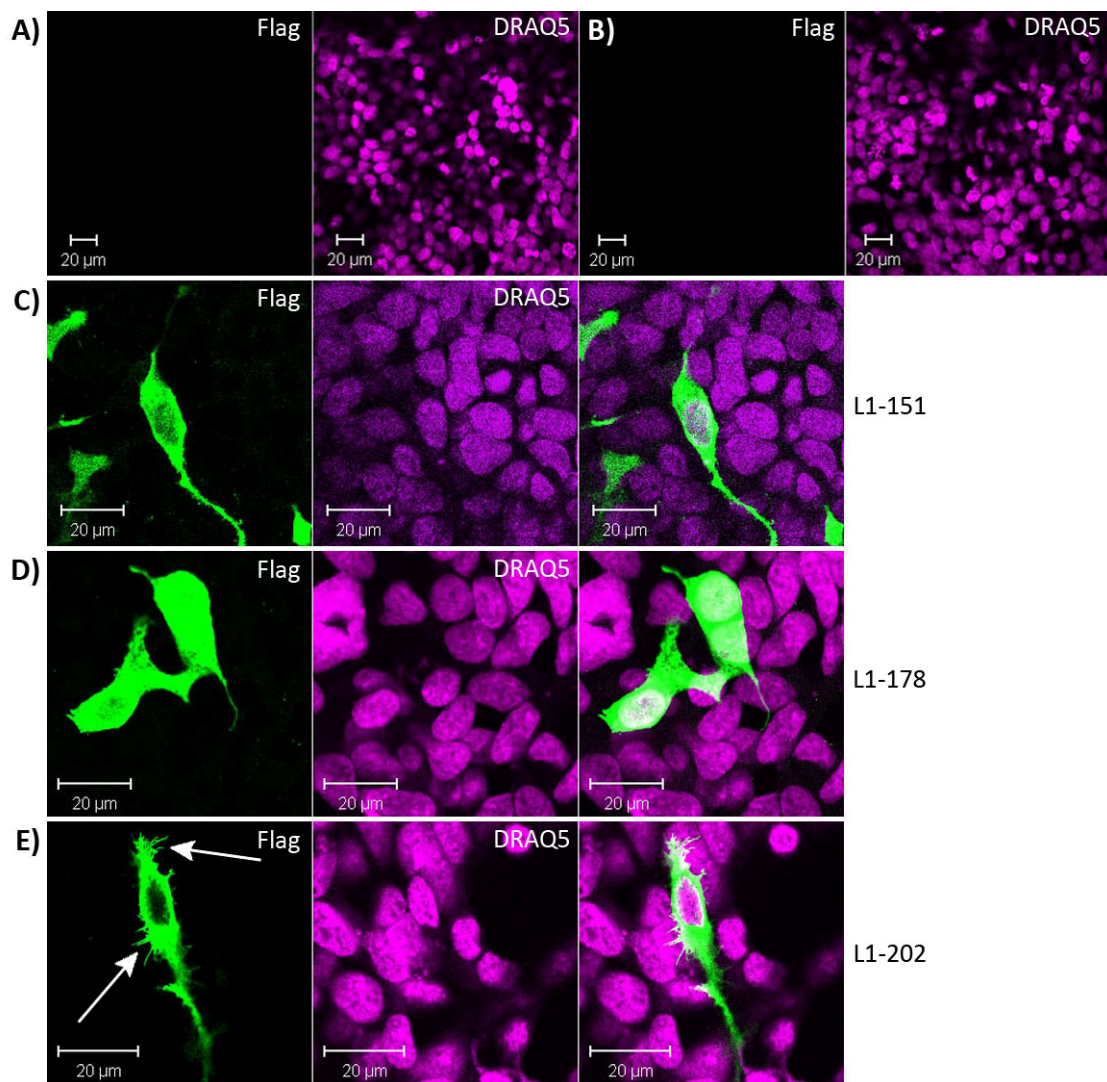
Dieses Experiment zeigt, dass die membranständigen Formen L1-178 und L1-202 in transfizierten HEK-Zellen in den Nukleus translozieren. Es sieht weiterhin so aus, dass L1-178 und evtl. L1-202 in HEK-Zellen phosphoryliert werden, was den *shift* der Banden im Immunblot erklären könnte. Es ist sicher, dass die Nicht-Kern Fraktionen Endoplasmatisches Retikulum (ER) enthalten und somit L1 mit Signalpeptid, welches von der Signalpeptidase lumenal im ER noch nicht prozessiert wurde.

Parallel zu der biochemischen Analyse transfizierter HEK-Zellen wurden solche immunhistochemisch untersucht, um eine mögliche Kerntranslokation zu zeigen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 48 h nach Transfektion mit dem Antikörper M2 gegen den Flag-tag der Konstrukte gefärbt. Die Abbildung 4.16 A und B zeigt nicht transfizierte HEK-Zellen, die mit den Antikörpern gegen den Flag-tag und L1 gerichtet inkubiert wurden. Als Sekundärantikörper wurden Fluoreszenz-gekoppelte (Cy3) Maus-IgGs verwendet. Beide Antikörper zeigen erwartungsgemäß keine Reaktion.

Kapitel 4 Ergebnisse

In Abbildung 4.16 C ist eine mit L1-151 transfizierte HEK-Zelle gezeigt, die mit dem M2 Antikörper gegen den Flag-tag inkubiert wurde. Die Färbung zeigt, dass L1 zytosolisch sowie in einem punktierten Muster im Zellkern sichtbar ist.

In Abbildung 4.16 D ist eine mit L1-178 transfizierte HEK-Zelle gezeigt, die mit dem M2 Antikörper gegen den Flag-tag inkubiert wurde. Die Färbung zeigt, dass L1 membranständig sowie in einem punktierten Muster, stärker als in Abb. C, im Zellkern vorkommt.



Kapitel 4 Ergebnisse

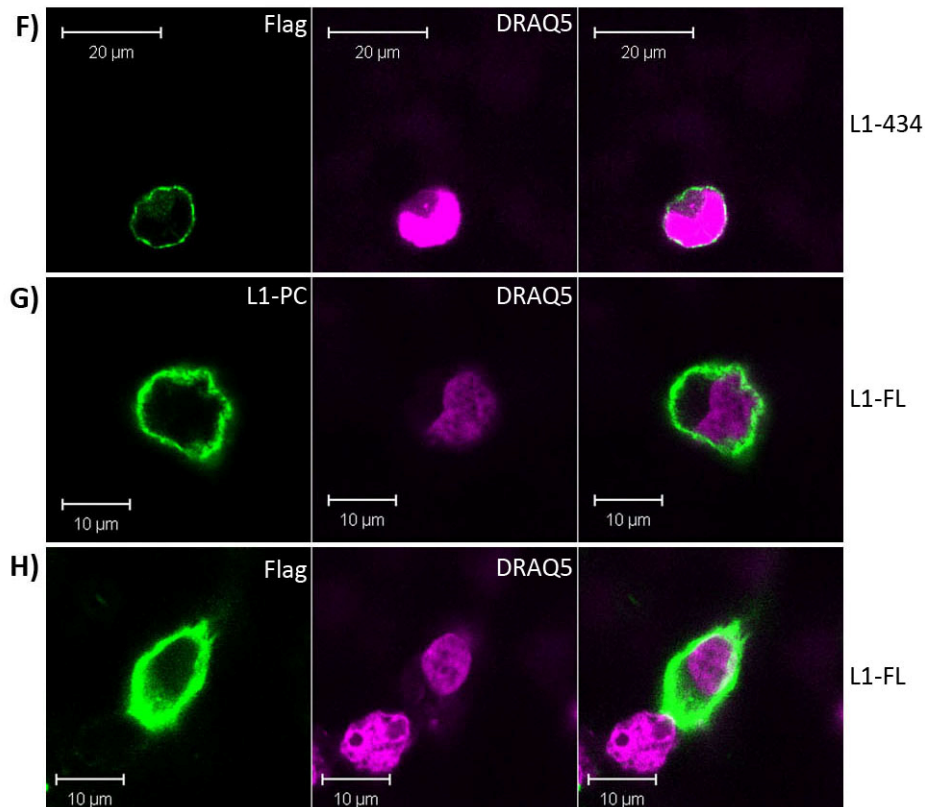


Abbildung 4.16: Immunhistochemische Untersuchung der Verteilung verschiedener L1-Konstrukte in HEK-Zellen.

Die HEK-Zellen wurden mit den Konstrukten L1-151, -178, -202, -434 und -FL transfiziert und nach 48 h mit 4 % PFA fixiert; mit 1 % TX in PBS wurden Membranen permeabilisiert. Blockiert wurde mit 0,1 % BSA in PBST. Für die Kernfärbungen wurde DRAQ5 benutzt. **A)** Untransfizierte HEK-Zellen (HEK-WT) wurden mit dem Flag-Antikörper M2 und in **B)** mit dem Antikörper L1-172R zur Kontrolle gefärbt. Es sind keine unspezifischen Signale detektierbar. **C)** Mit L1-151 transfizierte HEK-Zellen wurden mit dem Flag-Antikörper M2 gefärbt. Es ist deutlich zytosolisches wie auch nukleäres L1-151 detektierbar. **D)** Mit L1-178 transfizierte HEK-Zellen und Flag-Antikörper M2 gefärbt. L1-178 ist im Zyosol und im Zellkern detektierbar. **E)** L1-202 transfizierte HEK-Zellen wurden mit dem Flag-Antikörper M2 gefärbt. L1-202 zeigt eine schwache Kernlokalisierung. Das stärkste Signal geht von Zytosol aus. **F)** Mit L1-434 transfizierte HEK-Zellen wurden mit dem Flag-Antikörper M2 gefärbt. L1-434 ist in der Plasmamembran und schwach im Zytosol detektierbar. **G)** Mit L1-FL transfizierte HEK-Zellen, welche mit dem Antikörper L1-172R und in **H)** mit dem polyklonalen Antikörper L1-PC gefärbt wurden. Die Antikörper zeigen membranständiges wie auch zytosolisches L1 an. Ein Größenmaßstab ist in jedem Bild angegeben.

Das Konstrukt L1-202, welches in Abbildung 4.16 E benutzt wurde um HEK-Zellen zu transfizieren, zeigt wie L1-178 eine Lokalisierung in der Zellmembran sowie eine schwache Kernfärbung.

Das Konstrukt L1-434, welches in Abbildung 4.16 F benutzt wurde um HEK-Zellen zu transfizieren, zeigt ausschließlich eine Lokalisierung in der Zellmembran und keine Kernfärbung.

Die in Abbildung 4.16 G und H gezeigten HEK-Zellen wurden mit L1-FL transfiziert und mit

den Antikörpern L1-172R und L1-PC inkubiert. Beide Antikörper zeigen ausschließlich die Lokalisierung von L1 an der Membran und keine Kernfärbung.

Dieses Experiment bestätigt die biochemischen Ergebnisse der Kernfraktionierung transfizierter HEK-Zellen. In den immunhistochemischen Bildern ist ebenfalls eine Kernlokalisierung der L1-Fragmente -178 und -202 zu sehen. Die intrazelluläre Domäne ist ebenfalls im Zellkern sichtbar, lässt sich im Immunblot aber nicht detektieren. Das Fragment L1-434 und L1 voller Länge zeigen auch in der Immunhistochemie kein Signal im Zellkern. Darüber hinaus verändern mit L1-178, -202, -434 transfizierte HEK-Zellen ihre Morphologie. Ein Großteil der L1-positiven Zellen bildet feine Membranausläufer, wie in Abbildung 4.16 E deutlich gezeigt wird (siehe Pfeile).

4.4 POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN DER L1-ID

Im Folgenden soll untersucht werden, ob die posttranslationalen Modifikationen Sumo- und Ubiquitylierung eine Rolle bei der L1-Endozytose und dem Kernimport spielen.

4.4.1 IST L1 SUMOYLIERT?

Die *in-silico* Analyse der Aminosäuresequenz von L1 mit dem Online-Werkzeug Sumoplot™ (Abgent Inc.) ergab sechs Sumoylierungsmotive mit hoher Wahrscheinlichkeit auf physiologische Relevanz (s. Abbildung 4.17 A). Zwei der Motive sind in der intrazellulären Domäne lokalisiert (K1172 und K1235). *Small Ubiquitin-like Modifier* oder SUMO-Proteine gehören zu einer Familie von kleinen Proteinen, welche als posttranslationale Modifikation kovalent an Proteine geknüpft werden können, um deren Funktion zu modifizieren. Sumoylierung spielt in vielen zellulären Vorgängen eine wichtige Rolle, wie z. B. beim nukleär-zytosolischen Transport, Transkriptionsregulierung, Apoptose oder Proteinstabilität, um nur einige zu nennen (Hay, 2005). Sumoylierung ist durch spezielle Sumo-Proteasen reversibel (Mukhopadhyay and Dasso, 2007).

Das Ergebnis Abbildung 4.17 A hat die Frage nach einer möglichen Sumoylierung von L1 das erste Mal aufgeworfen. Der Immunblot zeigt die Kernfraktionen mit nukleoplasmatischen-

Kapitel 4 Ergebnisse

(nab) und DNS-assoziierten Proteinen (insol) aus N2a-Zellen, die mit dem Antikörper L1-172R analysiert wurden. Der *shift* der detektierten Banden um ~12 kDa kann durch Dimerisierung der L1-ID oder durch eine posttranskriptionelle Modifikation wie Sumoylierung erklärt werden.

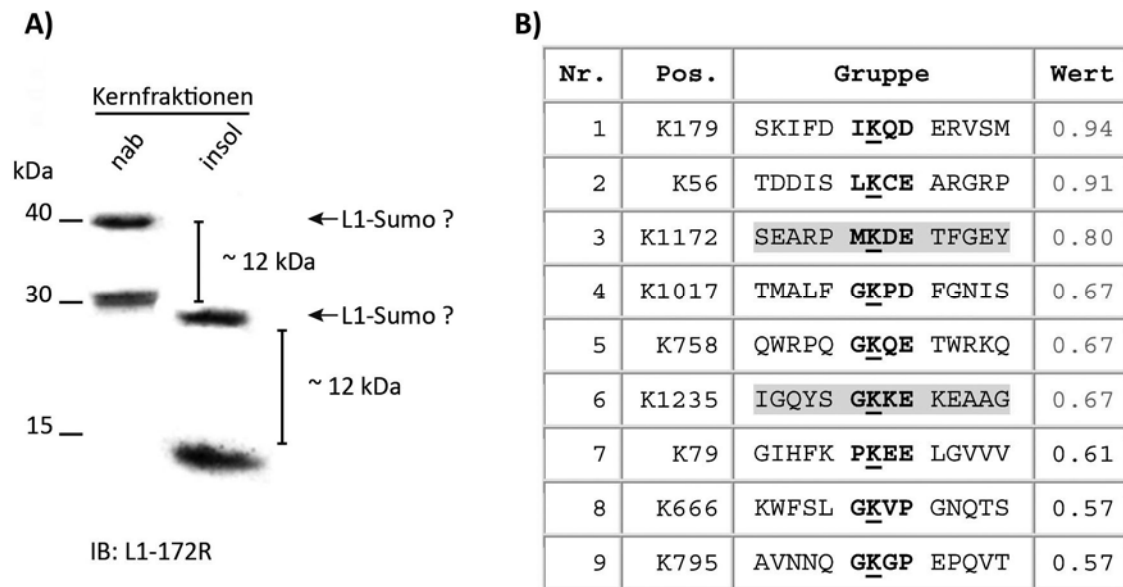


Abbildung 4.17: Ist die L1-ID sumoyliert?

A) Kernfraktionen aus N2a-Zellen. 5×10^7 Zellen wurden mit dem *Qproteome™ Nuclear Protein Kit* (Qiagen) fraktioniert. Die Kernfraktionen „nab“ und „insol“ wurden im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R untersucht. Die L1-Banden im Zellkern zeigen einen *shift* von ~12 kDa, welcher durch eine mögliche Sumoylierung erklärt werden kann. **B)** Die Aminosäuresequenz von L1 (P11627) wurde mit dem Onlinewerkzeug SUMOplot™ auf potentielle Sumoylierungsmotive analysiert. Die ersten sechs Treffer zeigen Sumoylierungsmotive in L1, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit physiologisch relevant sind. Die zwei hinterlegten Motive sind in der L1-ID lokalisiert.

Abbildung 4.18 zeigt die Ergebnisse mehrerer Immunpräzipitationen mit L1-Antikörpern und dem pan-SUMO Antikörper aus einem, mit Detegens behandelten 1000 g-Überstand sowie aus einer Kernfraktion. In Bild A kann deutlich sumoyliertes L1 mit der Größe von 40 kDa gezeigt werden, das mit dem Antikörper L1-172R gegen die L1-ID präzipitiert wurde. Die umgekehrte Präzipitation des Fragments L1-40 kDa war nicht möglich. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 4.18 C dargestellt. Der SUMO-Antikörper präzipitiert L1, allerdings mit einer Präferenz für eine andere L1-Form, mit der Größe von 115 kDa.

Kapitel 4 Ergebnisse

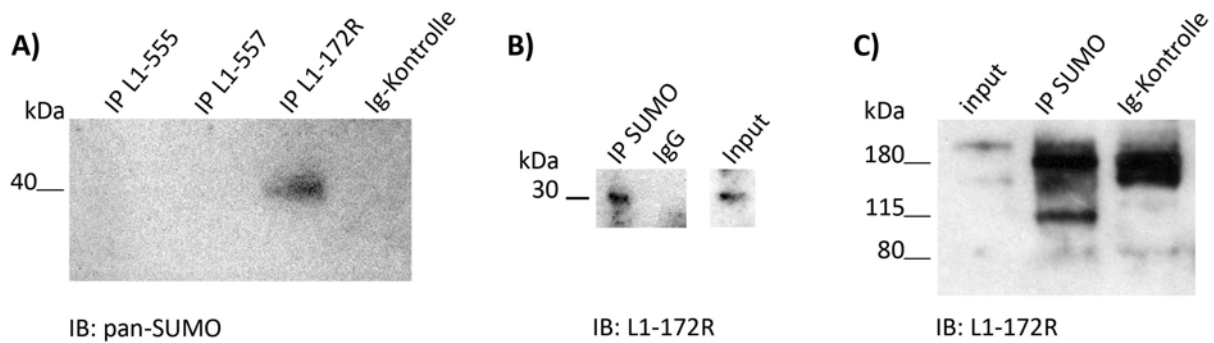


Abbildung 4.18: Biochemische Untersuchung zur potentiellen Sumoylierung von L1.

A) Co-Immünpräzipitation mit den L1-Antikörpern 555, 557 und 172R (10 µg) aus einem 1000 g Überstand (100 µg Gesamtprotein). Die Detektion erfolgte mittels pan-SUMO Antikörper (Kaninchen). Die Ig-Kontrolle mit 10 µg unspezifischen Maus-IgGs ist negativ. **B)** Co-Immünpräzipitation mit dem pan-SUMO Antikörper (10 µg) aus einer Kernfraktion (100 µg Gesamtprotein). Die Detektion erfolgte mittels Antikörper L1-172R (Maus). **C)** Co-Immünpräzipitation mit pan-SUMO Antikörper (10 µg) aus einem solubilisierten 1000 g Überstand (100 µg Gesamtprotein). Die Detektion erfolgte mittels L1-Antikörper 555.

In Abbildung 4.18 B wurde ebenfalls mit dem pan-SUMO Antikörper präzipitiert, diesmal aus einer Kernfraktion. Das Ergebnis zeigt eine spezifische Bande für sumoyliertes L1 mit der Größe 30 kDa.

Zusammen genommen zeigen diese Ergebnisse eine Sumoylierung von L1, welche sowohl im Zellkern als auch außerhalb detektierbar ist. Die sumoylierten Banden L1-40 kDa und L1-30 kDa gehen auf Grund ihrer Molekulargewichte mit großer Sicherheit auf eine Sumoylierung innerhalb der L1-ID zurück.

4.4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHEN UBIQUITINYLIERUNG VON L1.

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Protein, welches als posttranskriptionelle Modifikation kovalent an Zielproteine gekoppelt werden kann. Hierbei unterscheidet man insbesondere zwischen Polyubiquitinylierung, einem Signal für proteasomale Degradation, und der Monoubiquitinylierung. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der sub-zellulären Neuverteilung von Proteinen wie auch beim Kernimport (Trotman et al., 2007; Brenkman et al., 2008).

Die Abbildung 4.19 zeigt die Ergebnisse von Immünpräzipitationen mit L1-Antikörpern und dem Ubiquitin-Antikörper, aus einem 1000 g-Überstand. In Bild A kann ubiquitinyliertes L1 mit den Größen von 180 kDa und ~120 kDa gezeigt werden, das mit den Antikörpern L1-555 und L1-557 präzipitiert wurde. Die umgekehrte Präzipitation des ubiquitinylierten Fragments

L1-180 kDa war möglich und ist in Abbildung 4.19 B dargestellt. Die Kontrollen mit unspezifischen Ratten- und Kaninchen-IgGs sind negativ.

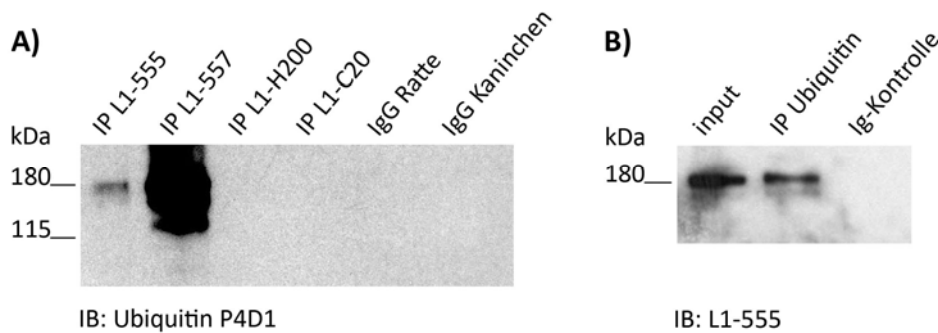


Abbildung 4.19: Biochemische Untersuchung zur potentiellen Ubiquitinylierung von L1.

A) Co-Immunpräzipitation mit den L1-Antikörpern 555, 557, H200 und C20 (10 µg) aus einem solubilisierten 1000 g Überstand (100 µg Gesamtprotein). Die Detektion erfolgte mittels Ubiquitin-Antikörper P4D1. **B)** Co-Immunpräzipitation mit 10 µg Ubiquitin-Antikörper P4D1 (Maus) aus einem solubilisierten 1000 g Überstand (100 µg Gesamtprotein). Die Detektion erfolgte mittels L1-Antikörper 555 (Ratte).

4.5 DER WEG IN DEN KERN

4.5.1 IST DER L1-KERNIMPORT IMPORTIN ABHÄNGIG?

Eine Motivsuche mit dem Online-Werkzeug *MiniMotif Miner* (Balla et al., 2006; Rajasekaran et al., 2009) in der Aminosäuresequenz der intrazellulären Domäne von L1 konnte zwei potentielle Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signal*) indentifizieren. Diese werden im Regelfall von Importin α gebunden und vermitteln so den Kernimport von Proteinen (Kalderon et al., 1984). Importin β bindet im Zytosol an Importin α , hat aber auch eine Affinität zur NLS (Lusk et al., 2007). Um zu klären, ob der L1-Kernimport Importin-abhängig ist, wurden Bindungsstudien mit den rekombinant exprimierten intrazellulären Domänen von L1 und NCAM140 durchgeführt. Diese wurden kovalent an aktivierte CN-Br Sepharose gekoppelt und im Pulldown eingesetzt. Eine zytosolische Fraktion aus dem Gehirn 7 Tage alter Wt-Mäuse diente als Ausgangsmaterial.

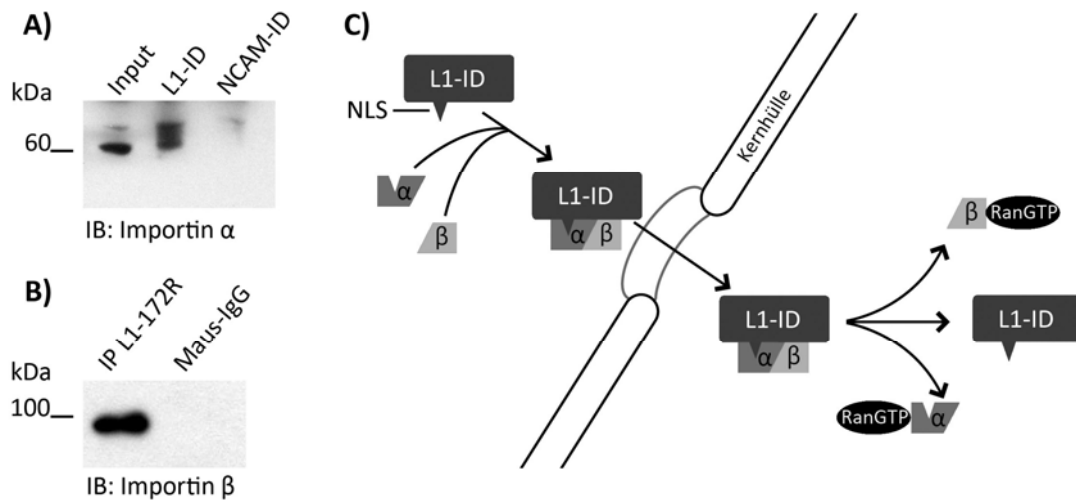


Abbildung 4.20: Ist der L1-Kernimport Importin abhängig?

A) Pulldown mit den rekombinant exprimierten intrazellulären Domänen von L1 und NCAM-140. Die Köderproteine wurden rekombinant an aktivierte CN-Br Sepharose gekoppelt. Der Pulldown wurde aus einer zytosolischen Fraktion aus Mausgehirn durchgeführt. Detektiert wurde mit dem Antikörper Importin α **B)** Co-Immunpräzipitation mit dem Antikörper L1-172R. Präzipitiert wurde aus einer zytosolischen Fraktion aus Mausgehirn. Für die IP wurden 10 μ l L1-Antikörper und 10 μ g unspezifische Kontroll-IgGs aus Maus. **C)** Schema des Importin vermittelten Kernimports: Importine erkennen Kernlokalisationssignale (NLS), binden die entsprechenden Proteine und transportieren sie durch die Pore in den Zellkern. Die Energie für diesen Vorgang wird durch die Hydrolyse von GTP freigesetzt.

Wie in Abbildung 4.20 A zu sehen ist, bindet Importin α an die intrazelluläre Domäne von L1, nicht aber an die NCAM140-ID. Diese Kontrolle ist in diesem Versuch von großer Bedeutung, da keine Bindung von Importin an NCAM140-ID eine unspezifische Bindung an die Sepharose ausschließt. NCAM140-ID weist keine NLS auf. Die Abbildung 4.20 B zeigt eine Immunpräzipitation mit dem Antikörper L1-172R aus einer zytosolischen Gehirnfraction (s.o.). Die Analyse der präzipitierten Proteine mit dem Antikörper gegen Importin β (NTF97) zeigt eine deutliche Bande für Importin β . Dies bedeutet, dass sowohl Importin α und β an die L1-ID binden und somit den Kernimport vermitteln können.

4.5.2 VERTEILUNG VON L1 IN ENDOSOMEN

Nach der biochemischen Untersuchung von Gehirnfractionen in Kapitel 4.2.1 wurde deutlich, dass die im Zellkern auftretenden L1-Formen zum Teil membranständig sind. Um den Weg zu entschlüsseln, auf dem L1 in den Zellkern gelangt, wurden Endosomen aus Wt-Mausgehirnen isoliert und im Immunblot analysiert. Die Abbildung 4.21 zeigt die Verteilung

Kapitel 4 Ergebnisse

von L1 in Endosomen, detektiert mit dem carboxyterminal bindenden Antikörper L1-172R. Deutlich zu sehen ist die L1-70 kDa Bande, welche nach L1-557 Stimulation vermehrt in den Zellkern importiert wird. Diese Bande ist im Zytosol nur in geringer Menge vorhanden. In den Fraktionen 8 und 9 sind desweiteren die L1-Formen 32/30 kDa, 20 kDa sowie 15 kDa zu sehen.

Im Zytosol sind zwei L1-Banden (L1-48 und L1-23) prägnant, welche lösliche L1-ID repräsentieren. Wie im Proteolyseassay (Abbildung 4.12) gezeigt, sind diese Schnittformen γ -Sekretase-abhängig.

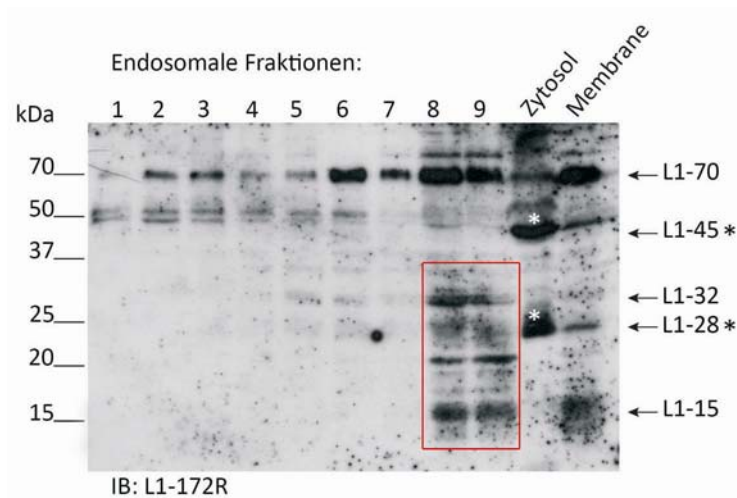


Abbildung 4.21: Verteilung von L1 in endosomalen Fraktionen.

Endosomen aus Mausgehirn wurde präpariert wie in 3.1.5.4 beschrieben. Die Fraktionen wurden im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R analysiert (Dr. R. Kleene, ZMNH). Membranständiges L1 in den Formen L1-70 und L1-32 sind in den Endosomen-Fraktionen 8 und 9 akkumuliert (roter Rahmen). Lösliche carboxyterminale L1-Fragmente sind im Zytosol mit den Molekulargewichten 28 und 45 kDa detektierbar.

In der Abbildung 4.22 sind die Ergebnisse der Charakterisierung der endosomalen Fraktionen gezeigt. Diese wurde mit Antikörpern gegen Markerproteine verschiedener Vesikel durchgeführt und bestätigt, dass es sich bei dem angereicherten Material um Endosomen handelt. Die Anreicherung von prozessiertem L1 u.a. in den Formen L1-70, L1-32 und L1-15 ist somit hauptsächlich auf späte Endosomen und Recycling Endosomen zurückzuführen, die positiv für Rab 9 und Rab 11 sind.

Kapitel 4 Ergebnisse

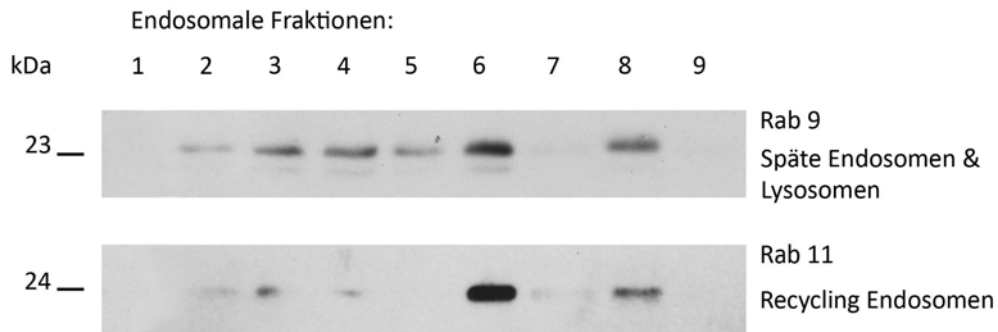


Abbildung 4.22: Charakterisierung der endosomalen Fraktionen durch Markerproteine.

Endosomale Fraktionen wurden im Immunblot mit den Antikörpern gegen die Markerproteine Rab9 und Rab11 charakterisiert. Die Blots wurden von E. Ramser (ZMNH) angefertigt.

4.5.3 EXISTIERT UBIQUITINYLIERTES L1 IN ENDOSOMEN?

Um zu überprüfen, ob Ubiquitinylierung von L1 eine mögliche Funktion beim Kernimport hat, sollte geklärt werden, in welchen endosomalen Fraktionen, und wie L1 durch Ubiquitin modifiziert wird.

Nach Immunpräzipitationen mit dem Antikörper L1-557 aus endosomalen Fraktionen, wurden die Präzipitate mit dem Ubiquitin-Antikörpern P4D1 (Poly- und Monoubiquitin) und FK1 (Polyubiquitin) analysiert. Die Abbildung 4.23 A zeigt eindeutig ubiquitinyliertes L1 in Endosomen, insbesondere in den Fraktionen 2 – 5.

Diese Ergebnisse zeigen, dass L1 poly- und monoubiquitinyliert in Endosomen vorliegt. Die Banden L1-70 kDa und L1-50 kDa sind monoubiquitinyliert und mit dem Antikörper FK1 nicht detektierbar. Die Monoubiquitinylierten Formen L1-70 und L1-50 sind in den Fraktionen 2 – 5 sowie in 7 und 9 detektierbar. Das kann bedeuten, dass monoubiquitinyliertes L1 über späte Endosomen in den Zellkern gelangt.

Kapitel 4 Ergebnisse

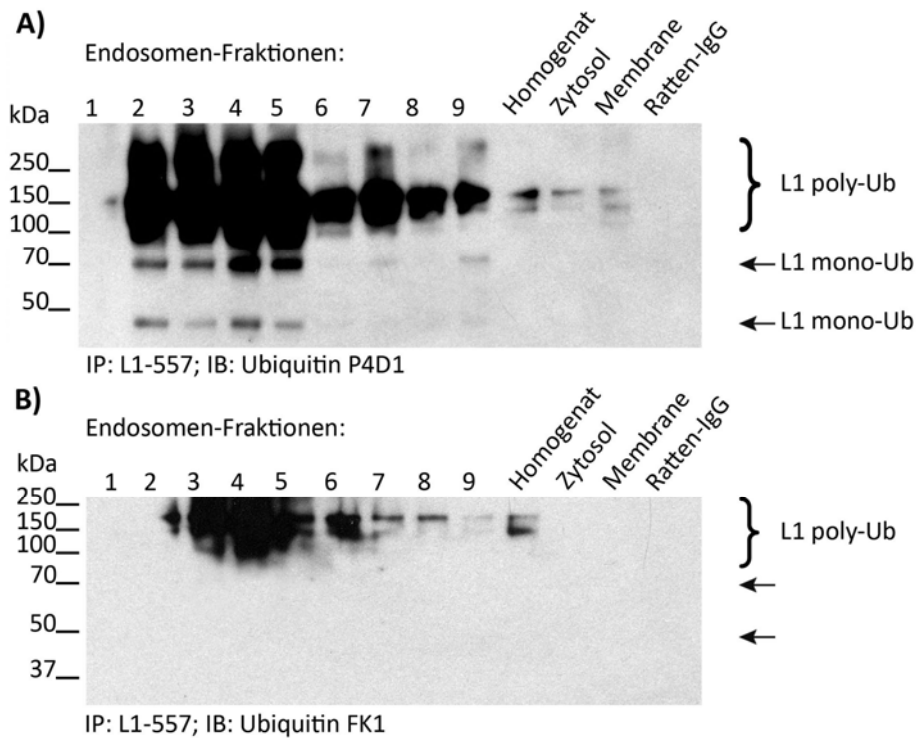


Abbildung 4.23: Liegt L1 in ubiquitinylierter Form in Endosomen vor?

A) Immunblotanalyse von Immunpräzipitaten aus Endosomenfraktionen aus Gesamtgehirn 7 Tage alter Wildtyp-Mäuse. Die Immunpräzipitation wurde mit dem monoklonalen L1 Antikörper 557 (Ratte) durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Fraktionen wurden bestimmt und identische Ausgangsmengen an Gesamtprotein für jede IP eingesetzt. Die Fraktionen wurden vor der Inkubation mit dem Antikörper oder der gleichen Menge unspezifischer Ratten-IgGs mit Protein G gekoppelten magnetischen Dynabeads vorinkubiert, um unspezifische Proteinbindung an die *beads* auszuschließen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 – 20 % Tris/Tricin-Gel. Die Detektion erfolgte mit dem Ubiquitin-Antikörper P4D1 (Maus), welcher Mono- sowie Polyubiquitin detektiert. **B)** IP 557 mit FK1 gegen Polyubiquitin.

Um zu überprüfen, ob die mit dem L1-557 Antikörper präzipitierten L1-Formen die L1-ID beinhalten, wurden die Präzipitate im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Die L1-Formen L1-70 und L1-50 sowie größere Fragmente sind detektierbar, was bedeutet, dass die L1-ID präsent ist.

Kapitel 4 Ergebnisse

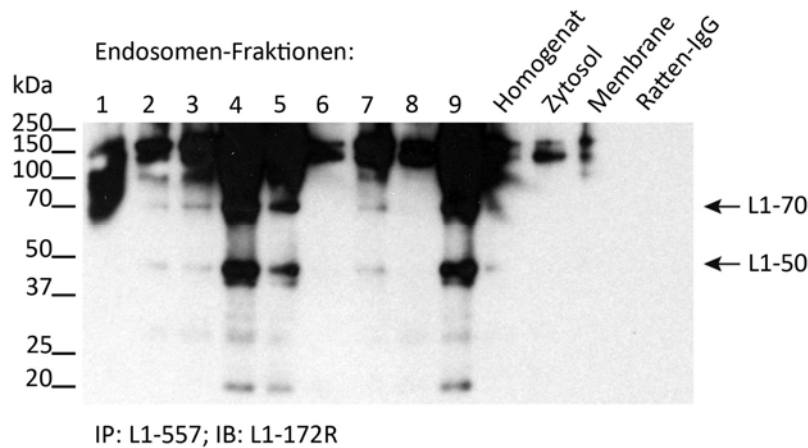


Abbildung 4.24: Welche L1-Fragmente sind sowohl mit dem 557 und dem 172-R L1-Antikörper detektierbar?

Immunblotanalyse von Immunpräzipitaten aus Endosomenfraktionen aus Gesamtgehirn 7 Tage alter Wildtyp-Mäuse. Die Immunpräzipitation wurde mit dem monoklonalen L1 Antikörper 557 (Ratte) durchgeführt. Die Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Fraktionen wurden bestimmt und identische Ausgangsmengen an Gesamtprotein für jede IP eingesetzt. Die Fraktionen wurden vor der Inkubation mit dem Antikörper oder der gleichen Menge unspezifischer Ratten-IgGs mit Protein G gekoppelten magnetischen Dynabeads vorinkubiert, um unspezifische Proteinbindung an die *beads* auszuschließen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 – 20 % Tris/Tricin-Gel. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper 172-R (Maus) gegen die intrazelluläre Domäne von L1.

4.6 BINDUNGSPARTNERSUCHE DER L1-ID

Um Rückschlüsse auf die Funktion von L1 im Zellkern ziehen zu können, wurden Bindungspartner der L1-ID gesucht. Zum einen wurde mit einem Hefe-Zwei-Hybrid System und L1 als Köder Bindungspartner gesucht, zum anderen mittels Affinitätschromatographie.

4.6.1 HEFE-ZWEI-HYBRID SYSTEM

Das Hefe-Zwei-Hybrid System von Invitrogen (*Proquest with Gateway Technology*) wurde benutzt, um neue Bindungspartner der intrazellulären Domäne von L1 zu identifizieren. Bei dieser Bindungspartnersuche waren Kernproteine als mögliche Liganden von L1 im Fokus. Zu diesem Zweck wurden zwei Köderplasmide konzipiert und kloniert. Die Klonierung erfolgte durch Amplifikation mittels PCR unter Verwendung genspezifischer Primer mit flankierenden Rekombinationsstellen. Die PCR-Produkte wurden über T/A-Klonierung in pGEM[®]-T Easy (Promega) eingeführt, vermehrt und sequenziert. Das Gateway System von Invitrogen

Kapitel 4 Ergebnisse

ermöglichte einen schnellen Weg zur Einführung der L1-Amplifikate in den *Entryvector* pDONR 222 und anschließend in den Zielvektor pDEST32 durch die Verwendung von zwei Rekombinase-Reaktionen.



Abbildung 4.25: Motive in der Transmembrandomäne von L1.

- A) Die potentielle Transmembrandomäne von L1 besteht aus den Aminosäuren 1124 – 1146.
- B) Die halbe Transmembrandomäne, wie sie nach γ -Sekretase-Schnitt aussehen könnte.
- C) Leucinreiche Motive innerhalb der Transmembrandomäne (s. Tabelle 4.1).

Das erste pDEST32-Konstrukt hat die intrazelluläre Domäne von L1 als Köder. Ausgehend von der Aminosäuresequenz P11627 (UniProtKB) beginnt die intrazelluläre Domäne bei Aminosäure 1147 und ist 114 Aminosäuren lang.

Das zweite Konstrukt beinhaltet zusätzlich zur intrazellulären Domäne von L1 die halbe Transmembrandomäne und simuliert ein mögliches L1-Fragment nach γ -Sekretase-Prozessierung. Dieses Köderprotein beinhaltet aminoterminal leucinreiche Motive (s. Abbildung 4.25, welche als Proteininteraktionsmotive in Zusammenhang mit nuklearen Rezeptoren sowie mit Kernexport assoziiert sind).

Zusammengenommen stellen beide Konstrukte ein wirksames Duo zur Bindungspartnersuche von L1 dar. Zum *screenen* wurde eine kommerzielle Plasmid-Bibliothek (ProQuest™ Pre-Made cDNA Libraries, Invitrogen) verwendet, welche ~1,5 kB große Inserts aus adultem Mausgehirn im Vektor pPC86 enthält.

In dem Hefestamm MaV203 kann es im Fall der Abwesenheit von Histidin im Medium zu einer basalen Aktivierung des *HIS3*-Reportergens in Anwesenheit von DB-X kommen. Imidazol Glycerol-Phosphat Dehydrogenase kann dosis abhängig durch 3-Amino-1,2,4-Triazol (3AT) inhibiert werden, welches dem Medium zugefügt wird (Kishore and Shah, 1988; Durfee et al., 1993). Um die notwendige Menge 3AT zu ermitteln, wurden Hefen mit den L1-

Kapitel 4 Ergebnisse

Köderplasmiden sowie mit pEXP-AD502 kleinmaßstäblich transformiert und auf SC-Leu-Trp-His-Platten mit 3AT Konzentrationen von 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM und 100 mM für 24 h bei 30 °C inkubiert. Wie in Abbildung 4.26 gezeigt, können die mit den L1-Köderkonstrukten transfizierten Hefen bei relativ hohen 3AT-Konzentrationen wachsen. Für das Köderplasmid pDEST32-L1 ID wurde die benötigte Konzentration von 3AT auf 80 mM festgelegt, die des Konstrukts L1 + ½TM auf 60 mM. Die Konzentration von 3AT, bei der kein Wachstum der Hefen zu beobachten war, wurde bei allen folgenden Experimenten zugefügt, um das Auftreten falsch-positiver Klone bei der gleichzeitigen Möglichkeit zur Identifizierung von schwachen Bindungspartnern zu minimieren.

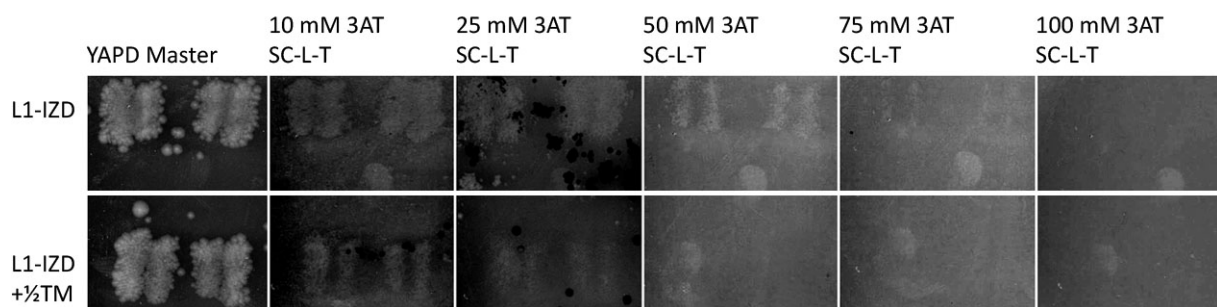


Abbildung 4.26: Titration von DB-X auf 3AT Platten.

Dargestellt ist das Wachstum von Hefen, transfiziert mit pEXP-AD502 und den L1-Köderkonstrukten L1-ID (obere Zeile) und L1-ID + ½TM (untere Zeile) auf Mangelmedium SC-L-T in Anwesenheit steigender Konzentrationen 3AT. Die Hefen wurden durch Samtstempel von der Masterplatte repliziert.

Um die Expression der Köderproteine im Hefestamm MaV203 zu überprüfen, wurde dieser mit pDEST32 L1-ID und –L1-ID + ½TM transfiziert und in Abwesenheit von Leucin in SC-L für 48 h bei 30 °C und 200 U/min kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in zweifachem SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min aufgeschlossen.

Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert und im Immunblot untersucht. Hierzu wurde der Antikörper L1-2C2 benutzt, der die intrazelluläre Domäne von L1 detektiert. Pro Spur auf dem Gel wurden gleiche Volumina vergleichbarer Kulturgrößen aufgetragen. Es konnten die Köderproteine L1-ID und L1-ID + ½TM spezifisch detektiert werden (Ergebnis nicht gezeigt). Als Negativkontrolle diente der untransfizierte Hefestamm, der im Immunblot keine Reaktivität mit dem Antikörper L1-2C2 zeigte. Der Gehalt an L1 in den transfizierten Hefen war gering, da es sich bei dem Expressionsvektoren von DB und AD um ARS/CEN-basierte Systeme handelt. Diese haben den Vorteil, Protein-Protein-Interaktionen bei physiologischen Konzentrationen zu messen, und durch eine Überexpression keine

Kapitel 4 Ergebnisse

möglichen toxischen Effekte oder falsch-negative Ergebnisse zu erhalten (Futcher and Cox, 1984).

Das erwartete Molekulargewicht der Köderfusionsproteine beträgt ca. 30 kDa und setzt sich aus den Aminosäuren 1 – 147 der GAL4 DNS *Binding Domain* und im Falle von L1-ID 1147 – 1260 sowie für L1-ID +½TM 1135 – 1260 zusammen. Die detektierten Köderproteine laufen in beiden Fällen bei 60 kDa, was für eine Dimerisierung spricht. Dieses Verhalten ist für die extrazellulären Domänen, welche Ig-ähnliche und Fn3 Domänen zur homo- und heterophilen Bindung besitzen, bekannt. Auch die intrazelluläre Domäne von L1 zeigt eine starke Neigung zur Dimerisierung, wie im Fall von rekombinant exprimierter L1-ID (Abbildung 4.28) gezeigt werden kann.

Die Tabelle 4.1 zeigt die gesammelten validierten Ergebnisse aller durchgeführten *library screens*. Die hier präsentierten Gene sind potentielle Bindungspartner der intrazellulären Domäne von L1. Die Klone aus der AD-Bibliothek zeigen in Anwesenheit von DB-L1-ID Wachstum auf SC-Leu-Trp-His + 3AT, SC-Leu-Trp-Ura nicht aber auf SC-Leu-Trp + 0,2 % 5FOA. Die AD-Klone wurden sequenziert um sicherzustellen, dass die aktivierende Domäne (AD) mit dem Genabschnitt aus der Bibliothek im gleichen Leseraster ist.

Die Bindungspartnersuche mit dem Köderkonstrukt DB-L1-ID +½TM kam zu keinem Ergebnis. In keiner der sechs durchgeführten *Screening*-Runden konnte Wachstum von Hefen beobachtet werden.

| GenID | Gen-Kurzform | Protein-Kurzform | Offizieller Name |
|--------|---------------|-----------------------|---|
| 21991 | Tpi1 | TIM | triosephosphate isomerase 1 |
| 105787 | Prkaa1 | AMPK | protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit |
| 228033 | Atp5g3 | ATPase Untereinheit C | ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 3 |
| 15481 | Hspa8 | HSC70 | heat shock protein 8 |
| 12313 | Calm1 | CALM1 | calmodulin 1 |
| 68585 | Rtn4 | NOGO | reticulon 4 |
| 13010 | Cst3 | Cystatin 3 | Cystatin C |
| 78832 | 2700078E11Rik | - | RIKEN cDNA 2700078E11 gene |

Tabelle 4.1: Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid *screens* mit L1-ID als Köderprotein.

Wie bei der Beschreibung der Methode erwähnt, spiegelt die Größe einer Kolonie auf SC-Leu-Trp-His + 3AT die Interaktionsstärke zwischen DB-X und AD-Y wieder. Im direkten

Kapitel 4 Ergebnisse

Vergleich mit den Kontrollhefestämmen (s. 3.1.9) sind alle observierten Interaktionen als schwach einzuordnen.

Im Folgenden möchte ich die potentiellen Bindungspartner der L1-ID vorstellen und beleuchten, welche weiteren Versuche unternommen wurden, um die mögliche Interaktion mit weiter führenden Methoden zu verifizieren.

Studien zur Interaktion von L1 mit Tpi1, Prkaa1 und Atp5g3 unter Berücksichtigung eines veränderten Energie- und Fettstoffwechsels in der L1-defizienten Maus wurden in Diplomarbeiten (Jabs, 2007; Tappenbeck, 2008) durchgeführt.

| Protein | Funktion / Lokalisierung | Referenz |
|-----------------------|--|--------------------------------|
| TIM | Katalysiert die Aldose-Ketose Isomerisierung von Dihydroxyacetone-Phosphat und Glycerinaldehyd 3-Phosphat. | (Cheng et al., 1990) |
| AMPK | Regulierung der Fettsäuresynthese durch die Phosphorylierung von Acetyl-CoA Carboxylase. | (Stapleton et al., 1996) |
| ATPase Untereinheit C | Mitochondriale ATP-Synthase. Produziert ATP aus ADP in Gegenwart eines Protonengradienten. | (Yan et al., 1994) |
| HSC70 | Chaperon mit ATPase-Funktion für den Abbau von Stachelsaumbälchen (<i>Clathrin coated vesicles</i>). | (Giebel et al., 1988) |
| CALM1 | Calcium-bindendes Protein mit wichtigen Funktionen im Zellzyklus sowie in der Signaltransduktion. | (Wawrzynczak and Perham, 1984) |
| NOGO | Wirksamer Inhibitor des Neuritenwachstums. Verhindert axonale Regeneration im ZNS. | (Tozaki et al., 2002) |
| Cystatin 3 | Reguliert als Inhibitor von Cystein-Proteasen die lokale Enzymaktivität. | (Huh et al., 1995) |

Tabelle 4.2: Funktionen der potentiellen L1-ID Bindungspartner aus dem Y2H-screen.

4.6.2 CROSSLINKING MIT L1-PEPTIDEN

Um Bindungspartner von L1 im Zellkern zu identifizieren, wurden Peptide synthetisiert, welche von den Sequenzen her die gesamte intrazelluläre Domäne von L1 überspannen. Beim Design der Peptide wurde darauf geachtet, dass kein vorhandenes Motiv zerstört oder durch das Einbringen eines aminoterminalen Cysteins kein neues Motiv generiert wird. Wie in Kapitel 3.1.10 beschrieben, wurde der Crosslinker *ProFound™ Mts-Atf-Biotin* an die Peptide gekoppelt und ein *crosslinking* in einer Kernfraktion durchgeführt. Biotinylierte

Kapitel 4 Ergebnisse

Proteine wurden im Anschluss mit Streptavidin-*beads* aufgereinigt und im Immunblot mittels Avidin-HRP und im Coomassie-Gel analysiert.

```
1  CFIKRSKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETGE
2  CRPMKDETGEYRSLESDNEEKAFGSSQPSLNGDIK
3a CDIKPLGSDDSLADYGGGSVD
3b CSVDVQFNEDGSFIGQYSGK
4  CSGKKEKEAAGGNDSSGATSPINPAVALE
```

Abbildung 4.27: Sequenzen der synthetisierten L1-Peptide.

Die Peptide haben überlappende Sequenzen, um keine potentiellen Motive zu zerstören. Aminoterminal besitzt jedes Peptid ein Cystein zur Kopplung eines *Crosslinkers*.

Mit diesem Versuchsansatz konnten keine neuen Bindungspartner der L1-ID identifiziert werden. Im Immunblot konnten biotinylierte Proteine detektiert werden, wenngleich die Bandenmuster der fünf Köder-Peptide keine nennenswerten Unterschiede zu Tage brachten (Ergebnis nicht gezeigt). Die Analyse der biotinylierten Proteine war nicht möglich, da diese im Coomassie-Gel unter dem Detektionsgrenze waren.

4.6.3 AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE UND MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSEN

Um Bindungspartner der intrazellulären Domäne von L1 zu identifizieren, wurde die Affinitätschromatographie als eine weitere Methode verwendet. Ausführliche Informationen zur Durchführung siehe 3.1.1. Die rekombinant exprimierten intrazellulären Domänen der Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM140 wurden an eine Matrix gekoppelt. Die intrazellulären Domänen sind von der Anzahl der Aminosäuren und dem Expressionssystem gut vergleichbar (s.

Abbildung 4.29) und können als gegenseitige Kontrollen verwendet werden. In identischen Säulen und unter gleichen Bedingungen wurden die affinitätschromatographischen Untersuchungen parallel durchgeführt. Bei der Auswahl zu analysierender Banden im Coomassie-Gel wurden nur solche in Betracht gezogen, die in der Kontrolle nicht auftraten. Somit sollte sichergestellt sein, dass es sich bei dem zu analysierenden Protein nicht um einen falsch-positiven Liganden handelt.

4.6.3.1 GENERIERUNG EINES PROKARYOTISCHEN EXPRESSIONSVEKTORS DER L1-ID

Die intrazelluläre Domäne des Zelladhäsionsmoleküls L1 wurde aus muriner cDNS per PCR amplifiziert und über T/A-Klonierung in pGEM[®]-T Easy (Promega) kloniert und sequenziert. Anschließend wurde die Sequenz über eingefügte Restriktionsschnittstellen (BamHI und HindIII) ausgeschnitten, aufgereinigt und in den prokaryotischen Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen) kloniert. Unter Verwendung des *E. coli* Expressionsstamms M15 konnte nun in Anwesenheit von Ampicillin und Kanamycin nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG die lösliche L1-ID mit N-terminalem His-tag exprimiert werden.

Eine Besonderheit dieses Konstrukts liegt darin, dass der N-Terminus, welcher der vorhergesagte Anfang der L1-ID ist, um drei Aminosäuren (CFI) verlängert wurde. Somit enthält das exprimierte Protein ein Cystein, welches durch die Sulfhydrylgruppe eine effektive Kopplungsmöglichkeit an sulfhydrylreaktive Methanthiosulfonat-Gruppen (Mts) für biochemische *Crosslinker* bietet (s. 3.1.10).

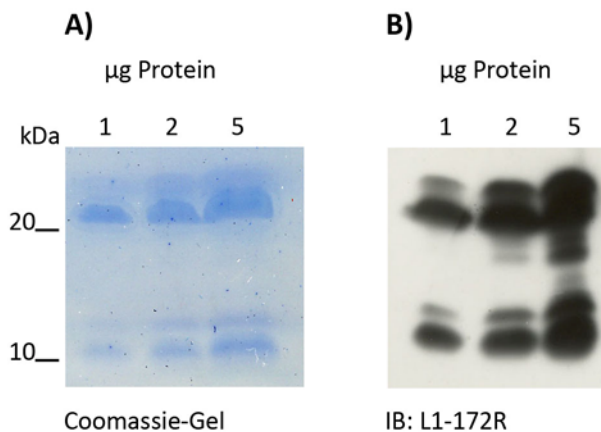


Abbildung 4.28: Qualitative Analyse von aufgereinigter, rekombinanter L1-ID.

Es wurden 1, 2 und 5 µg aufgereinigter L1-ID über ein SDS-Gel aufgetrennt. **A)** Eine Coomassie-Färbung zeigt L1-ID Mono- und Dimere. **B)** Im Immunblot mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von L1 (s. Tab. 2.14; L1-172R, Covance) bestätigt sich die Reaktivität der L1-ID mit dem Antikörper.

Das His-markierte Protein L1-ID lässt sich problemlos in großem Maßstab exprimieren und aufreinigen. Im Kontrollgel läuft das Protein bei 20 kDa, zu sehen im Coomassie-gefärbten Gel sowie im Immunblot mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von L1 (s. Tab. 2.14; L1-172R, Covance). Im Immunblot wird weiterhin deutlich, dass die rekombinante L1-ID Homodimere und im geringen Umfang auch Multimere bildet.

Kapitel 4 Ergebnisse

L1-ICD (pQE-30)

MRGSHHHHHHGSCFIKRSKGGKYSVKDKEDTQVDSEARPMKDETFGEYRSLESNDNEEKAFGSSQPSLN
GDIKPLGSDDSLADYGGSDVQVFNEDGSFIGQYSGKKEKEAAGGNDSSGATSPINPAVALE

NCAM140-ICD (pQE-30)

MRGSHHHHHHGSDITCYFLNKCGLLMCIAVNLCGKAGPGAKGKDMEEGKAAF~~SKDESKEPIVEVRTEE~~
ERTPNHDGGKHTEPNETTPLTEPEKGPVETKSEPQSEAKPAPTEVKTVPNEATQTKENESKA

Abbildung 4.29: Aminosäuresequenzen der L1- und NCAM140-ID pQE-30 Konstrukte im Überblick.

L1-ID (P11627) AS 1144-1260. NCAM140-ID (P13596) AS 740-858. Der N-terminale 6xHis-tag ist unterstrichen dargestellt.

4.6.3.2 ERGEBNISSE DER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Es wurden drei affinitätschromatographische Untersuchungen aus folgenden Gehirnfractionen durchgeführt: Zytosol und solubilisierte Gesamtmembranfraction (in Zusammenarbeit mit C. Figge, ZMNH; Ergebnisse der solubilisierten Gesamtmembranfraction werden nicht gezeigt) sowie Zellkernextrakt aus dem Gehirn 7 Tage alter Mäuse.

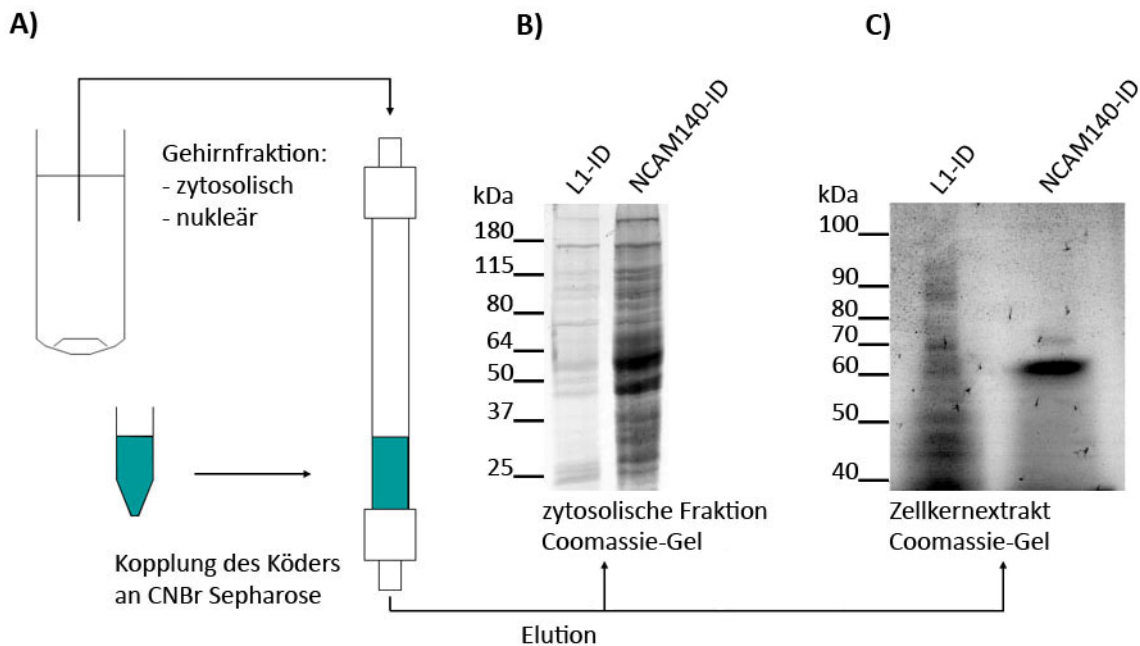


Abbildung 4.30: Schema der Affinitätschromatographie.

A) Schematischer Aufbau und Durchführung der Affinitätschromatographie. **B)** Coomassie-gefärbte Banden der Eluate für L1- und NCAM140-ID, erhalten aus einer zytosolischen Gehirnfraction und **C)** aus einem Zellkernextrakt aus Gehirn.

Kapitel 4 Ergebnisse

Die eluierten Proteine wurden auf ein möglichst kleines Volumen eingengt und anschließend über ein SDS-Gel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt (s. Abbildung 4.30 B und C). Bei der Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass das Bandenmuster der Liganden aus der zytosolischen Fraktion von L1- und NCAM140-ID sehr ähnlich ist. Die Gesamtmenge an eluierten Proteinen war für NCAM140-ID größer als für L1. Es konnten vier Banden ausgeschnitten werden, welche spezifisch für L1 waren. Die Tabellen 4.3 und 4.5 geben eine Übersicht über die identifizierten L1-Liganden.

Die aufgetrennten Liganden für L1 und NCAM140 aus Zellkernextrakt zeigen eine andere Verteilung. Für L1 konnten neun spezifische Banden im Bereich zwischen 100 – 35 kDa ausgeschnitten und analysiert werden. Für NCAM140 gibt es nur zwei sichtbare Banden, von denen keine mit L1-Liganden interferiert. Die Tabellen 4.4 und 4.6 geben eine erste Übersicht über die identifizierten L1-Liganden.

| Größe der ausgeschnittenen Bande (kDa) | Abkürzung | Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse | Entrez Gene | Größe des Proteins (kDa) |
|--|---------------------------|--|-------------|--------------------------|
| 26 | Nudt21/ CPSF5 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21 | 68219 | 25 |
| 28 | Prosc | proline synthetase co-transcribed | 114863 | 30 |
| 28 | Ywhag/ 14-3-3 γ | 3-monooxygenase / tryptophan 5-monooxygenase activation protein | 22628 | 27 |
| 28 | Ywhaz/ 14-3-3 ζ | tyrosine 3-monooxygenase / tryptophan 5-monooxygenase activation protein | 22631 | 27 |
| 50 | Ckb | creatine kinase B-type | 12709 | 42 |
| 90 | Eef2 | eukaryotic translation elongation factor 2 | 13629 | 94 |
| 90 | Dnm1 | dynamamin 1 | 13429 | 95 |

Tabelle 4.3: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen der zytosolischen Fraktion

Kapitel 4 Ergebnisse

| Größe der ausgeschnittenen Bande (kDa) | Abkürzung | Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse | Entrez Gene | Größe des Proteins (kDa) |
|--|-----------|--|-------------|--------------------------|
| 100 | Kpnb1 | karyopherin (importin) beta 1 | 16211 | 97 |
| 100 | Nup93 | nucleoporin 93 | 71805 | 93 |
| 60 | Hspa8 | heat shock protein 8 | 15481 | 70 |
| 35 | Syt1 | synaptotagmin I | 20979 | 46 |
| 35 | Hnrnpa1 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | 15382 | 41 |
| 35 | Hnrpa3 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 | 229279 | 42 |
| 35 | Hnrnpa2b1 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 | 53379 | 39 |
| 100 | NonO | non-POU-domain-containing, octamer binding protein | 53610 | 54 |
| 90 | Top1 | topoisomerase (DNA) I | 21969 | 85 |
| 60 | Pspc1 | paraspeckle protein 1 | 66645 | 58 |
| 60 | Hist1h1e | histone cluster 1, H1e | 50709 | 24 |
| 50 | Mecp2 | methyl CpG binding protein 2 | 17257 | 53 |
| 35 | Wdr5 | WD repeat domain 5 | 140858 | 37 |
| 100 | SFPQ | splicing factor proline/glutamine rich | 71514 | 80 |

Tabelle 4.4: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen der Zellkern-Fraktion

| Protein | Funktion / Lokalisierung | Referenz |
|-----------------------|--|---|
| Nudt21/CPSF5 | Komponente des <i>cleavage factor Im</i> (CFIm) Komplexes, der eine Schlüsselfunktion bei der Pre-mRNS 3'-Prozessierung hat. Nukleus, <i>Paraspeckles</i> | (Ruegsegger et al., 1996) |
| Prosc | <i>Proline synthetase co-transcribed bacterial homolog protein</i> . Zytoplasma, Nukleus? | (Ikegawa et al., 1999) |
| Ywhag/14-3-3 γ | Adapterprotein zur Regulierung eines großen Spektrums an generellen und spezialisierten Signalwegen. Bindet an eine Vielzahl von Partnern, meistens über ein Phosphoserin- oder Phosphothreoninmotiv. Eine Bindung resultiert in der Modulation der Aktivität des Bindungspartners. Zytoplasma | (Morrison, 1994; Roth et al., 1994) |
| Ywhaz/14-3-3 ζ | Adapterprotein zur Regulierung eines großen Spektrums an generellen und spezialisierten Signalwegen. Bindet an eine Vielzahl von Partnern, meistens über ein Phosphoserin- oder Phosphothreoninmotiv. Eine Bindung resultiert in der Modulation der Aktivität des Bindungspartners. Zytoplasma | (Zupan et al., 1992; Furukawa et al., 1993) |
| Ckb | Katalysiert reversible den Phosphattransfer zwischen ATP und verschiedenen Phosphogenen. CKB spielt eine zentrale Rolle bei der Energiebereitstellung in Geweben mit schwankendem Energiebedarf, wie Skelettmuskeln, Herz, Gehirn und Spermien. Zytoplasma | (Foxall and Emery, 1975) |
| Eef2 | Essentieller Faktor für die Proteinsynthese, welcher die GTP-abhängige Translokation von im Entstehen begriffenen Proteinen von der A-Stelle zur P-Stelle des Ribosoms fördert. Zytoplasma | (Kaneda et al., 1987; Nairn and Palfrey, |

Kapitel 4 Ergebnisse

| Protein | Funktion / Lokalisierung | Referenz |
|-----------|---|------------------------------|
| Dynamin-1 | Mikrotubuli-assoziierte GTPase, und Motorprotein. Spielt eine wichtige Rolle bei der Endozytose. Zytoplasma | (van der Bliek et al., 1993) |

Tabelle 4.5: Mögliche zytosolische L1-Bindepartner - Funktion, Lokalisierung und Referenz

| Protein | Funktion / Lokalisierung | Referenz |
|------------------|--|---|
| Importin β | <p>Aufgabe im Kernimport von Proteinen, entweder als autonomer Kernimportrezeptor, oder zusammen mit einem Adapterprotein wie Importin alpha, welches an Kernlokalisierungssequenzen (NLS) in Cargo-Substraten bindet. Kann autonom auch an NLS-Rezeptor fungieren.</p> <p>Das Andocken von Importin/Substrat-Komplexen an die Kernpore wird mediiert durch Kpnb1 und die Bindung von FxFG-Wiederholungen in Nucleoporin und anschließender Translozierung durch die Kernpore durch einen energieabhängigen, Ran-benötigenden Mechanismus.</p> <p>Auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore bindet Ran an Importin beta, was den Transportkomplex auflöst. Importin alpha und beta werden aus dem Zellkern ins Zytosol re-exportiert wodurch die Hydrolyse von GTP Ran von Importin beta entfernt wird.</p> | (Mukaigawa and Nayak, 1991; Bukrinsky et al., 1992) |
| Nup93 | Bestandteil des Nucleoporin-Komplexes. Ist wichtig für den richtigen Aufbau der Kernporen. Komponente des p62 Komplexes, weiter bestehend aus NUP62 und NUP52. Interagiert auch mit NUP205. | (Nagase et al., 1995); (Grandi et al., 1997) |
| Hspa8 | Aufgabe als Chaperon. Ist im Zytoplasma lokalisiert, transloziert schnell in den Zellkern, besonders in Nucleoli, nach Hitzeschock. | (Welch and Mizzen, 1988; Ahmad et al., 1990) |
| Syt1 | Synaptogamin ist ein membranständiges Protein in synaptischen Vesikeln, welches vermutlich als Kalziumsensor und als Regulator von Membraninteraktionen im Prozess des Vesikelverkehrs und der Exozytose dient. Synaptogamin I ist auch an der Ausschüttung von Neurotransmittern an der Synapse beteiligt. Bindet Neurexine, Syntaxin und AP2. | (Geppert et al., 1991; Perin et al., 1991; Fernandez-Chacon et al., 2001) |
| Hnrnpa1 | Involviert beim Packen der Pre-mRNS in hnRNP-Partikel und beim Transport von poly(A) mRNS vom Zellkern ins Zytoplasma. Hat ausgeprägte Bindungseigenschaften an Nucleinsäuren. Lokalisiert im Nucleoplasma wie im Zytoplasma. | (Riva et al., 1986; Buvoli et al., 1988) |
| Hnrpa3 | Spielt eine Rolle beim zytoplasmatischen Transport von RNS. Interagiert mit A2RE. Kann u.U. am Pre-mRNS Splicen beteiligt sein, als Untereinheit des Spliceosome C Komplexes. | (Lairmore et al., 1993; Ma et al., 2002) |
| Hnrnpa2b1 | Bildet Proteinkomplexe (Ribonucleosomen) mit mindestens 20 anderen hnRNP und heterogener nukleärer RNS im Zellkern. Identifiziert als Mitglied des Spliceosom Komplex C. | (Kumar et al., 1986; Burd et al., 1989) |
| NonO | NonO ist ein DNS- und RNS-bindendes Protein, welches in viele nukleare Prozesse, wie z.B. dem Pre-RNS Splicing als Heterodimer | (Yang et al., 1993; Zhang et |

Kapitel 4 Ergebnisse

| Protein | Funktion / Lokalisierung | Referenz |
|----------|--|---|
| | zusammen mit SFPQ, involviert ist. Das SFPQ-NonO-Heteromer ist auch im Gespräch, die Topoisomerase I beim Abwickeln der DNS zu unterstützen. Der Komplex aus SFPQ-NonO-NR5A1/SF-1 bindet an den CYP17 Promotor und reguliert die basale sowie cAMP-abhängige transkriptionelle Aktivität. | al., 1993) |
| Top1 | Die Topoisomerase I ist ein Enzym, welches für die Topologie von DNA-Molekülen verantwortlich ist. Um den bei Transkription und Replikation auftretenden Torsionskräften entgegen zu wirken, kann Top1 Einzelstrangbrüche bewirken, welche nach Abgang des Enzyms von der DNS wieder verschlossen werden. | (Durban et al., 1985; D'Arpa et al., 1988) |
| Pspc1 | Reguliert zusammen mit NonO und STPQ, Androgenrezeptor-medierte Aktivierung der Transkription in Sertolizellen. Co-lokalisiert mit NonO und SFPQ in <i>Paraspeckles</i> . | (Fox et al., 2002; Kuwahara et al., 2006) |
| Hist1h1e | Histon H1 ist für die Kondensation von Nukleosomen zu Chromatin notwendig. | (Ohe et al., 1986; Yasutomo et al., 1991) |
| MeCP2 | Chromosomales Protein, das methylierte DNS bindet. Mediiert transkriptionelle Respression durch die Interaktion mit Histon Deacetylase und dem Co-Repressor SIN3A. Mutationen in dem Gen MECP2 verursachen das Rett-Syndrom, eine progressive neurologische Störung. | (Meehan et al., 1992) |
| Wdr5 | Wdr5 ist aus 7 WD-Domänen aufgebaut. Hierbei handelt es sich um hochkonservierte, 40 Aminosäuren große Domänen, mit einem zentralen Trp-Asp Motif. Interagiert mit HCFC1 und dem SET1-Komplex, reguliert den Zellzyklus und kann Transkription aktivieren oder reprimieren. Beschleunigt Osteoblasten-Differenzierung. | (Strausberg et al., 2002; Wysocka et al., 2003; Gori and Demay, 2004) |

Tabelle 4.6: Mögliche L1-Bindungspartner im Zellkern – Funktion, Lokalisierung und Referenzen

4.6.4 VERIFIZIERUNG DER L1-BINDUNGSPARTNER AUS DER AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

Nachdem mittels Affinitätschromatographie potentielle Bindungspartner der L1-ID im Zellkern identifiziert werden konnten, mussten diese Daten verifiziert werden. Dies wurde durch gezielte Bindungsstudien mit spezifischen Antikörpern erreicht.

Die Abbildung 4.31 zeigt die Ergebnisse von Pulldown-Experimenten mit den intrazellulären Domänen von L1 sowie von NCAM140 aus einer murinen Kernfraktion.

Kapitel 4 Ergebnisse

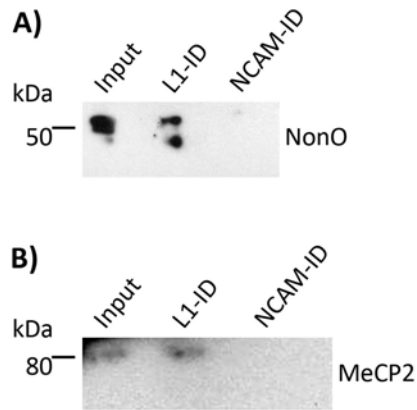


Abbildung 4.31: Pulldown Experimente zur Verifizierung der Affinitätschromatographie-Daten.

A) Pulldown mit L1-ID und NCAM140-ID aus einer Kernfraktion aus Mausgehirn. Detektion mit NonO-Antikörper. **B)** Pulldown mit L1-ID und NCAM140-ID aus einer Kernfraktion aus Mausgehirn. Detektion mit MeCP2-Antikörper.

Abbildung A zeigt die spezifische Bindung von NonO an die L1-ID. Das von L1-ID gebundene NonO stimmt mit dem Signal im Input überein. Die NCAM-Kontrolle ist negativ. Ein ähnliches Bild ist für MeCP2 in Abbildung 4.31 B zu sehen. Das von L1-ID gebundene MeCP2 stimmt mit dem Signal im Input überein, während die NCAM-Kontrolle negativ ist.

Desweiteren wurde versucht, mit den spezifischen Antikörpern gegen NonO, MeCP2, HP1 γ sowie SFPQ L1 aus einer murinen Kernfraktion zu präzipitieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.32 dargestellt. In Abbildung A sind die Immunpräzipitate von NonO, MeCP2 und HP1 γ im Immunblot mit dem Antikörper L1-172R analysiert. Zu sehen ist eine deutliche Bindung von L1-30 kDa an HP1 γ und MeCP2 sowie eine schwache Bindung an NonO.

Die Abbildung 4.32 C bestätigt die Bindung von SFPQ an L1. Da der Antikörper gegen SFPQ aus Maus ist, konnte der Antikörper L1-172R (ebenfalls Maus) nicht für die Detektion eingesetzt werden. Stattdessen wurde der Antikörper L1-557 verwendet, welcher ebenfalls L1 im Zellkern detektiert (vergleiche Inputs A und B).

Kapitel 4 Ergebnisse

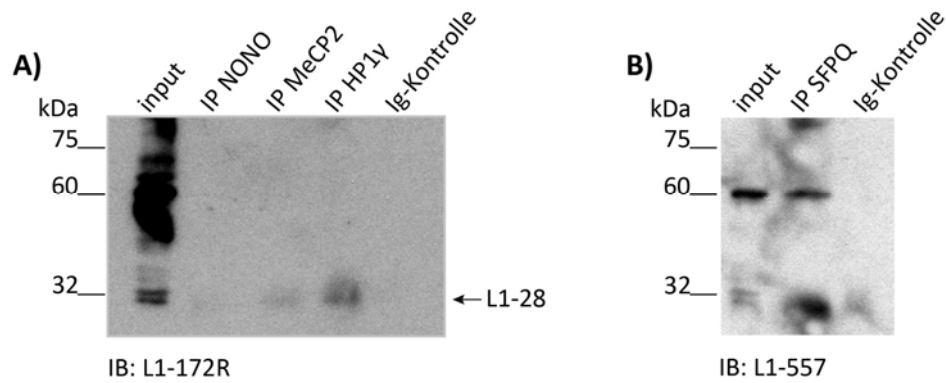


Abbildung 4.32: Co-Immunpräzipitation mit L1 Bindungspartnern aus dem Zellkern.

A) Aus einer Kernfraktion 7 Tage alter wildtypischer Mäuse wurde mit Antikörpern gegen potentielle Bindungspartner der intrazellulären Domäne von L1 eine Immunpräzipitation mittels Nuclear Co-IP Kit (Active Motif) durchgeführt und mit dem Antikörper L1-172R (Maus) detektiert. Pro Immunpräzipitation wurde 100 µg Gesamtprotein eingesetzt, die Menge an Antikörper und Kontroll-IgGs betrug 10 µg. Die Antikörper gegen NonO, MeCP2 und HP1 γ entstammen der Spezies Kaninchen. **B)** Bedingungen der Immunpräzipitation wie unter A) beschrieben. Der Antikörper gegen SFPQ entstammt der Spezies Maus. Detektiert wurde mit dem Antikörper L1-557 (Ratte).

Dieses Experiment bestätigt die Bindung der mittels Affinitätschromatographie identifizierten Proteine NonO, MeCP2 und SFPQ an L1. Desweiteren konnte die L1-ID mit dem Antikörper gegen HP1 γ präzipitiert werden, was die physiologische Bedeutung des C-terminalen Pentapeptid-Motivs (PxVxL) in L1 unterstreicht.

4.6.4.1 CO-LOKALISATION VON L1 MIT NUKLEAREN BINDUNGSPARTNERN

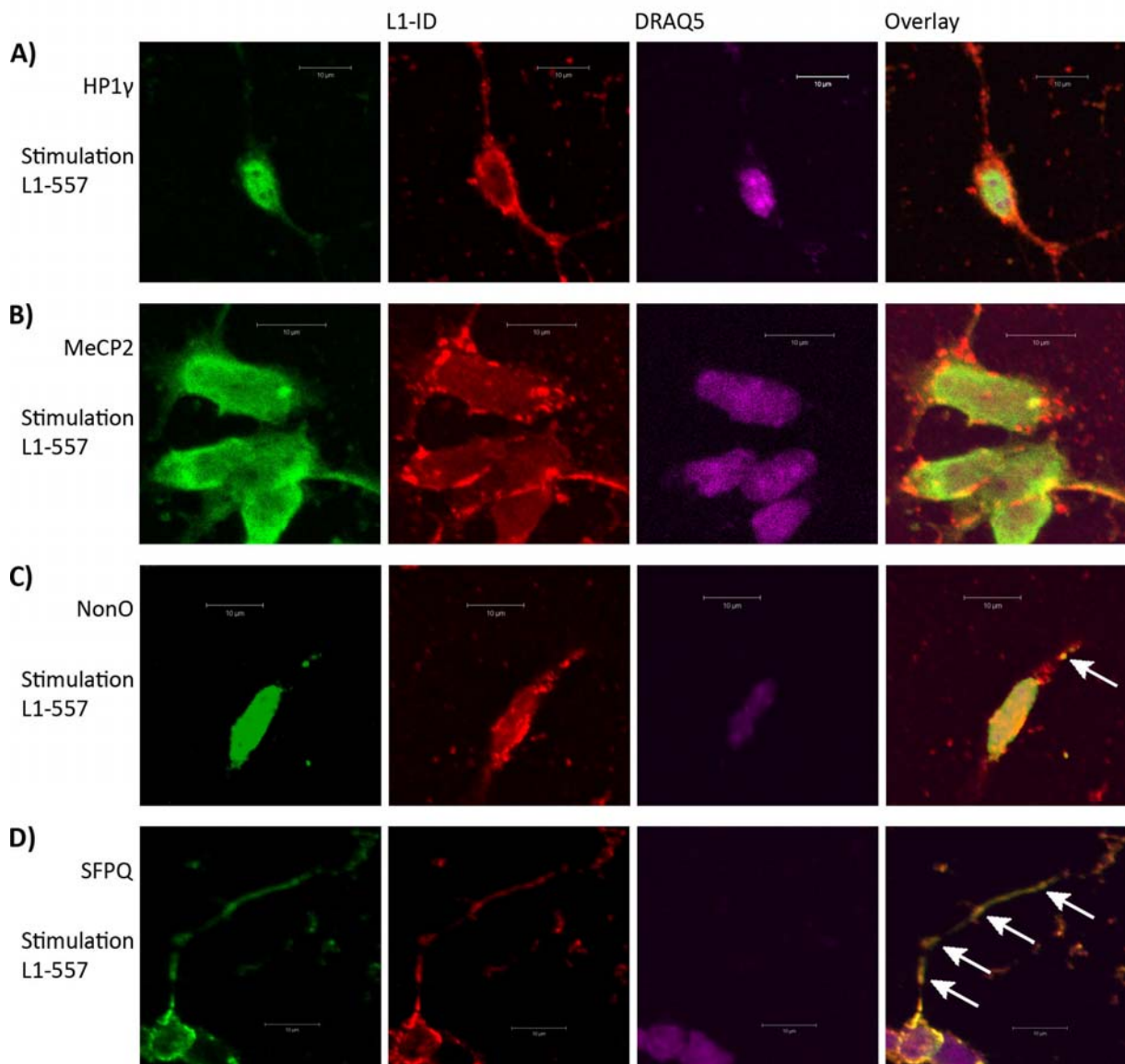


Abbildung 4.33: Immunhistochemische Untersuchung zur Co-Lokalisierung von L1-ID mit putativen Bindungspartnern in L1-557 stimulierten Kleinhirneuronen.

Unstimulierte sowie mit L1-557 stimulierte Kleinhirneurone wurden mit Antikörpern gegen die L1-ID (rot) sowie mit Antikörpern gegen HP1 γ , MeCP2, NonO und SFPQ (grün) gefärbt. Als Kernmarker wurde DRAQ5 (violett) verwendet. **A – D)** Die mit L1-557 stimulierten Zellen zeigen eine deutliche L1-Färbung im Zellkern. Die Färbungen zeigen eine Co-Lokalisierung von L1 mit HP1 γ , MeCP2, NonO und SFPQ nach L1-557 Stimulation im Zellkern.

Die mit L1-557 stimulierten Kleinhirneurone zeigen eine deutliche Kernlokalisierung der L1-ID, welche in Abbildung 4.33 in rot dargestellt ist. Die putativen L1-Bindungspartner HP1 γ , MeCP2, NonO und SFPQ sind als nukleare Proteine bekannt und in grün dargestellt.

Die Färbung von L1 und HP1 γ ist in Abbildung 4.33 A dargestellt und zeigt eine deutliche Co-Lokalisierung der beiden Proteine im Zellkern.

MeCP2, NonO und SFPQ sind in kultivierten Kleinhirnneuronen nicht ausschließlich im Zellkern, sondern auch zytosolisch und axonal lokalisiert. Die Färbung von MeCP2 und L1 überlagert sich in gefärbten Kleinhirnneuronen im Zytosol wie auch im Zellkern deutlich.

NonO und L1 sind in gefärbten Kleinhirnneuronen im Zellkern, Zytosol sowie in distinkten Punkten (siehe Pfeil, C) co-lokalisiert. Das gleiche gilt für die immunhistochemische Untersuchung von SFPQ und L1. Die untersuchten Proteine zeigen eine Co-Lokalisation im Zellkern sowie im Axon (siehe Pfeile, D).

4.6.5 CO-LOKALISATION VON L1 UND PSP1 IN *PARASPECKLES*?

Das Protein PSP1 war die erste identifizierte Komponente von *Paraspeckles*, eines subzellulären Kompartiments im Zellkern (Fox et al., 2002). Da PSP1 sowie NonO und SFPQ als Bindungspartner der L1-ID identifiziert wurden, soll auch überprüft werden, ob *Paraspeckles* in primären Kleinhirnneuronen auftreten und L1 mit diesen co-lokalisiert.

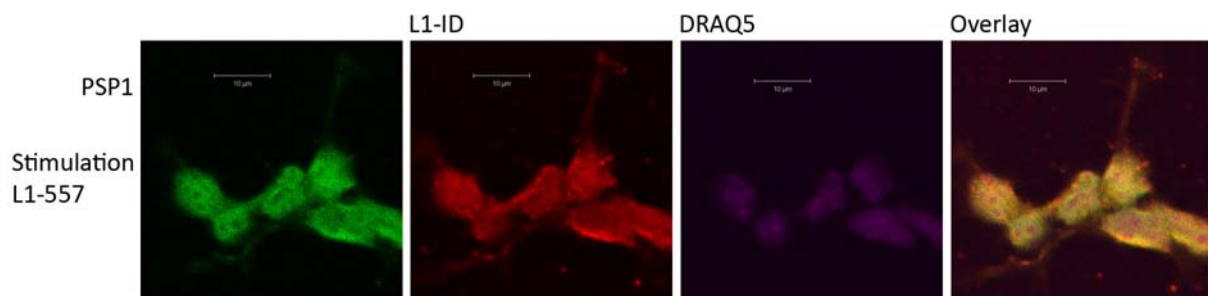


Abbildung 4.34: Färbung von *Paraspeckle* Protein 1 in L1-557 stimulierten Neuronen.

Immunhistochemische Färbung von PSP1 (grün) und L1-ID (rot) in L1-557 stimulierten Kleinhirnneuronen. Die Zellen wurden nach dem Protokoll 3.3.4.1 behandelt. PSP1 ist in Neuronen exprimiert, kann allerdings nicht in distinkten Punkten (*Paraspeckles*) detektiert werden. PSP1 ist im Zytosol sowie im Nukleus verteilt. Eine Co-Lokalisation von PSP1 und L1-ID ist nach L1-557 Stimulation im Zellkern sichtbar.

Die Abbildung 4.34 zeigt Kleinhirnneurone, welche mit den Antikörpern gegen PSP1 (grün) und L1-172R (rot), nach Protokoll 3.3.4.1 behandelt wurden. PSP1 ist erwartungsgemäß exprimiert und im Zytosol sowie im Nukleus lokalisiert. Es sind keine *Paraspeckles* in Kleinhirnneuronen zu beobachten. Nach L1-557 Antikörperstimulation ist eine Ko-Lokalisation von PSP1 und L1 im Zellkern zu sehen.

Kapitel 5 DISKUSSION

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen die Translokation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1 in den Zellkern von Neuronen sowie Studien zur proteolytischen Prozessierung von L1 und deren Einfluss auf den Kernimport. Desweiteren werden die zellulären Kompartimente der L1-Prozessierung diskutiert und der mögliche Einfluss von post-translationalen Modifikationen auf den L1-Kernimport. Im letzten Abschnitt der Diskussion werden die identifizierten nuklearen L1-Interaktionspartner in einen biologischen Zusammenhang gebracht und der mögliche Einfluss von L1 auf die Transkription von neuronalen Genen sowie auf den mRNA-Transport erörtert.

Im Rahmen dieser Arbeit kann die Translokation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1 in den Zellkern von L1-exprimierenden Zellen im zentralen Nervensystem von Mäusen zum ersten Mal gezeigt werden.

L1-Stimulation von Kleinhirnneuronen führt zu einer verstärkten Kernlokalisierung von L1.

Die immunhistochemische Untersuchung der L1-Kernlokalisierung in primären Kleinhirnneuronen konnte mittels eines Antikörpers, welcher gegen die intrazelluläre L1-Domäne gerichtet ist, ein spezifisches L1-Signal im Zellkern zeigen (s. 4.1.1). Die Signalintensität, welche mit der Anzahl an L1-Molekülen im Zellkern korreliert, ist in Kleinhirnneuronen, welche dissoziiert und unter Serumzug kultiviert wurden, als schwach einzustufen. Im Serum enthaltenes L1, L1-Bindungspartner sowie wachstumsfördernde Zell-Zell-Kontakte, welche für die L1-Signaltransduktion und die Kernlokalisierung förderlich sind (Kadmon et al., 1990b; Holm et al., 1995; Kleene et al., 2001), sind unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht vorhanden.

Werden diese Zellen mit einem monoklonalen Antikörper (L1-557) gegen die extrazelluläre Domäne von L1 stimuliert, ist eine deutliche Zunahme von L1 im Zellkern zu beobachten (s. Abb. 4.1). Dieser Versuch kann die quantitative Zunahme von in den Zellkern transloziertem L1 zeigen, nicht aber die Form, in der L1 im Nukleus vorliegt.

Antikörperstimulation führt zu einer Kreuzvernetzung von Proteinen, d.h. das räumliche

Zusammenbringen von Proteinen, was Signaltransduktions-Vorgänge anstoßen kann. L1 kann homophil in *trans* (L1 auf unterschiedlichen Zellen) oder *cis* (auf der selben Zelle) interagieren (Kadmon and Altevogt, 1997; Kamiguchi and Lemmon, 1997; Brummendorf et al., 1998). Die Antikörper-Kreuzvernetzung von L1 bringt intermolekular Proteine auf einer Zelle zusammen, was u.a. in der Förderung des L1-abhängigen Neuritenwachstums resultieren kann (Appel et al., 1995). So ist das Epitop des Antikörpers L1-557 in der dritten Fn-3 Domäne von besonderer Bedeutung, da es die L1-Signaltransduktion stimuliert (Appel et al., 1995). Andere monoklonale L1-Antikörper gegen unterschiedliche extrazelluläre Epitope zeigen hingegen keinen Effekt auf das L1-abhängige Neuritenwachstum und den L1-Signalweg.

Um zu prüfen, ob der Antikörper L1-557 die homophile *trans* L1-Interaktion mimikriert, wurden SH-SY5Y Zellen mit L1-Fc behandelt und der Einfluss auf die L1-Kernlokalisierung untersucht (s. 4.2.4.3). Dieser Versuch zeigte, dass L1-Fc, ähnlich wie L1-557, den Kernimport stimuliert. Insbesondere die Fragmente L1-70 und L1-60 werden vermehrt in den Zellkern transportiert. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass der Antikörper L1-557 die homophile L1-Interaktion mimikriert und dass L1-Fc und L1-557 die gleiche L1-Signalkaskade aktivieren.

Die biochemische Untersuchung von Gehirnhomogenat, Vesikelfraktion und Kernfraktion mit einem Antikörper gegen den Carboxyterminus von L1 zeigt eine große Anzahl an L1-Banden (s. Abb. 4.3 A). Diese Banden entstehen durch die regulierte Prozessierung von L1 im Nervensystem (Gutwein et al., 2000; Kalus et al., 2003; Gutwein et al., 2005; Kalus et al., 2006). Unterschiedliche Gehirnsubfraktionen zeigen distinkte L1-Spaltprodukte. So kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass carboxyterminale L1-Fragmente mit den Molekulargewichten 70, 32, 28 und 15 kDa in einer Kernfraktion aus Mausgehirn detektierbar sind, nicht aber Volle-Länge L1 (s. Abb. 4.5). Die in einer Kernfraktion detektierbaren L1-Fragmente sind ebenso in einer Vesikelfraktion aus Gehirn angereichert. Dieser direkte Vergleich der L1-Banden führte zu der Annahme, dass endozytisiertes L1 membranständig über Vesikel in den Zellkern gelangt.

Die Analyse von Kernfraktionen aus den Gehirnregionen Cerebellum, Hippocampus und Cortex im Immunblot mittels L1-Antikörper 557 (bindet die dritte Fn-3 Domäne) und 172R (detektiert die intrazelluläre L1-Domäne) machte deutlich, dass L1 im Zellkern aller untersuchten Gehirnareale detektierbar ist. Der Antikörper L1-557 zeigte insbesondere in der nukleoplasmatischen Kernfraktion aus Kleinhirn die Form L1-60, welche in schwächerer Ausprägung auch im Hippocampus sowie im Cortex detektierbar waren. Eine Bande L1-70 ist in der nukleoplasmatischen Kernfraktion aus dem Kleinhirn detektierbar. Der Antikörper gegen die intrazelluläre L1-Domäne detektiert in den gleichen Fraktionen ebenfalls die Banden L1-60 und L1-70, wobei letztere deutlich stärker von Antikörper erkannt wird als durch L1-557. Die Ursache für die unterschiedliche Affinität der Antikörper zu L1-70 ist nicht klar. Es können weiterhin die löslichen Fragmente L1-45, L1-32 und L1-28 im Nukleoplasma aus Zellen des Kleinhirns sowie L1-45 im Cortex detektiert werden. Dieser Vergleich zeigt, dass L1 in den untersuchten Gehirnarealen in den Zellkernen der Zellen transloziert, insbesondere im Cerebellum.

Die Stimulation von Kleinhirnneuronen mit dem Antikörper L1-557 führt zu einem deutlichen Anstieg des L1-Kernimports. In Abb. 4.6 wird deutlich, dass die Formen L1-70 und L1-32 stimulierbar sind. Die Stimulation von Zellen mit unspezifischen Immunglobulinen aus Ratte zeigte in den Kontrollansätzen keinen Einfluss auf den L1-Kernimport. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der Immunhistochemie an Kleinhirnneuronen, in welchen ein quantitativer Anstieg des L1-Signals im Zellkern beobachtet wurde.

Die Stimulaton des *ectodomain shedding* führt nicht per se zu einer Stimulation der L1-Kernlokalisation. *Ectodomain shedding* kann durch die Behandlung von unphysiologischen Co-Aktivatoren wie Phorbol ester (Fitzgerald et al., 2000; Endres et al., 2003; Gasbarri et al., 2003) und Cholesterol entziehende Reagenzien wie Methyl- α -Cyclodextrin eingeleitet werden (Matthews et al., 2003; von Tresckow et al., 2004). Bekannte physiologische Coaktivatoren des *ectodomain sheddings* sind z.B. Cytokine und Wachstumsfaktoren (Yabkowitz et al., 1999; Lee and Wurtman, 2000). Die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren kann das *shedding* von Wachstumsfaktoren auslösen, welche wiederum zur Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie der EGF-Rezeptor führen (Baselga et al., 1996; Prenzel et al., 1999). Die Stimulation des *ectodomain sheddings* von L1 konnte durch

Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, Pervanadat, Methyl- α -Cyclodextrin und Ionomycin eingeleitet werden (Gutwein et al., 2000; Mechtersheimer et al., 2001; Gutwein et al., 2003; Maretzky et al., 2005; Stoeck et al., 2006a).

Die Stimulation von L1-transfizierten HEK293 Zellen mit Ionomycin zeigte einen Einfluss auf die L1-Prozessierung. In Abb. 4.8 A kann gezeigt werden, dass durch Ionomycin der γ -Sekretase-Schnitt und die Entstehung von L1-28 stimuliert werden kann. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen anderer Gruppen (Maretzky et al., 2005). Allerdings kann in SH-SY5Y Zellen gezeigt werden, dass die Ionomycin-Stimulation den L1-Kernimport nicht stimuliert (s. Abb. 4.8 B). Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass es eine Regulation des L1-Kernimports gibt, welche festlegt, welche L1-Fragmente in den Zellkern gelangen und welche nicht.

Einen ähnlichen Befund gibt es nach Glutamat-Stimulation von SH-SY5Y Zellen. Glutamat bewirkt eine deutliche Reduzierung des Oberflächen-L1 (s. Abb. 4.9), zeigt aber keinen Einfluss auf die L1-Kernlokalisierung. Das *shedding* von N-Cadherin konnte nach Glutamat-Stimulation in SH-SY5Y Zellen gezeigt werden (Uemura et al., 2006). Glutamat ist ein weiterer physiologischer Co-Aktivatoren des L1-*sheddings*.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der L1-Kernimport ein regulierter Prozess ist, der nicht durch unphysiologische Bedingungen begünstigt wird.

L1 ist Substrat der γ -Sekretase. In dieser Studie kann gezeigt werden, dass L1 ein Substrat der γ -Sekretase ist und die intrazelluläre L1-Domäne nach Prozessierung durch diese in den Zellkern von Neuronen transloziert.

In einem Proteolyseansatz (s. Abb. 4.12) mit Gehirnhomogenat kann in der zytosolischen Fraktion die Entstehung eines Fragments L1-45 mit einem Antikörper gegen die L1-ID detektiert werden. In Anwesenheit des γ -Sekretase Inhibitors DAPT wird die Bildung von L1-45 statistisch signifikant reduziert. Dies zeigt, dass die γ -Sekretase maßgeblich an der Entstehung der löslichen L1-ID im Zytosol beteiligt ist. Die Inhibierung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms durch MG132 führt zur Akkumulation des L1-Fragments mit dem Molekulargewicht von 45 kDa. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese L1-Form der Proteindegradation durch das Proteasom unterliegt.

Wird die L1-ID in HEK-Zellen überexprimiert, ist eine Kernlokalisierung des löslichen Fragments in immunhistochemischen Färbungen (s. Abb. 4.16 C) zu sehen. Werden die transfizierten Zellen fraktioniert und im Immunblot analysiert, ist L1 sehr schwer nachweisbar (s. Abb. 4.15). Diese Beobachtung spricht für einen schnellen Abbau der überexprimierten L1-ID und deckt sich mit Befunden anderer Studien, in denen eine schnelle Degradation von intrazellulären Domänen von γ -Sekretase prozessierten Proteinen durch zytosolische Proteasen beschrieben wurde (De Strooper et al., 1999; Edbauer et al., 2002). Es ist bekannt, dass der Kernimport der Proteine Notch (De Strooper et al., 1999), CD44 (Okamoto et al., 2001), APP (Esler and Wolfe, 2001), E-Cadherin (Marambaud et al., 2002), N-Cadherin (Marambaud et al., 2003; Reiss et al., 2005) und ErbB4 (Ni et al., 2001) von der Prozessierung durch ADAM abhängig ist (Landman and Kim, 2004). Die intrazelluläre Domäne jedes der genannten Proteine kann nach γ -Sekretase Schnitt in den Zellkern translozieren und die Transkription von Genen regulieren (Landman and Kim, 2004). Es wurde aus den Ergebnissen geschlossen, dass *ectodomain shedding* durch ADAM10 Voraussetzung für die regulierte Intra-Membran-Proteolyse (RIP) durch die γ -Sekretase ist. Der Einfluss des γ -Sekretase Inhibitors DAPT auf die L1-Kernlokalisierung zeigt allerdings, dass das Fragment L1-70 ohne vorhergehenden ADAM10 Schnitt ein Substrat der γ -Sekretase ist (s. Abb. 4.7 C).

Die Behandlung von primären Kleinhirnneuronen mit Proteaseinhibitoren gegen Metalloproteasen, Serinproteasen und die γ -Sekretase bei gleichzeitiger Antikörperstimulation zeigt einen deutlichen Einfluss der Inhibitoren auf die Entstehung spezifischer L1-Formen und den Kernimport (s. Abb. 4.7 A und C). Die Inhibition von Serinproteasen durch Aprotinin reduziert die Menge an L1-70 im Zellkern, was den Rückschluss zulässt, dass eine bisher nicht identifizierte Serinprotease für die Entstehung des Fragments L1-70 verantwortlich ist (s. Abb. 4.7 A). Die Inhibition von Metalloproteasen und die γ -Sekretase durch GM6001 und DAPT erhöhen die Menge an L1-70 im Zellkern (s. Abb. 4.7 A), was verdeutlicht, dass L1-70 Substrat von Metalloproteasen und der γ -Sekretase ist und diese einen Einfluss von L1 im Zellkern haben. L1-70 und L1-32 wird durch die γ -Sekretase zu L1-15/L1-28 prozessiert (s. Abb. 4.7 C). Dieser Vorgang kann durch DAPT inhibiert werden.

Carboxyterminale L1-Spaltprodukte mit Transmembrandomäne sind im Zellkern von Neuronen nachweisbar. Die Immunblot-Analysen von neuronalen Kernfraktionen mit einem Antikörper gegen die L1-ID (L1-172R) sowie gegen die extrazellulären Domänen (L1-557) zeigten unterschiedliche L1-Spaltprodukte im Zellkern. Mit dem L1-172R konnten insbesondere die durch γ -Sekretase Spaltung generierten löslichen Fragmente L1-15 und L1-28 detektiert werden, als auch die membranständige Form L1-32. Die Antikörper L1-557 und L172R konnten darüber hinaus auch die Formen L1-60 und L1-70 detektieren, welche ebenfalls die Transmembrandomäne beinhalten. Es existieren zwei putative MMP9-Spaltstellen in der Aminosäuresequenz von L1. Eine befindet sich in der sechsten Ig-Domäne, die andere in der ersten Fn-3 Domäne. *In vitro* Spaltexperimente mit rekombinanten L1-Fragmenten in Anwesenheit von MMP9 zeigte eine Prozessierung in der ersten Fn-3 Domäne (Kalus, 2005). Das Erkennungsmotiv der MMP9 in L1 beinhaltet die Aminosäuren PGNQT⁶⁷². Nach MMP9-Spaltung entsteht vermutlich ein Fragment, welches mit N-Glykosylierungsstellen ein Molekulargewicht von ~ 80 kDa aufweisen würde, welches mit den Antikörpern L1-172R und L1-557 detektierbar wäre. Das beobachtete L1-Fragment erfüllt die Voraussetzungen nicht, durch MMP9-Prozessierung generiert zu sein, da das Molekulargewicht des resultierenden carboxyterminalen Fragments zu groß wäre. Dazu kommt, dass der Metalloprotease Inhibitor GM6001 keinen Rückgang sondern einen Anstieg der Entstehung von L1-70 bewirkt.

Da die Inhibition von Serinproteasen die Bildung von L1-70 inhibiert (s. Abb. 4.7 A und B), wurde in der Aminosäuresequenz von L1 nach putativen Schnittstellen gesucht. Die bekannten, L1-prozessierenden Serinproteasen Plasmin und PC5A kommen für die Entstehung des Fragments L1-60 oder L1-70 nicht in Frage, da die identifizierten Schnittstellen carboxyterminal des L1-557 Epitops liegen. Ein Merkmal der Fragmente L1-60 und L1-70 ist, dass diese mit einem Antikörper gegen die L1-ID (L1-172R) sowie mit dem Antikörper L1-557 detektierbar sind (s. Abb. 4.4 B und C).

Diese Suche führte zur Identifikation einer potentiellen Schnittstelle der Serinprotease Matriptase. Die konservierte Schnittstelle mit der Konsensussequenz [AG][KR] befindet sich aminoterminal des Epitops des Antikörpers L1-557 in der zweiten Fn-3 Domäne bei ⁷⁹⁴GK. Das verbleibende carboxyterminale Fragment hätte einschließlich N-Glykosylierungsstellen ein Molekulargewicht von ~ 60 kDa. Eine Mono-Ubiquitynylierung (s. unten) dieses Fragments würde in einem Molekulargewicht von ~ 70 kDa resultieren.

Als Beispiel für Typ-1 Transmembranproteine im Zellkern kann die Familie der ErbB Rezeptor Tyrosinkinasen herangezogen werden, welche vier Mitglieder umfasst (Lin et al., 2001; Ni et al., 2001; Lee et al., 2002; Offterdinger et al., 2002; Wang et al., 2004). Für jedes der Mitglieder konnte die Kernlokalisierung beschrieben werden, wobei ErbB2 und ErbB3 als Proteine voller Länge im Zellkern vorkommen (Offterdinger et al., 2002; Wang et al., 2004; Giri et al., 2005). Der Weg, den die Proteine nehmen, geht über Endozytose und Importin-vermittelten Kernimport (Chen et al., 2005; Giri et al., 2005). Wie genau die Proteine aus der Vesikel-Membran entfernt werden, bleibt unklar.

Die Untersuchung von eukaryotischen L1-Konstrukten in HEK293 Zellen zeigte, dass die membranständigen Formen L1-178 und L1-202, die den Formen L1-32 und einer hypothetischen Form L1-35 entsprechen, im Zellkern nachweisbar sind. Dieser Nachweis erfolgte über Immunhistochemie (s. Abb. 4.16) und durch Analysen von Kernfraktionen im Immunblot (s. Abb. 4.15). Die Formen L1-434 und Volle-Länge L1 zeigen keine Kernlokalisierung in HEK293 Zellen (s. Abb. 4.15 und 4.16). Dieser Versuch zeigt, dass proteolytische Vorgänge an der Plasmamembran, wie das *ectodomain shedding* durch ADAM10, ausreichen, um L1 in den Zellkern zu translozieren.

Die Stimulation des Neuritenwachstums geht mit der Endozytose von L1 einher, welches über Aktin an den retrograden Fluss des Zytoskeletts gekoppelt ist (Nishimura et al., 2003) und zum einen in Wachstumskegeln recycelt (Kamiguchi and Yoshihara, 2001) und zum anderen proteolytisch prozessiert wird (Sugawa et al., 1997; Mullock et al., 1998; Kalus et al., 2003). Die regulierte Prozessierung von Proteinen findet neben der Zelloberfläche hauptsächlich in Vesikeln statt, besonders in den späten Endosomen (Tjelle et al., 1996; Mullock et al., 1998; Riedle et al., 2009). Insofern ist anzunehmen, dass die Stimulation mit L1-557 zur Endozytose von L1 führt und auf diesem Weg in den Zellkern transportiert wird.

Die regulierte Proteolyse von L1 findet in Endosomen statt, in welchen L1 post-translational modifiziert wird. Die Analyse von Mikrosomen, welche aus den Gehirnen 7 Tage alter Mäuse isoliert wurden, zeigte, dass L1 in Mikrosomen vorkommt. Die

Auftrennung von Mikrosomen über eine Gradientenzentrifugation zeigt, dass es unterschiedliche prozessierte L1-Formen in distinkten Vesikelpopulationen gibt. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen etablierte Markerproteine konnte gezeigt werden, dass die Schnittformen L1-70 und L1-32 besonders in späten Endosomen und *recycling* Endosomen anzutreffen sind, was es wahrscheinlich macht, dass es sich um die Orte der Prozessierung handelt. Es ist bekannt, dass Proteasen der ADAM-Familie oder auch die γ -Sekretase in Endosomen vorkommen und diese ein Kompartiment darstellen, in welchem Membranproteine prozessiert werden (Pillay et al., 2002). Es ist durchaus anzunehmen, dass auch Volle-Länge L1 in Endosomen prozessiert wird. Die Mikrosomenfraktion, welche im Gradienten auf dem 2 M Saccharose-Kissen schwimmt, ist in besonderem Maße angefüllt mit prozessiertem L1. Diese Fraktion konnte im Rahmen dieser Arbeit durch keinen Marker charakterisiert werden, es handelt sich aber wahrscheinlich um Multivesikuläre Körper (MVBs), welche in der Literatur als spezialisierte Endosomen beschrieben sind, in denen internalisierte Membran-Rezeptoren und ihre Liganden durch Invagination der Vesikelmembran unter Bildung von Mikrodomänen sortiert werden (Hornick et al., 1985; Tjelle et al., 1996).

Die Analyse von L1-Immunpräzipitaten aus Mikrosomenfraktionen mit Antikörpern gegen Ubiquitin, zeigt deutlich ubiquitinyliertes L1 in Mikrosomen. Zur Analyse der Ubiquitinylierung standen zwei Antikörper zur Verfügung, von denen der Antikörper FK1 ausschließlich Poly-Ubiquitin und der Antikörper P4D1 sowohl Mono- als auch Poly-Ubiquitin detektiert (Fujimuro et al., 1994; Fujimuro and Yokosawa, 2005). Durch den Einsatz dieser zwei Antikörper konnte im Ausschlussverfahren mono-ubiquitinyliertes L1 (wird von P4D1 erkannt, aber nicht von FK1) mit den Molekulargewichten L1-70 und L1-50 identifiziert werden (s. Abb. 4.23 A und B). Diese können nach Präzipitation mit dem Antikörper L1-557 besonders in den Endosomenfraktionen 2 – 5 detektiert werden (s. Abb. 4.23 A). Die Analyse der Immunpräzipitate mit einem Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne von L1 zeigt, dass die mono-ubiquitinylierten Formen die L1-ID beinhalten (s. Abb. 4.24). Dieses Ergebnis macht deutlich, dass mono-ubiquitinyliertes L1 in distinkten Endosomen vorkommt, welche dem stimulierbaren Weg der nuklearen Translokation zugeschrieben werden können.

Das charakteristische Bandenmuster von L1 im Zellkern (s. Abb. 4.17 A) zeigt unter Verwendung des Antikörpers gegen die L1-ID mehrere Banden, welche einen Unterschied im Molekulargewicht von ca. 12 kDa aufweisen. Die Analyse der L1-ID Aminosäuresequenz mit den Online-Werkzeugen SumoPlot und SUMOsp 2.0 zeigte zwei Sumoylierungsmotive innerhalb der L1-ID, welche als physiologisch relevant eingestuft wurden (s. Abb. 4.17 B) (Xue et al., 2006). Unterschiedliche L1-Antikörper wurden zur Präzipitation von L1 aus einer Kernfraktion benutzt und die L1-Präzipitate mit einem pan-Sumo Antikörper analysiert, welcher alle vier bekannten Sumo-Isoformen detektiert (s. Abb. 4.18 A). Der Antikörper L1-172R ist gegen die L1-ID gerichtet und präzipitiert eine sumoylierte L1-Form mit dem Molekulargewicht von 40 kDa. Pan-Sumo Immunpräzipitate, welche mit L1-172R analysiert wurden (s. Abb. 4.18 B), zeigen eine sumoylierte Form L1-30 in der Kernfraktion. Eine weitere sumoylierte Form von L1 konnte durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden (s. Abb. 4.18 C). Diese hat ein Molekulargewicht von 115 kDa und kann zu diesem Zeitpunkt nicht genau eingeordnet werden. Da für die Detektion der L1-ID Antikörper gegen die L1-ID verwendet wurden, kann mit Sicherheit gesagt werden, dass die sumoylierte intrazelluläre L1-Domäne vorhanden ist. Möglicherweise ist dieses L1-Fragment mit SUMO-2 oder -3 verknüpft, welche hochmolekulare Polymere bilden (Tatham et al., 2003; Sakurai et al., 2008), oder es handelt sich um L1, das an mehreren Stellen mit Sumo-1 verknüpft vorliegt. Die Funktion der Sumoylierung von L1 im Zellkern ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar. Es kann gemutmaßt werden, dass die L1-ID durch Sumo modifiziert wird, um im Zellkern bestimmte L1-Funktionen zu aktivieren.

Die Interaktion von L1-ID mit nuklearen Partnern scheint sumoylierungs-unabhängig zu sein, da Bindungspartner mit unmodifizierter L1-ID aus dem Zellkern identifiziert werden konnten (s. 4.6.3.2). Es ist aber gut vorstellbar, dass eine Sumoylierung von L1 eine Aktivierung oder Deaktivierung von Prozessen zur Folge hat (Kotaja et al., 2002; Girdwood et al., 2003; Yang and Sharrocks, 2004), in die L1 über die in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartner eingreift.

Es existieren zwei Wege der L1-Kernlokalisierung: Der konstitutive und der stimulierbare Weg. Die Experimente dieser Studie zeigen, dass es zwei Wege für L1 gibt, um in den Zellkern zu gelangen: einen konstitutiven sowie einen stimulierbaren Weg. Beide Wege führen über proteolytische Vorgänge, welche das *ectodomain shedding* beinhalten (s. Abb. 5.1).

Das Hauptmerkmal der konstitutiven L1-Kernlokalisierung beinhaltet die sequenzielle Prozessierung durch ADAM10 und die γ -Sekretase. Die proteolytischen Vorgänge spielen sich an der Zelloberfläche oder nach L1-Endozytose in späten Endosomen und Lysosomen ab. Nach γ -Sekretase Schnitt wird die L1-ID wahrscheinlich löslich in den Zellkern transportiert oder durch Invagination von MVBs aufgenommen und dann in den Zellkern transportiert. Der konstitutive L1-Kernimport ist in Kleinhirnneuronen wesentlich geringer ausgeprägt als in neuronalen Zelllinien.

Der Antikörper L1-557 und L1-Fc konnten die L1-Kernlokalisierung in Kleinhirnneuronen und SH-SY5Y Zellen stimulieren. Insbesondere die Antikörper-Stimulation treibt L1 in den Formen L1-70 und L1-32 in den Zellkern. Die Formen L1-60 und L1-70 sind neuronale Formen und sind in L1 exprimierenden Ovarialkarzinomen (Gutwein et al., 2003; Gutwein et al., 2005) oder Fibroblasten (Maretzky et al., 2005) nicht detektierbar.

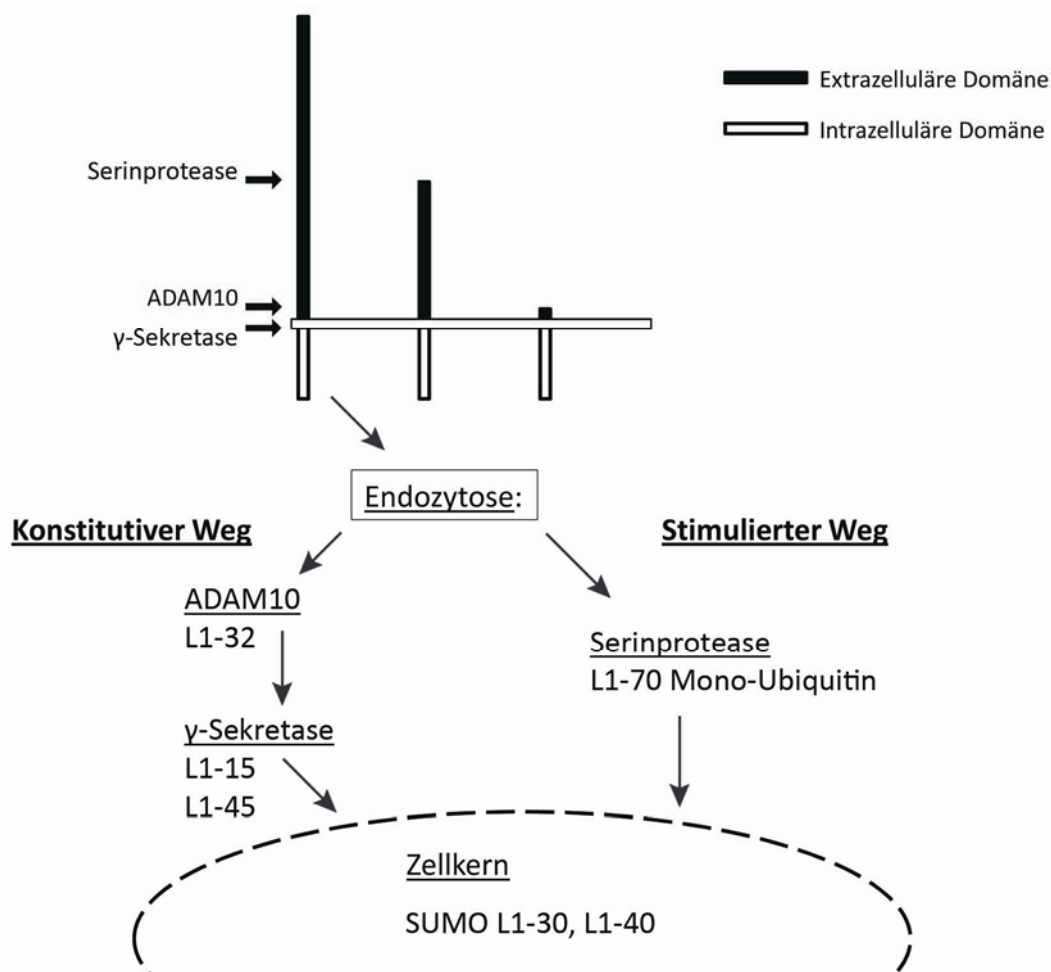


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des konstitutiven und stimulierten L1-Kernimport in Neuronen.

L1 wird nach *ectodomain shedding* oder in voller Länge endozytiert. Proteolytische Prozesse spielen sich auch in Endosomen ab, aus denen L1 im stimulierten Weg in mono-ubiquitinylierter Form (L1-70) nach Serinprotease-Schnitt in den Zellkern transportiert wird. Im konstitutiven Weg wird L1 sequenziell durch ADAM10 und die γ-Sekretase prozessiert und die L1-ID in den Formen L1-15 und L1-45 in den Zellkern transportiert. Der Kernimport der L1-ID kann in löslicher Form oder über MVBs geschehen. Die L1-ID ist in monomerer Form (L1-15) mit der DNS assoziiert und in den Formen L1-30 und L1-40 sumoyliert.

Es ist von Tumorzellen bekannt, dass diese Membranvesikel in die Umgebung entlassen (Taylor and Black, 1986). Es konnten zwei Arten von Vesikeln identifiziert werden: Apoptotische Bläschen (*apoptotic blebs*) und Exosomen (Stoorvogel et al., 2002; They et al., 2002). Apoptotische Bläschen werden kurz nach der Induktion von Apoptose entlassen (They et al., 2002), während Exosomen Membranbestandteile darstellen, welche von lebenden Zellen entlassen werden, indem multivesikuläre Endosomen (als *multivesicular bodies* bekannt, MVBs) mit der Plasmamembran verschmelzen (Andre et al., 2002; They et al., 2002).

Das Zelladhäsionsmolekül L1 ist in Exosomen von Ovarialkarzinomzellen (Gutwein et al., 2005) als auch von kultivierten kortikalen Neuronen nachweisbar (Faure et al., 2006). Die Prozessierung von L1 in Exosomen aus Ovarialkarzinomzellen durch ADAM10 unter Freisetzung der extrazellulären Domäne konnte nachgewiesen werden (Gutwein et al., 2005). Über Exosomen können zytoplasmatische Proteine an benachbarte Zellen und somit Signale weitergeleitet werden. Da die L1-ID nach γ -Sekretase Schnitt zytosolisch vorliegt (s. Abb. 4.12), kann davon ausgegangen werden, dass die L1-ID über Exosomen an angrenzende Zellen weitergegeben werden wird und dort in den Zellkern gelangt, um eine Signalfunktion auszuüben.

L1 ist in unterschiedlichen Karzinomen exprimiert und trägt zur Progression von Krebs bei.

In den untersuchten neuronalen Zelllinien N2a und SH-SY5Y wurden von Kleinhirnneuronen abweichende Beobachtungen bezüglich der Kernlokalisierung von L1 gemacht. In den Zelllinien ist L1 konstitutiv im Zellkern, ähnlich wie in stimulierten Neuronen, nachweisbar. Hierbei könnte ein Zusammenhang bestehen zwischen einer erhöhten Rate an proteolytischer Prozessierung von L1 und der Transformation von Zellen in Krebszellen.

Neuste Studien haben L1-Expression mit dem Fortschreiten von humanen Karzinomen in Verbindung gebracht. L1-Expression wurde in verschiedenen Tumoren nachgewiesen, darunter Lungenkrebs (Katayama et al., 1997), Gliome (Senner et al., 2002), Melanome (Thies et al., 2002; Fogel et al., 2003a), renalen Karzinomen (Meli et al., 1999; Allory et al., 2005) und Kolonkarzinom (Gavert et al., 2005). L1 konnte nicht als Krebsmarker etabliert werden (Fogel et al., 2003b) und der Mechanismus, über den L1 zur Progression von Tumoren beiträgt, ist noch ungeklärt.

Der Mechanismus der stufenweisen Prozessierung von L1 in Neuronen durch ADAM10 und die γ -Sekretase geht mit dem in Karzinomzellen einher.

L1 wird von der Zellmembran durch die Metalloproteasen ADAM10 (Mechtersheimer et al., 2001; Gutwein et al., 2003) und ADAM17 geschnitten. Die lösliche L1-Ectodomäne, ein Produkt der L1-Prozessierung, ist im Serum und Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom detektierbar (Fogel et al., 2003b). Lösliches L1 aus Aszites ist ein starker Induktor von Zellmigration (Gutwein et al., 2005). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass L1 in Abhängigkeit der Proteolyse durch ADAM10 und die γ -Sekretase im Zellkern humaner Karzinomzellen detektierbar ist (Riedle et al., 2009).

Der L1-Kernimport wird von den Importinen α und β vermittelt, welche an Kernlokalisierungsmotive innerhalb der intrazellulären Domäne binden.

In der Aminosäuresequenz der intrazellulären L1-Domäne konnten zwei lysinreiche Kernlokalisierungsmotive (NLS) mit der Konsensussequenz K[KR] \times [KR] identifiziert werden (Wolff et al., 2002). In Bindungsstudien mit rekombinant exprimierter L1-ID konnte eine Bindung von Importin α gezeigt werden (s. Abb. 4.20 A). Als Kontrolle wurde parallel die intrazelluläre Domäne von NCAM140 im *Pulldown* eingesetzt, welche keine NLS-Sequenz beinhaltet und ferner keine Bindung an Importin α zeigt. Diese Kontrolle zeigt, dass Importin α spezifisch an L1-ID bindet und keine unspezifische Bindung an die eingesetzten *beads* zeigt.

In der Affinitätschromatographie wurde Importin β (NTF97) als Bindungspartner der L1-ID identifiziert. Eine Co-Immunpräzipitation mit L1 konnte das Ergebnis bestätigen (s. Abb. 4.20 B). Der Versuch mit Antikörpern gegen Importin α und β L1 zu präzipitieren führte zu keiner Co-Immunpräzipitation. Da durch Importine eine sehr große Anzahl von Proteinen in den Zellkern transportiert wird, ist der an Importin gebundene Anteil an L1 verschwindend gering und schwer zu detektieren.

Der Importin-abhängige Kerntransport ist gut charakterisiert. So ist bekannt, dass Importin α direkt an NLS binden kann und zusammen mit Importin β in den Zellkern transportiert wird (Hall et al., 1990; Makkerh et al., 1996; Goldfarb et al., 2004) oder auch Importin β direkt an NLS binden kann (Fried and Kutay, 2003; Weis, 2003).

Der Kernimport der Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB2 konnte auf eine NLS in der intrazellulären Domäne zurückgeführt werden (Chen et al., 2005; Giri et al., 2005). Wird die NLS mutiert, kann ErbB2 nicht mehr in den Zellkern translozieren (Chen et al., 2005).

Die Untersuchung der intrazellulären Domänen der Mitglieder der L1-Familie auf Kernlokalisierungssequenzen ist in Abbildung 5.2 dargestellt. In allen intrazellulären Domänen der Mitglieder der L1-Familie ist mindestens eine NLS lokalisiert, im Fall von L1 und Neurofascin sind zwei NLS vorhanden. Auffällig ist, dass in den ersten 10 Aminosäuren

Kapitel 5 Diskussion

der IDs von L1, ChL1 und Neurofascin sowie in den bekannten Substraten der γ -Sekretase ErbB2 und Notch1 (De Strooper et al., 1999) eine NLS vorhanden ist.

| | | |
|----------------------|----------------------------|-------------------------------|
| L1 (P11627) | KRSKGGKYSV ¹¹⁵⁶ | IGQYSGKKEKEA ¹²⁴⁰ |
| ChL1 (P70232) | KRNRGGKYSV ¹¹¹⁴ | TGAKEKGSVESN ¹¹⁹⁸ |
| Neurofascin (Q810U3) | KRSRGGKYPV ¹¹⁴¹ | VKKDKKEETEGNE ¹²²⁵ |
| Nr-CAM (Q810U4) | RRNKGGKYPV ¹¹⁵² | IGQYSGKKEKEP ¹²³⁶ |
| ErbB2 (P70424) | LIKRRRQKIR ⁶⁸⁴ | |
| Notch1 (Q01705) | SRKRRRQHGQ ¹⁷⁵⁶ | |

Abbildung 5.2: Vergleich der intrazellulären Domänen der L1-Familienmitglieder L1, ChL1, Neurofascin, Nr-CAM sowie weiterer γ -Sekretase Substrate deren ID in den Zellkern translozieren.

Im ersten Block sind die ersten 10 Aminosäuren der intrazellulären Domänen der Proteine L1, ChL1, Neurofascin, Nr-CAM, ErbB2 und Notch1 dargestellt. Der zweite Block zeigt einen weiteren Bereich der IDs, in dem sich putative Kernlokalisierungsmotive (NLS) befinden. Die Kernlokalisierungsmotive sind in Grau hinterlegt. Die Datenbankeinträge (*accession numbers*) beziehen sich auf UniProt.

Diese eindeutige Homologie innerhalb der L1-Familie und bekannten γ -Sekretase Substraten legt die Vermutung nahe, dass ChL1, Neurofascin und Nr-CAM auf gleiche Art wie L1 prozessiert werden und die carboxyterminalen Fragmente ebenfalls in den Zellkern translozieren.

Die Untersuchung einer differentiellen Genexpression im Gehirn von L1-defizienten Mäuse zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp. Eine differenzielle Genexpression in L1-defizienten Mäusen wurde unter Verwendung von *Microarray*-Technologie untersucht. Es wurde mRNS aus Gesamtgehirn von L1-defizienten und Wildtyp-Männchen unter Berücksichtigung des genetischen Hintergrunds isoliert. Es wurde RNS aus Tieren mit dem Alter embryonaler Tag 18 (E.18), postnataler Tag 7 (P7) und adult untersucht. Es konnten für keine Altersstufen signifikant differentiell exprimierten Gene identifiziert werden (Meier, unveröffentlichte Daten). Die Ursache hierfür kann an einem schwer nachweisbaren Einfluss von L1 auf die Transkription von Genen in speziellen Zellen liegen, welcher bei einer Untersuchung von Gesamt-mRNS nicht mehr nachweisbar sind. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wäre die Analyse einer differentiellen Genexpression von L1-557 stimulierten Kleinhirneuronen

sinnvoll, um einen direkten Einfluss von L1 auf die Transkription von Genen messen zu können. Eine solche *Microarray*-Analyse kann die L1-abhängigen neuronalen Gene aufdecken und im Zusammenhang mit den nuklearen L1-Interaktionspartnern ein besseres Verständnis der L1-Signaltransduktion ermöglichen.

Studien anderer Gruppen konnten eine L1-abhängige Genregulation von CRABP II, beta3 Integrin, MDK und Cathepsin B in stabil mit L1 transfizierten HEK293 Zellen zeigen (Gast et al., 2008). Weiterführende Experimente (Riedle et al., 2009) zeigten, dass die Inhibition der γ -Sekretase durch DAPT und TAPI-0 zur Blockierung der L1-abhängigen Genregulation führt. Den gleichen Effekt auf die L1-abhängigen Gene zeigt der *knock-down* von L1 durch siRNS in Ovarialkarzinomzellen (OVMz). Werden die Gene Presenilin 1 (PS1) und ADAM10 durch siRNS ausgeschaltet, ist die Transkription von MDK und beta3 Integrin auf gleiche Weise beeinflusst, als wenn L1 herunterreguliert ist (Riedle et al., 2009). Dieser Einfluss von L1 auf die Transkription der identifizierten Gene kann ohne physiologische Relevanz sein, da HEK-293 Zellen nachweislich kein L1 exprimieren. Die Inhibition von ADAM10 oder der γ -Sekretase beeinflusst eine Vielzahl von Substraten, die in der Regulation von Genen involviert sind, und zieht als Folge eine starke Beeinflussung dieser Gene nach sich.

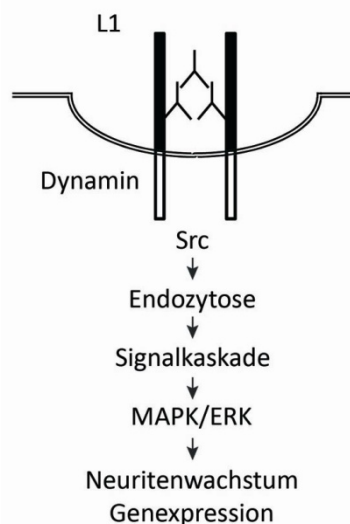


Abbildung 5.3: Vorgeschlagener L1-Signalweg.

Kreuzvernetzung von L1 in Wachstumskegeln durch L1-557 führt zur Dynamin-mediierter L1-Endozytose durch die Tyrosinkinase Src, welche eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, die zur ERK-Aktivierung führt. ERK hat möglicherweise einen Einfluss auf die Transkriptionen von Genen, die für das Neuritenwachstum wichtig sind (Schmid et al., 2000).

Zur Zeit ist es nicht bekannt, wie die L1-Signaltransduktion durch RIP mit dem L1-abhängigen ERK-Signalweg zusammenhängt (Silletti et al., 2004; Loers et al., 2005; Gast et al., 2008). ERK1/2 sind Serin-Threonin Kinasen, welche diverse Proteine phosphorylieren wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zytoskeletts, Membranproteine und weitere Kinasen (Schaeffer and Weber, 1999; Colucci-D'Amato et al., 2003). Aktiviertes ERK transloziert vom Zytosol in den Zellkern, um die Transkription von Genen zu regulieren (Colucci-D'Amato et al., 2003). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass eine Form von L1, welche eine Punktmutation in der ERK-Phosphorylierungsstelle (Ser1248) der L1-ID aufweist, keinen Einfluss auf die Genregulation oder den Aktivierungsstatus von ERK hat (Gast et al., 2008). Desweiteren hat die Inhibition der L1-Prozessierung durch die γ -Sekretase keinen Einfluss auf die ERK-Aktivierung in L1 exprimierenden HEK293 Zellen (Riedle et al., 2009). Eine ähnliche Beobachtung konnte gemacht werden, wenn L1-Expression durch siRNS verringert wurde (Stoeck et al., 2006b). Diese Ergebnisse zeigen, dass der L1-abhängige Einfluss von ERK auf die Regulation der für die Neuritogenese relevanten Gene in der Vergangenheit überschätzt wurde. Es verdichten sich die Beweise, dass die L1-ID im Zellkern direkt an der Regulation von Genen beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit nach Bindungspartnern von L1 im Zellkern mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Systems und Affinitätschromatographie gesucht.

L1-ID Bindungspartnersuche mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System. Der Versuch, mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Screens neue und insbesondere nukleare Proteine zu identifizieren die mit L1 interagieren, hat sich als wenig erfolgreich erwiesen. Die potentiellen Kandidaten aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen waren zytosolische, integrale Membranproteine oder extrazelluläre Proteine, aber keine Kernproteine. Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der Kernproteine von *S. cerevisiae* kann es zu einer Beeinflussung dieser durch das Köderprotein kommen, was in einer Kurzschlussreaktion in dem genetischen Reportersystem enden kann. Dies hätte falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse zur Folge. Für die intrazelluläre Domäne von L1 konnten die Bindungspartner RanBPM (Cheng et al., 2005b) und FERM (Dickson et al., 2002) mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifiziert werden. Interessanterweise wurde in keiner Veröffentlichung die gesamte L1-ID als Köder verwendet, sondern nur Peptide von nicht mehr als 20 Aminosäuren. Diese Tatsache wird von den Autoren nicht weiter diskutiert. Die Expression der L1-ID, egal ob in Hefe, *E. coli*

oder Säugerzellen, zeigt eine starke Neigung zur Dimerisierung oder Multimerisierung. Diese Zusammenlagerung der L1-ID kann eventuell mit Bindungspartnern im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen interferieren. So konnten keine bekannten Bindungspartner gefunden werden. Alle identifizierten putativen Interaktionspartner der L1-ID weisen eine schwache Interaktionsstärke auf. Diese kann im ProQuest Two-Hybrid System direkt an der Koloniengröße der Hefezellen, in denen die Proteininteraktion abläuft, abgelesen werden. Die Verifizierung der Interaktionen zwischen L1 und Calmodulin, Hsp70, TPI1, AMPK und ATPase Untereinheit C wurde anhand verschiedener biochemischer Interaktionsmethoden wie dem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA), Co-Immunpräzipitation und biochemischem *Crosslinking* untersucht. Keine der Interaktionen konnte bis dato bestätigt werden. Eventuell sind die Bindungen von sehr schwacher Natur, so dass diese mit anderen Methoden als dem Hefe-Zwei-System nicht nachweisbar sind.

Es konnte eine Bindung von Calmodulin 1 an das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM gezeigt werden, nicht aber an L1 (Mzoughi, unveröffentlichte Daten). Ferner konnte ein funktionaler Komplex bestehend aus ChL1 und Hsc70 identifiziert werden und im Rahmen der Versuche gezeigt werden, dass L1 und ChL1 nicht interagieren (Leshchyn'ska et al., 2006). Die mögliche Interaktion von Cystatin mit der intrazellulären L1-Domäne wurde nicht weiter bearbeitet, da Cystatin ein extrazellulär lokalisiertes Protein ist, welches unter physiologischen Bedingungen räumlich von der L1-ID getrennt vorliegt, was eine Interaktion ausschließt.

Für das Köderprotein L1-ID mit halber Transmembrandomäne konnten keine potentiellen Bindungspartner im Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert werden. Die halbe Transmembrandomäne von L1 enthält mehrere sich überschneidende Proteininteraktionsmotive, von denen eines den Kernexport vermittelt. So kann es sein, dass das Köderprotein trotz Kernlokalisierungsmotiv (NLS) in der DNS-bindenden Domäne (DB) aus dem Zellkern wieder heraus transportiert wird, und jede Proteininteraktion zwischen DB-X und AD-Y ausgeschlossen ist. Denkbar ist auch eine Interaktion des Köders mit nativen Proteinen des Zellkerns, welche in *S. cerevisiae* hoch konserviert sind und denen in der Maus oder dem Menschen stark ähneln.

Identifizierung von putativen Interaktionspartnern mittels Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie. Um Bindungspartner der intrazellulären Domäne von L1 aus dem Zellkern zu identifizieren, wurde die rekombinant exprimierte L1-ID als Köder mit einer Säulenmatrix verknüpft und mit Kernextrakt aus Mäusen inkubiert. In einem identischen Ansatz wurden Bindungspartner für NCAM140-ID gesucht. Die eluierten Proteine wurden über SDS-Page aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Während für NCAM nur zwei Banden vorherrschend waren, konnten für L1 im Bereich zwischen 100 und 30 kDa diverse Banden beobachtet werden. Diese konnten identifiziert werden (s. Abb. 4.30 C).

Die rekombinanten Köderproteine L1- und NCAM140-ID setzten sich jeweils aus ca. 110 Aminosäuren zusammen und sind aminoterminal mit einem His-tag versehen. Die Kopplung der Köder an die identische Matrix schließt in diesem Fall eine unspezifische Bindung von Proteinen aus, da für L1 und NCAM unterschiedliche Bandenmuster zu sehen sind. Das gleiche gilt für unspezifische Protein-Bindung an den His-tag.

Die große Zahl der potentiellen Bindungspartner machte es unmöglich, jede Proteininteraktion im Detail zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bindung von L1 an Importin β , Methyl-CPG-bindendes Protein 2 (MeCP2), *Non-POU domain-containing octamer-binding protein* (NonO) und *splicing factor proline/glutamine rich* (SFPQ) bestätigt werden.

Interessanterweise sind viele der identifizierten L1-Bindungspartner bereits als funktionell kooperierende Proteine beschrieben. Im Folgenden sollen die bekannten Zusammenhänge zwischen den Proteinen beschrieben werden und in einen L1-relevanten Rahmen gebracht werden.

SFPQ und NonO sind Bestandteile des *Spliceosoms* (Bennett et al., 1992; Rappsilber et al., 2002) und spielen bei der RNS-Prozessierung im Zellkern eine Rolle (Patton et al., 1993; Zhang and Carmichael, 2001). Neben den RNS-bindenden Funktionen kann SFPQ auch an DNS binden (Zhang et al., 1993) und NonO an einzelsträngige DNS über den N-Terminus sowie an doppelsträngige DNS über den C-Terminus (Yang et al., 1993), um die Transkription von Genen zu regulieren (Urban et al., 2000; Urban and Bodenbarg, 2002). SFPQ bindet an die DNS-Bindedomäne (DBD) des Thyroid Hormon Rezeptors (TR) und an Retinoid X Rezeptoren (RXR) (Mathur et al., 2001). NonO ist in diesem Komplex an SFPQ gebunden.

Kapitel 5 Diskussion

SFPQ interagiert in diesem Komplex mit Sin3a, welches eine Histon-Deacetylase (HDAC) rekrutiert, um z.B. die basale Transkription des Genes CYP17 zu reprimieren (Sewer et al., 2002). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass SFPQ und NonO im Komplex mit dem Androgen-Rezeptor (AR) sind und eine Schlüsselrolle in der Mediation AR-vermittelten Transkription spielen (Dong et al., 2007).

Während der DNS-Replikation schneidet die Topoisomerase I (Top1) DNS-Stränge, um den entstehenden Torsionskräften entgegenzuwirken. Die DNS-Topoisomerase I ist auch im Prozess des RNS-Splicens involviert und katalysiert den Transfer von RNS-Strängen und aktiviert RNS-Splicing-Faktoren durch Phosphorylierung. Ein Proteinkomplex bestehend aus Topoisomerase I, NonO und SFPQ konnte aus einem Kernextrakt aus humanen A431 Zellen im Verhältnis 1:1:1 isoliert werden. In Anwesenheit von SFPQ konnte 16-fach erhöhte Aktivität der Topoisomerase I beobachtet werden (Straub et al., 1998). Eine weitere Studie zeigte allerdings, dass SFPQ und NonO unabhängig voneinander an Nickel binden, und es stellt sich die Frage, ob es sich um einen natürlich vorkommenden Komplex handelt (Zhang and Carmichael, 2001). Da bei der in dieser Arbeit beschreibenden Affinitätschromatographie kein Nickel im Spiel war, ist dies ein gutes Indiz für das natürliche Vorkommen des Komplexes bestehend aus NonO, SFPQ und Top1.

In testikularen Sertoli-Zellen konnte in Proteinkomplexen des Androgen-Rezeptors NonO, SFPQ und PSP1 als Co-Aktivatoren des Rezeptors identifiziert werden (Kuwahara et al., 2006).

NonO und SFPQ konnten als Bestandteile von *Paraspeckles* identifiziert werden, einem neu entdeckten Subkompartiment des Zellkerns (Fox et al., 2002). Wie in (s. Abb. 4.34) beschrieben, wurde in dieser Arbeit versucht *Paraspeckles* in Kleinhirnneuronen unter Verwendung eines etablierten Protokolls mit dem Antikörper gegen PSP1 anzufärben (Fox et al., 2002). Das *Paraspeckle* Protein 1 (PSP1) war hierbei detektierbar, allerdings nicht in distinkten punktartigen Strukturen (*Paraspeckles*) sondern zytosolisch wie auch nukleoplasmatisch.

Eine interessante Beobachtung stellt die nicht ausschließliche Kernlokalisierung von SFPQ und NonO dar, welche in Kleinhirnneuronen auch zytoplasmatisch und in Dendriten lokalisiert

sind (s. Abb. 4.33 C und D). SFPQ und NonO sind als Komponenten eines Proteinkomplexes identifiziert worden, welcher über Kinesin (KIF4A) mRNA entlang von Mikrotubuli transportiert (Kanai et al., 2004). Unter den zytoplasmatischen Bindungspartnern der L1-ID (s. Tab. 4.5), welche durch Affinitätschromatographie mit angeschlossener Massenspektroskopie identifiziert werden konnten, befinden sich u.a. RNS-bindende Proteine *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs), bei der RNS-Prozessierung beteiligte Proteinen *Human Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 5* (CPSF5) und *proline synthetase cotranscribed* (Prosc) sowie der eukaryotische Elongationsfaktor 2 (eEF2). Diese konnten als Teile des RNS-Transport-Komplexes identifiziert werden (Kanai et al., 2004; Hirokawa, 2006). Die Interaktionen von L1 mit diesen putativen Bindungspartnern wurden zum Teil untersucht (Figge, 2009), aber es konnte keine direkte Interaktion zwischen der L1-ID und eEF2 festgestellt werden. Eine Beteiligung von L1 am RNS-Transport über die Interaktionen mit SFPQ und NonO ist denkbar und wert weiter untersucht zu werden.

MeCP2 bindet an methylierte Promoter und vermittelt den Aufbau von Repressorkomplexen, welche ebenfalls Sin3a und HDAC beinhalten (Klose and Bird, 2004; Abuhatzira et al., 2009).

MeCP2 und HP1 γ interagieren während der Myogenese und bewirken eine Reorganisation des Heterochromatins (Agarwal et al., 2007). Die Interaktion findet über die *Chromo-Shadow* Domäne von HP1 γ und den ersten 55 Aminosäuren von MeCP2 statt. Interessanterweise ist in MeCP2 kein konserviertes Bindemotiv vorhanden. Das Pentapeptid-Motiv (PxVxL) wird von *Chromo-Shadow*-Domänen gebunden (Smothers and Henikoff, 2000) und ist in der intrazellulären Domäne von L1 vorhanden. Die Interaktion von HP1 γ und der L1-ID konnte über Immunpräzipitation gezeigt werden (s. Abb. 4.32 A).

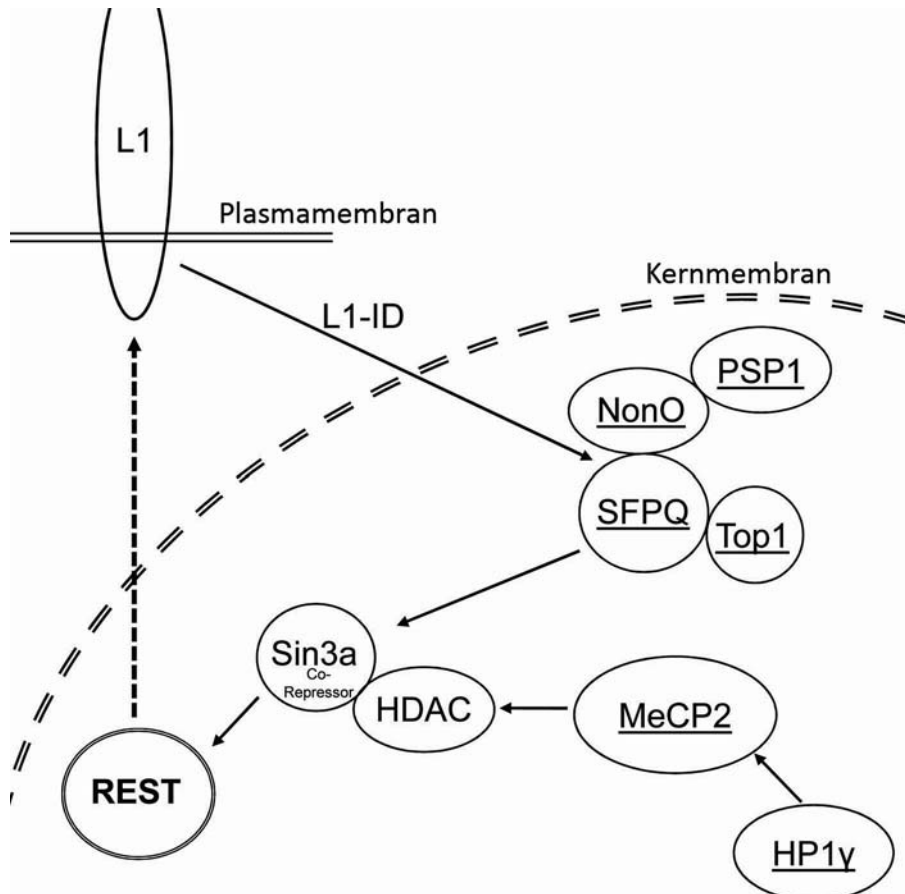


Abbildung 5.4: Vorschlag für das Zusammenspiel von L1 mit nuklearen Bindungspartnern.

Diese Abbildung verdeutlicht die Zusammenhänge der identifizierten L1-Interaktionspartner und ein möglichen Einfluss auf REST und die neuronale Entwicklung bzw. Regulierung neuronaler Gene, wie z.B. L1cam. Die unterstrichenden Proteine wurden als Bindungspartner von L1 im Zellkern identifiziert. Die intrazelluläre Domäne von L1 transloziert nach proteolytischer Spaltung in den Zellkern, um mit den in der Abbildung unterstrichenden Proteinen zu interagieren (schwarze Pfeile). Über Sin3a und HDAC kann eine Modulation von REST bewirkt werden, was einen Einfluss auf die Transkription neuronaler Gene, wie z.B. L1cam haben kann (unterbrochener Pfeil).

Abkürzungen: HDAC – Histon Deacetylase, HP1 γ – Heterochromatin-Protein 1 γ , MeCP2 – Methyl-CPG-bindendes Protein 2, NonO - *Non-POU domain-containing octamer-binding protein*, PSP1 – *Paraspeckle Protein 1*, REST - *RE1-silencing transcription factor*, Sin3a - *Histone deacetylase complex subunit Sin3a*, SFPQ - *splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)*, TOP1 – Topoisomerase 1

SFPQ und NonO, wie auch MeCP2 sind beschriebene Interaktionspartner von Sin3a und HDAC (Sewer et al., 2002; Klose and Bird, 2004; Abuhatzira et al., 2009), welche ihrerseits mit REST interagieren.

REST interagiert mit RE1-Bindestellen und rekrutiert Co-Repressoren wie Sin3a (Huang et al., 1999; Roopra et al., 2004), welche ihrerseits multiple Co-Faktoren und Regulatoren wie z.B. Histon Deacetylasen rekrutieren (Roopra et al., 2004). Im Gen L1cam existiert eine Bindestelle für REST im zweiten Intron, welche die L1-Expression in nicht-neuronalen Zellen verhindert (Kallunki et al., 1997). Im humanen und murinen Genom

existieren mehr als 1300 RE1-Stellen (Bruce et al., 2004), welche hauptsächlich Gene von Ionenkanälen, Neurotransmittern, Wachstumsfaktoren und Hormonen, sowie Faktoren der Axonalen-Wegleitung und Vesikeltransports und Bestandteile des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix regulieren (Schoenherr et al., 1996; Bruce et al., 2004). Da viele dieser Zielgene von post-mitotischen Neuronen exprimiert werden, wurde anfangs angenommen, dass REST ein *silencer* von neuron-spezifischen Genen in nicht-neuronalen Zellen ist (Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995). Dieses Bild hat sich gewandelt, da herausgefunden wurde, dass REST in post-mitotischen Neuronen exprimiert wird, insbesondere von denen im Hippocampus. REST moduliert im adulten Hippocampus seine Zielgene als Antwort auf Ischämie und epileptische Anfälle (Palm et al., 1998; Calderone et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass REST in nicht-neuronalen Zelllinien hauptsächlich als Repressor aktiver Transkription und nicht als *silencer* fungiert (Wood et al., 2003; Belyaev et al., 2004; Bruce et al., 2004). REST defiziente Mäuse sind ab embryonalem Tag 10 (E.10) letal und zeigen keine frühzeitige Expression der REST-Zielgene (Chen et al., 1998), während die konstitutive REST-Expression zur Herunterregulation einiger Zielgene und zu axonalen Wegfindungsstörungen führt (Paquette et al., 2000). Zusammengefasst wird deutlich, dass REST unterschiedliche Rollen in embryonalen und adulten Zellen spielt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung mit unterschiedlichen Genen interagiert.

Es besteht die Möglichkeit, dass die reprimierende Funktion von REST durch die Interaktion der intrazellulären L1-Domäne mit den in dieser Arbeit identifizierten Bindungspartnern moduliert wird. Somit wird eine mögliche Feedback-Schleife von membranständigen L1 aufgebaut, welches durch Signale aus der Umgebung endozytiert, sequenziell prozessiert und in den Zellkern transportiert wird, um auf die Transkription von neuronalen Genen via REST zu wirken.

Der in dieser Arbeit beschriebene Mechanismus der L1-Kernlokalisierung eröffnet möglicherweise eine neue und direkte Wirkungsweise des L1-Signalweges, welcher für die Entwicklung des Nervensystems von großer Bedeutung ist.

Kapitel 6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wird die Kernlokalisierung des Zelladhäsionsmolekuls L1 nach proteolytischer Prozessierung im zentralen Nervensystem von Mäusen zum ersten Mal beschrieben.

Immunhistochemische Untersuchungen an primären Kleinhirnneuronen sowie an neuronalen Zelllinien der Typen N2a und SH-SY5Y konnten mittels eines gegen die intrazelluläre Domäne von L1 gerichteten Antikörpers am Laser Scanning Mikroskop die Lokalisierung im Zellkern zeigen. Um die Frage zu klären, in welcher Form L1 in den Zellkern von Neuronen gelangt, wurden unterschiedliche Gehirnhomogenate und Kernfraktionen im Immunblot mit spezifischen L1-Antikörpern untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass L1 im Nervensystem stark prozessiert wird und eine Vielzahl an proteolytischen Spaltprodukten existiert. Die Analyse von Kernfraktionen aus Kleinhirnneuronen zeigte, dass einige dieser carboxyterminalen Fragmente, L1-70, L1-32, L1-28 und L1-15 in den Zellkern translozieren. Dies trifft auch auf die untersuchten Gehirnareale des Cerebellums, Hippocampus und Cortex zu. Der zu Grunde liegende proteolytische Mechanismus konnte durch die Inhibition von Metalloproteasen (GM6001) sowie des γ -Sekretase Komplexes (DAPT) aufgeklärt werden. ADAM10 generiert konstitutiv durch einen membran-proximalen Schnitt in der extrazellulären Domäne von L1 den membranständigen Stumpf L1-32. Dieser wird von der γ -Sekretase durch einen Intramembran-Schnitt weiter prozessiert und führt zur Entstehung der löslichen intrazellulären Domäne von L1 (L1-15/28/45). Die Stimulation mit Ionomycin erhöht die Rate an endozytiertem L1 und führt zur verstärkten Prozessierung durch ADAM17 und die γ -Sekretase, was allerdings keine Stimulation des L1-Kernimports nach sich zog. Die Stimulation von SH-SY5Y Zellen mit physiologischen Konzentrationen an Glutamat zeigte eine Reduzierung von Oberflächen-L1 um 35 %, aber keinen erhöhten Kernimport von L1.

Der monoklonale L1-Antikörper L1-557 ist dafür bekannt, L1-abhängiges Neuritenwachstum und die einhergehende Endozytose von L1 *in vitro* zu stimulieren. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass die Behandlung von Kleinhirnneuronen mit L1-557 zu einer erhöhten Rate an prozessiertem L1 führt und der L1-Kernimport stimuliert wird. Die L1-Formen, die verstärkt in den Zellkern gelangen, sind L1-70 und L1-32. Eine Besonderheit stellt die Bande L1-70 dar, welche extrazelluläre Bestandteile enthält und in neuronalen Kernfraktionen detektierbar ist. Die an der Entstehung dieser Schnittform beteiligte Protease ist nicht

geklärt, könnte aber durch eine potentielle Prozessierung der Serinprotease Matriptase hervorgerufen werden.

Durch eine *in silico* Motivsuche innerhalb der Aminosäuresequenz der L1-ID konnten zwei Kernlokalisierungsmotive (NLS) identifiziert werden. Bindungsstudien mit der rekombinant exprimierten L1-ID konnten zeigen, dass Importin α an L1 bindet, nicht aber an die intrazelluläre Domäne von NCAM140, welche das Motiv nicht enthält.

Seit kurzem ist im Gespräch, dass die post-translationalen Modifikationen der Monoubiquitylierung und Sumoylierung wichtige Signale für die Lokalisierung von Proteinen darstellen. In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass L1 sowohl mono- als auch polyubiquityliert in Endosomenfraktionen vorkommt. Die monoubiquitylierten Formen L1-70 und L1-50 beinhalten die L1-ID und können bei der Translozierung in den Zellkern eine wichtige Rolle spielen. In der Aminosäuresequenz von L1 gibt es potentiell relevante Sumoylierungsmotive. Die Analyse von L1-ID Immunpräzipitaten aus einer Kernfraktion mit einem Sumo-Antikörper, zeigte dass sumoylierte L1-ID im Zellkern in den Formen L1-40 und L1-30 vorkommt.

Die Suche nach Bindungspartnern der L1-ID aus dem Zellkern wurde über eine Affinitätschromatographie verwirklicht. Parallel wurde kovalent an eine Matrix gekoppelte L1- oder NCAM140-ID verwendet, um aus einer nukleoplasmatischen Kernfraktion Bindungspartner zu isolieren. Die Proteine Importin β , NonO, SFPQ, PSP1, Topoisomerase I und MeCP2 konnten in der angeschlossenen massenspektrometrischen Analyse als spezifische L1-Interaktionspartner identifiziert werden. Durch *Pulldown*-Experimente, Immunpräzipitationen und Studien zur Co-Lokalisierung konnten die Interaktionen zwischen L1-ID und NonO, MeCP2 sowie SFPQ bestätigt werden.

Kapitel 7 SUMMARY

In this study, the nuclear translocation of the cell adhesion molecule L1 after proteolytic cleavage in the central nervous system could be shown for the first time.

Immunohistochemical stainings of primary cultured cerebellar neurons as well as on the neuronal cell lines N2a and SH-SY5Y using an antibody against the L1-ID could show the nuclear localization via laser scanning microscopy. To address the question whether L1 nuclear import depends on proteolytic cleavage, different brain homogenates and nuclear fractions were subjected to western blot analysis using L1 specific antibodies. It could be shown that L1 is being heavily proteolytically processed in the nervous system and that a variety of cleavage products exist. The analysis of nuclear fractions derived from neuronal culture shows that carboxyterminal fragments L1-70, L1-32, L1-28 and L1-15 translocate into the nucleus. This applies also to the examined brain areas cerebellum, hippocampus and cortex.

The proteolytic mechanism lying to reason could be cleared up by inhibiting metalloproteases (GM6001) as well as the γ -secretase complex (DAPT). ADAM10 constitutively cleaves L1 membran proximal generating a stump of the size of 32 kDa. This stump is further processed by the γ -secretase releasing the L1-ID (L1-15/28/45) into the cytoplasm.

The stimulation induced by ionomycin triggers L1-cleavage by ADAM17 followed by γ -secretase but does not influence nuclear localization of L1. Stimulation of SH-SY5Y cells with physiologic concentrations of glutamate led to a 35 % reduction of cell surface L1 but did not alter the nuclear import of L1.

The monoclonal antibody L1-557 is known to stimulate L1-dependent neurite outgrowth and the going along of L1-endocytosis. In this study it is shown that treatment of cerebellar cultured neurons with L1-557 leads to an increase of L1 proteolysis and translocation to the nucleus. The processed forms of L1 which undergo nuclear translocation are L1-70 and L1-32. It is noteworthy that L1-70 contains extracellular part of L1 and is detectable in nuclear fractions derived from neuronal culture. The protease generating this fragment is still unknown but the serine protease matriptase might be a possible candidate.

Kapitel 7 Summary

An *in silico* search for small conserved motifs in the amino acid sequence of L1 could identify two nuclear leading sequences (NLS) within the L1-ID. Binding studies using a recombinant expressed form of L1-ID could show that importin α binds to L1 and not to NCAM140-ID which is not bearing this motif.

Recently, the post-translational modifications ubiquitin and sumo are being discussed of being signals mediating protein localization. In this thesis it could be shown that L1 is both mono- and polyubiquitinated present in endosomal fractions. The L1-ID containing monoubiquitinated Forms L1-70 and L1-50 may play a distinct role in the translocation of L1 to the nucleus.

The amino acid sequence of L1-ID shows some potential sumoylation sites with high physiological relevance. Analysis of L1-ID immunoprecipitates from nuclear fractions using an antibody against sumo could show that sumoylated carboxyterminal fragments of L1 exist.

The search for nuclear binding partners of the L1-ID was performed using affinity chromatography. In parallel, the intracellular domains of L1 and NCAM140 were coupled to a matrix and used as baits for nuclearplasmatic interactors. Following proteins could be identified as specifically L1-binders, using mass-spec analysis: Importin β , NonO, SFPQ, PSP1, topoisomerase I and MeCP2. Pulldown experiments, immunoprecipitations and co-localisation studies could verify the binding of NonO, MeCP2 and SFPQ to L1-ID.

Kapitel 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abuhatzira L, Shemer R, Razin A (2009) MeCP2 involvement in the regulation of neuronal alpha-tubulin production. *Hum Mol Genet* 18:1415-1423.
- Agarwal N, Hardt T, Brero A, Nowak D, Rothbauer U, Becker A, Leonhardt H, Cardoso MC (2007) MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Res* 35:5402-5408.
- Ahmad S, Ahuja R, Venner TJ, Gupta RS (1990) Identification of a protein altered in mutants resistant to microtubule inhibitors as a member of the major heat shock protein (hsp70) family. *Mol Cell Biol* 10:5160-5165.
- Allory Y, Matsuoka Y, Bazille C, Christensen EI, Ronco P, Debiec H (2005) The L1 cell adhesion molecule is induced in renal cancer cells and correlates with metastasis in clear cell carcinomas. *Clin Cancer Res* 11:1190-1197.
- Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, Pomel C, Lhomme C, Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E, Zitvogel L (2002) Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 360:295-305.
- 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 homologous 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.
- Arevalo E, Shanmugasundararaj S, Wilkemeyer MF, Dou X, Chen S, Charness ME, Miller KW (2008) An alcohol binding site on the neural cell adhesion molecule L1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:371-375.
- Ausubel FM (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. Brooklyn, New York: Greene Publishing Associates, Inc.
- Balla S, Thapar V, Verma S, Luong T, Faghri T, Huang CH, Rajasekaran S, del Campo JJ, Shinn JH, Mohler WA, Maciejewski MW, Gryk MR, Piccirillo B, Schiller SR, Schiller MR (2006) Minimoto Miner: a tool for investigating protein function. *Nat Methods* 3:175-177.
- Barriere H, Nemes C, Du K, Lukacs GL (2007) Plasticity of polyubiquitin recognition as lysosomal targeting signals by the endosomal sorting machinery. *Mol Biol Cell* 18:3952-3965.
- Baselga J, Mendelsohn J, Kim YM, Pandiella A (1996) Autocrine regulation of membrane transforming growth factor-alpha cleavage. *J Biol Chem* 271:3279-3284.
- Bateman A, Jouet M, MacFarlane J, Du JS, Kenwrick S, Chothia C (1996) Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders. *Embo J* 15:6050-6059.
- Bearer CF (2001) Developmental neurotoxicity. Illustration of principles. *Pediatr Clin North Am* 48:1199-1213, ix.
- Bechara A, Nawabi H, Moret F, Yaron A, Weaver E, Bozon M, Abouzid K, Guan JL, Tessier-Lavigne M, Lemmon V, Castellani V (2008) FAK-MAPK-dependent adhesion disassembly downstream of L1 contributes to semaphorin3A-induced collapse. *Embo J*.
- Beer S, Oleszewski M, Gutwein P, Geiger C, Altevogt P (1999) Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J Cell Sci* 112 (Pt 16):2667-2675.
- Belyaev ND, Wood IC, Bruce AW, Street M, Trinh JB, Buckley NJ (2004) Distinct RE-1 silencing transcription factor-containing complexes interact with different target genes. *J Biol Chem* 279:556-561.
- Bennett M, Michaud S, Kingston J, Reed R (1992) Protein components specifically associated with pre-spliceosome and spliceosome complexes. *Genes Dev* 6:1986-2000.
- Bernier-Villamor V, Sampson DA, Matunis MJ, Lima CD (2002) Structural basis for E2-mediated SUMO conjugation revealed by a complex between ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9 and RanGAP1. *Cell* 108:345-356.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38:3751-3757.
- Black RA (2002) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1-5.
- Black RA, White JM (1998) ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 10:654-659.
- Blobel CP (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:32-43.
- Bohren KM, Nadkarni V, Song JH, Gabbay KH, Owerbach D (2004) A M55V polymorphism in a novel SUMO gene (SUMO-4) differentially activates heat shock transcription factors and is associated with susceptibility to type I diabetes mellitus. *J Biol Chem* 279:27233-27238.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Bork P, Doolittle RF (1992) Proposed acquisition of an animal protein domain by bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8990-8994.
- Bork P, Holm L, Sander C (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J Mol Biol* 242:309-320.
- Breeuwer M, Goldfarb DS (1990) Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 60:999-1008.
- Brenkman AB, de Keizer PL, van den Broek NJ, Jochemsen AG, Burgering BM (2008) Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PLoS ONE* 3:e2819.
- Brizzard BL, Chubet RG, Vizard DL (1994) Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* 16:730-735.
- Bruce AW, Donaldson IJ, Wood IC, Yerbury SA, Sadowski MI, Chapman M, Gottgens B, Buckley NJ (2004) Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10458-10463.
- Brummendorf T, Rathjen FG (1996) Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6:584-593.
- Brummendorf T, Kenwrick S, Rathjen FG (1998) Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* 8:87-97.
- Brummendorf 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 Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10:711-727.
- Buhusi M, Schlatter MC, Demyanenko GP, Thresher R, Maness PF (2008) L1 interaction with ankyrin regulates mediolateral topography in the retinocollicular projection. *J Neurosci* 28:177-188.
- Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, Stevenson M (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6580-6584.
- Burd CG, Swanson MS, Gorlach M, Dreyfuss G (1989) Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9788-9792.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
- Buvoli M, Biamonti G, Tsoulfas P, Bassi MT, Ghetti A, Riva S, Morandi C (1988) cDNA cloning of human hnRNP protein A1 reveals the existence of multiple mRNA isoforms. *Nucleic Acids Res* 16:3751-3770.
- Cadwell K, Coscoy L (2005) Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* 309:127-130.
- Cai XD, Golde TE, Younkin SG (1993) Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor. *Science* 259:514-516.
- Calderone A, Jover T, Noh KM, Tanaka H, Yokota H, Lin Y, Grooms SY, Regis R, Bennett MV, Zukin RS (2003) Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J Neurosci* 23:2112-2121.
- Chauchereau A, Amazit L, Quesne M, Guiochon-Mantel A, Milgrom E (2003) Sumoylation of the progesterone receptor and of the steroid receptor coactivator SRC-1. *J Biol Chem* 278:12335-12343.
- Chen L, Ong B, Bennett V (2001) LAD-1, the *Caenorhabditis elegans* L1CAM homologue, participates in embryonic and gonadal morphogenesis and is a substrate for fibroblast growth factor receptor pathway-dependent phosphotyrosine-based signaling. *J Cell Biol* 154:841-855.
- Chen QQ, Chen XY, Jiang YY, Liu J (2005) Identification of novel nuclear localization signal within the ErbB-2 protein. *Cell Res* 15:504-510.
- Chen ZF, Paquette AJ, Anderson DJ (1998) NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet* 20:136-142.
- Cheng J, Mielnicki LM, Pruitt SC, Maquat LE (1990) Nucleotide sequence of murine triosephosphate isomerase cDNA. *Nucleic Acids Res* 18:4261.
- Cheng L, Itoh K, Lemmon V (2005a) L1-mediated branching is regulated by two ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding sites, the RSLE region and a novel juxtamembrane ERM-binding region. *J Neurosci* 25:395-403.
- Cheng L, Lemmon S, Lemmon V (2005b) RanBPM is an L1-interacting protein that regulates L1-mediated mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 94:1102-1110.
- Chevray PM, Nathans D (1992) Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that react with the leucine zipper of Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5789-5793.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD, Mandel G (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80:949-957.
- Ciechanover A (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79:13-21.
- Ciechanover A, Ben-Saadon R (2004) N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* 14:103-106.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672-674.
- Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U (2003) Chronic activation of ERK and neurodegenerative diseases. *Bioessays* 25:1085-1095.
- Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, Newbold RF, Grompe M, Parenti G, Ballabio A (2003) The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* 113:445-456.
- Crossin KL, Krushel LA (2000) Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Dev Dyn* 218:260-279.
- Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:636-643.
- D'Arpa P, Machlin PS, Ratrie H, 3rd, Rothfield NF, Cleveland DW, Earnshaw WC (1988) cDNA cloning of human DNA topoisomerase I: catalytic activity of a 67.7-kDa carboxyl-terminal fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2543-2547.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.
- de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306-312.
- DeBernardo AP, Chang S (1996) Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J Cell Biol* 133:657-666.
- Demyanenko GP, Tsai AY, Maness PF (1999) Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci* 19:4907-4920.
- Dickson TC, Mintz CD, Benson DL, Salton SR (2002) Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol* 157:1105-1112.
- Dihne M, Bernreuther C, Sibbe M, Paulus W, Schachner M (2003) A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J Neurosci* 23:6638-6650.
- Dong X, Sweet J, Challis JR, Brown T, Lye SJ (2007) Transcriptional activity of androgen receptor is modulated by two RNA splicing factors, PSF and p54nrb. *Mol Cell Biol* 27:4863-4875.
- Du W, Vidal M, Xie JE, Dyson N (1996) RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. *Genes Dev* 10:1206-1218.
- Durban E, Goodenough M, Mills J, Busch H (1985) Topoisomerase I phosphorylation in vitro and in rapidly growing Novikoff hepatoma cells. *Embo J* 4:2921-2926.
- Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, Lee WH, Elledge SJ (1993) The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7:555-569.
- Ebeling O, Duczmal A, Aigner S, Geiger C, Schollhammer S, Kemshead JT, Moller P, Schwartz-Albiez R, Altevogt P (1996) L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur J Immunol* 26:2508-2516.
- Edbauer D, Willem M, Lammich S, Steiner H, Haass C (2002) Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem* 277:13389-13393.
- Einspanier R, Sharma HS, Scheit KH (1987) Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding poly-ubiquitin in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 147:581-587.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2:953-971.
- Endres K, Anders A, Kojro E, Gilbert S, Fahrenholz F, Postina R (2003) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem* 270:2386-2393.
- Esler WP, Wolfe MS (2001) A portrait of Alzheimer secretases--new features and familiar faces. *Science* 293:1449-1454.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Faivre-Sarrailh C, Falk J, Pollerberg E, Schachner M, Rougon G (1999) NrCAM, cerebellar granule cell receptor for the neuronal adhesion molecule F3, displays an actin-dependent mobility in growth cones. *J Cell Sci* 112 Pt 18:3015-3027.
- Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31:642-648.
- Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Sudhof TC (2001) Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410:41-49.
- Fields RD, Itoh K (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 19:473-480.
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Figge C (2009) Die Rolle Zytoskelett-assoziiierter Proteine bei der L1-vermittelten Neuritogenese und dem Neuritenwachstum. In: ZMNH, Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen. Hamburg: Universität Hamburg.
- Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M (2000) Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 148:811-824.
- Flick K, Ouni I, Wohlschlegel JA, Capati C, McDonald WH, Yates JR, Kaiser P (2004) Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* 6:634-641.
- Fogel M, Mechttersheimer S, Huszar M, Smirnov A, Abu-Dahi A, Tilgen W, Reichrath J, Georg T, Altevogt P, Gutwein P (2003a) L1 adhesion molecule (CD 171) in development and progression of human malignant melanoma. *Cancer Lett* 189:237-247.
- Fogel M, Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Smirnov A, Edler L, Ben-Arie A, Huszar M, Altevogt P (2003b) L1 expression as a predictor of progression and survival in patients with uterine and ovarian carcinomas. *Lancet* 362:869-875.
- Fox AH, Lam YW, Leung AK, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI (2002) Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol* 12:13-25.
- Foxall CD, Emery AE (1975) Changes in creatine kinase and its isoenzymes in human fetal muscle during development. *J Neurol Sci* 24:483-492.
- Franke WW, Scheer U (1974) Pathways of nucleocytoplasmic translocation of ribonucleoproteins. *Symp Soc Exp Biol*:249-282.
- Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, Vits L, Coucke P, Willems PJ (1995) CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet* 3:273-284.
- Fried H, Kutay U (2003) Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol Life Sci* 60:1659-1688.
- Friedlander 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 Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth. *J Cell Biol* 125:669-680.
- Fryns JP, Spaepen A, Cassiman JJ, van den Berghe H (1991) X linked complicated spastic paraplegia, MASA syndrome, and X linked hydrocephalus owing to congenital stenosis of the aqueduct of Sylvius: variable expression of the same mutation at Xq28. *J Med Genet* 28:429-431.
- Fujimuro M, Yokosawa H (2005) Production of antipolyubiquitin monoclonal antibodies and their use for characterization and isolation of polyubiquitinated proteins. *Methods Enzymol* 399:75-86.
- Fujimuro M, Sawada H, Yokosawa H (1994) Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Lett* 349:173-180.
- Furukawa Y, Ikuta N, Omata S, Yamauchi T, Isobe T, Ichimura T (1993) Demonstration of the phosphorylation-dependent interaction of tryptophan hydroxylase with the 14-3-3 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 194:144-149.
- Futcher AB, Cox BS (1984) Copy number and the stability of 2-micron circle-based artificial plasmids of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 157:283-290.
- Gao Y, Pimplikar SW (2001) The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14979-14984.
- Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V (1997) Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol* 137:703-714.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Gasbarri A, Del Prete F, Girnita L, Martegani MP, Natali PG, Bartolazzi A (2003) CD44s adhesive function spontaneous and PMA-inducible CD44 cleavage are regulated at post-translational level in cells of melanocytic lineage. *Melanoma Res* 13:325-337.
- Gast D, Riedle S, Issa Y, Pfeifer M, Beckhove P, Sanderson MP, Arlt M, Moldenhauer G, Fogel M, Kruger A, Altevogt P (2008) The cytoplasmic part of L1-CAM controls growth and gene expression in human tumors that is reversed by therapeutic antibodies. *Oncogene* 27:1281-1289.
- Gavert N, Conacci-Sorrell M, Gast D, Schneider A, Altevogt P, Brabletz T, Ben-Ze'ev A (2005) L1, a novel target of beta-catenin signaling, transforms cells and is expressed at the invasive front of colon cancers. *J Cell Biol* 168:633-642.
- Geppert M, Archer BT, 3rd, Sudhof TC (1991) Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *J Biol Chem* 266:13548-13552.
- Giebel LB, Dworniczak BP, Bautz EK (1988) Developmental regulation of a constitutively expressed mouse mRNA encoding a 72-kDa heat shock-like protein. *Dev Biol* 125:200-207.
- Gil OD, Sakurai T, Bradley AE, Fink MY, Cassella MR, Kuo JA, Felsenfeld DP (2003) Ankyrin binding mediates L1CAM interactions with static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol* 162:719-730.
- Girdwood D, Bumpass D, Vaughan OA, Thain A, Anderson LA, Snowden AW, Garcia-Wilson E, Perkins ND, Hay RT (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11:1043-1054.
- Giri DK, Ali-Seyed M, Li LY, Lee DF, Ling P, Bartholomeusz G, Wang SC, Hung MC (2005) Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol Cell Biol* 25:11005-11018.
- Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373-428.
- Godenschwege TA, Kristiansen LV, Uthaman SB, Hortsch M, Murphey RK (2006) A conserved role for Drosophila Neuroglian and human L1-CAM in central-synapse formation. *Curr Biol* 16:12-23.
- Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA (2004) Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* 14:505-514.
- Goodson ML, Hong Y, Rogers R, Matunis MJ, Park-Sarge OK, Sarge KD (2001) Sumo-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukemia nuclear body associated transcription factor. *J Biol Chem* 276:18513-18518.
- Gori F, Demay MB (2004) BIG-3, a novel WD-40 repeat protein, is expressed in the developing growth plate and accelerates chondrocyte differentiation in vitro. *Endocrinology* 145:1050-1054.
- Gorlich D, Mattaj JW (1996) Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271:1513-1518.
- Gorlich D, Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607-660.
- Gostissa M, Hengstermann A, Fogal V, Sandy P, Schwarz SE, Scheffner M, Del Sal G (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* 18:6462-6471.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
- Grandi P, Dang T, Pane N, Shevchenko A, Mann M, Forbes D, Hurt E (1997) Nup93, a vertebrate homologue of yeast Nic96p, forms a complex with a novel 205-kDa protein and is required for correct nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell* 8:2017-2038.
- Griffiths R, Whitehouse A (2007) Herpesvirus saimiri episomal persistence is maintained via interaction between open reading frame 73 and the cellular chromosome-associated protein MeCP2. *J Virol* 81:4021-4032.
- Grumet M, Edelman GM (1984) Heterotypic binding between neuronal membrane vesicles and glial cells is mediated by a specific cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 98:1746-1756.
- Gutwein P, Oleszewski M, Mechttersheimer S, Agmon-Levin N, Krauss K, Altevogt P (2000) Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J Biol Chem* 275:15490-15497.
- Gutwein P, Mechttersheimer S, Riedle S, Stoeck A, Gast D, Joumaa S, Zentgraf H, Fogel M, Altevogt DP (2003) ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *Faseb J* 17:292-294.
- Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP, Marme A, Phong MC, Linderkamp O, Skorokhod A, Altevogt P (2005) Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 11:2492-2501.
- Halaby DM, Mornon JP (1998) The immunoglobulin superfamily: an insight on its tissular, species, and functional diversity. *J Mol Evol* 46:389-400.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Halaby DM, Poupon A, Mornon J (1999) The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Eng* 12:563-571.
- Hall MN, Craik C, Hiraoka Y (1990) Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6954-6958.
- Hamada K, Shimizu T, Yonemura S, Tsukita S, Hakoshima T (2003) Structural basis of adhesion-molecule recognition by ERM proteins revealed by the crystal structure of the radixin-ICAM-2 complex. *Embo J* 22:502-514.
- Harpaz Y, Chothia C (1994) Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol Biol* 238:528-539.
- Hartmann D, de Strooper B, Serneels L, Craessaerts K, Herreman A, Annaert W, Umans L, Lubke T, Lena Illert A, von Figura K, Saftig P (2002) The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Genet* 11:2615-2624.
- Haspel J, Schurmann G, Jacob J, Erickson HP, Grumet M (2001) Disulfide-mediated dimerization of L1 Ig domains. *J Neurosci Res* 66:347-355.
- Hay RT (2001) Protein modification by SUMO. *Trends Biochem Sci* 26:332-333.
- Hay RT (2005) SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 18:1-12.
- Herman GE, Faust CJ, Darlison MG, Barnard EA (1991) Genetic mapping of the mouse X chromosome in the region homologous to human Xq27-Xq28. *Genomics* 9:670-677.
- Hershko A, Ciechanover A (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761-807.
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
- Heukeshoven J, Dernick R (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28-32.
- Hicke L (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:195-201.
- Hirokawa N (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci* 26:7139-7142.
- Hoffman EJ, Mintz CD, Wang S, McNickle DG, Salton SR, Benson DL (2008) Effects of ethanol on axon outgrowth and branching in developing rat cortical neurons. *Neuroscience* 157:556-565.
- Holm J, Appel F, Schachner M (1995) Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in homophilic interactions. *J Neurosci Res* 42:9-20.
- Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Bartsch U, Moos M, Lubbert H, Montag D, Schachner M (1996) Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recognition molecules. *Eur J Neurosci* 8:1613-1629.
- Hornick CA, Hamilton RL, Spaziani E, Enders GH, Havel RJ (1985) Isolation and characterization of multivesicular bodies from rat hepatocytes: an organelle distinct from secretory vesicles of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 100:1558-1569.
- Hortsch M (1996) The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* 17:587-593.
- Hortsch M (2000) Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol Cell Neurosci* 15:1-10.
- Huang Y, Myers SJ, Dingledine R (1999) Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci* 2:867-872.
- Huh C, Nagle JW, Kozak CA, Abrahamson M, Karlsson S (1995) Structural organization, expression and chromosomal mapping of the mouse cystatin-C-encoding gene (Cst3). *Gene* 152:221-226.
- Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A (2003) The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102:1186-1195.
- Ibrahim EC, Allory Y, Commo F, Gattegno B, Callard P, Paul P (2003) Altered pattern of major histocompatibility complex expression in renal carcinoma: tumor-specific expression of the nonclassical human leukocyte antigen-G molecule is restricted to clear cell carcinoma while up-regulation of other major histocompatibility complex antigens is primarily distributed in all subtypes of renal carcinoma. *Am J Pathol* 162:501-508.
- Ikegawa S, Isomura M, Koshizuka Y, Nakamura Y (1999) Cloning and characterization of human and mouse PROSC (proline synthetase co-transcribed) genes. *J Hum Genet* 44:337-342.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Jabs S (2007) Untersuchungen zur Interaktion von L1 mit Tpi1, Prkaa1 und Atp5g3. In: ZMNH, Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen. Hamburg: Universität Hamburg.
- Jans DA, Xiao CY, Lam MH (2000) Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22:532-544.
- Jensen ON, Podtelejnikov AV, Mann M (1997) Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Anal Chem* 69:4741-4750.
- Johansen KM, Kopp DM, Jellies J, Johansen J (1992) Tract formation and axon fasciculation of molecularly distinct peripheral neuron subpopulations during leech embryogenesis. *Neuron* 8:559-572.
- Johnson ES (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73:355-382.
- Kadmon G, Altevogt P (1997) The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* 61:143-150.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990a) Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate dependent. *J Cell Biol* 110:209-218.
- Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M (1990b) The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 110:193-208.
- Kadmon G, Imhof BA, Altevogt P, Schachner M (1995) Adhesive hierarchy involving the cell adhesion molecules L1, CD24, and alpha 6 integrin in murine neuroblastoma N2A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 214:94-101.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499-509.
- Kallunki P, Edelman GM, Jones FS (1997) Tissue-specific expression of the L1 cell adhesion molecule is modulated by the neural restrictive silencer element. *J Cell Biol* 138:1343-1354.
- Kalus I (2005) Untersuchungen zur Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM im Zentralen Nervensystem der Maus. In: ZMNH, Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen: Philipps-Universität Marburg.
- Kalus I, Schneegelsberg B, Seidah NG, Kleene R, Schachner M (2003) The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 278:10381-10388.
- Kalus I, Bormann U, Mzoughi M, Schachner M, Kleene R (2006) Proteolytic cleavage of the neural cell adhesion molecule by ADAM17/TACE is involved in neurite outgrowth. *J Neurochem* 98:78-88.
- Kamiguchi H, Lemmon V (1997) Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J Neurosci Res* 49:1-8.
- Kamiguchi H, Lemmon V (1998) A neuronal form of the cell adhesion molecule L1 contains a tyrosine-based signal required for sorting to the axonal growth cone. *J Neurosci* 18:3749-3756.
- Kamiguchi H, Yoshihara F (2001) The role of endocytic L1 trafficking in polarized adhesion and migration of nerve growth cones. *J Neurosci* 21:9194-9203.
- Kamiguchi H, Long KE, Pendergast M, Schaefer AW, Rapoport I, Kirchhausen T, Lemmon V (1998) The neural cell adhesion molecule L1 interacts with the AP-2 adaptor and is endocytosed via the clathrin-mediated pathway. *J Neurosci* 18:5311-5321.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.
- Kaneda Y, Hayes H, Uchida T, Yoshida MC, Okada Y (1987) Regional assignment of five genes on human chromosome 19. *Chromosoma* 95:8-12.
- Katayama M, Iwamatsu A, Masutani H, Furuue K, Takeda K, Wada H, Masuda T, Ishii K (1997) Expression of neural cell adhesion molecule L1 in human lung cancer cell lines. *Cell Struct Funct* 22:511-516.
- Keminer O, Peters R (1999) Permeability of single nuclear pores. *Biophys J* 77:217-228.
- King MC, Lusk CP, Blobel G (2006) Karyopherin-mediated import of integral inner nuclear membrane proteins. *Nature* 442:1003-1007.
- Kiseleva E, Goldberg MW, Allen TD, Akey CW (1998) Active nuclear pore complexes in *Chironomus*: visualization of transporter configurations related to mRNP export. *J Cell Sci* 111 (Pt 2):223-236.
- Kishore GM, Shah DM (1988) Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu Rev Biochem* 57:627-663.
- Kleene R, Yang H, Kutsche M, Schachner M (2001) The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J Biol Chem* 276:21656-21663.
- Klose RJ, Bird AP (2004) MeCP2 behaves as an elongated monomer that does not stably associate with the Sin3a chromatin remodeling complex. *J Biol Chem* 279:46490-46496.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Kohler M, Ansieau S, Prehn S, Leutz A, Haller H, Hartmann E (1997) Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* 417:104-108.
- Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ (2002) The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1. *J Biol Chem* 277:30283-30288.
- Kroll DJ, Abdel-Malek Abdel-Hafiz H, Marcell T, Simpson S, Chen CY, Gutierrez-Hartmann A, Lustbader JW, Hoeffler JP (1993) A multifunctional prokaryotic protein expression system: overproduction, affinity purification, and selective detection. *DNA Cell Biol* 12:441-453.
- Kuhn TB, Stoeckli ET, Condrau MA, Rathjen FG, Sonderegger P (1991) Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J Cell Biol* 115:1113-1126.
- Kumar A, Williams KR, Szer W (1986) Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 261:11266-11273.
- Kunz S, Spirig M, Ginsburg C, Buchstaller A, Berger P, Lanz R, Rader C, Vogt L, Kunz B, Sonderegger P (1998) Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin-1 and Ng cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 143:1673-1690.
- Kuwahara S, Ikei A, Taguchi Y, Tabuchi Y, Fujimoto N, Obinata M, Uesugi S, Kurihara Y (2006) PSPC1, NONO, and SFPQ are expressed in mouse Sertoli cells and may function as coregulators of androgen receptor-mediated transcription. *Biol Reprod* 75:352-359.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lairmore TC, Dou S, Howe JR, Chi D, Carlson K, Veile R, Mishra SK, Wells SA, Jr., Donis-Keller H (1993) A 1.5-megabase yeast artificial chromosome contig from human chromosome 10q11.2 connecting three genetic loci (RET, D10S94, and D10S102) closely linked to the MEN2A locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:492-496.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Showkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Landman N, Kim TW (2004) Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:337-351.
- Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I, Erickson HP (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* 258:987-991.
- Lee BC, Shav-Tal Y, Peled A, Gothelf Y, Jiang W, Toledo J, Ploemacher RE, Haran-Ghera N, Zipori D (1996) A hematopoietic organ-specific 49-kD nuclear antigen: predominance in immature normal and tumor granulocytes and detection in hematopoietic precursor cells. *Blood* 87:2283-2291.
- Lee HJ, Jung KM, Huang YZ, Bennett LB, Lee JS, Mei L, Kim TW (2002) Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J Biol Chem* 277:6318-6323.
- Lee RK, Wurtman RJ (2000) Regulation of APP synthesis and secretion by neuroimmunophilin ligands and cyclooxygenase inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 920:261-268.
- Leshchynska I, Sytnyk V, Richter M, Andreyeva A, Puchkov D, Schachner M (2006) The adhesion molecule CHL1 regulates uncoating of clathrin-coated synaptic vesicles. *Neuron* 52:1011-1025.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3:802-808.
- Lindner J, Rathjen FG, Schachner M (1983) L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305:427-430.
- Loers G, Chen S, Grumet M, Schachner M (2005) Signal transduction pathways implicated in neural recognition molecule L1 triggered neuroprotection and neuritogenesis. *J Neurochem* 92:1463-1476.
- Lusk CP, Blobel G, King MC (2007) Highway to the inner nuclear membrane: rules for the road. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:414-420.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Ma AS, Moran-Jones K, Shan J, Munro TP, Snee MJ, Hoek KS, Smith R (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein. *J Biol Chem* 277:18010-18020.
- Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F (1997) A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* 88:97-107.
- Maison C, Almouzni G (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:296-304.
- Makkerh JP, Dingwall C, Laskey RA (1996) Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* 6:1025-1027.
- Maness PF, Schachner M (2007) Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat Neurosci* 10:19-26.
- Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114:635-645.
- Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T, Robakis NK (2002) A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J* 21:1948-1956.
- Maretzky T, Schulte M, Ludwig A, Rose-John S, Blobel C, Hartmann D, Altevogt P, Saftig P, Reiss K (2005) L1 is sequentially processed by two differently activated metalloproteases and presenilin/gamma-secretase and regulates neural cell adhesion, cell migration, and neurite outgrowth. *Mol Cell Biol* 25:9040-9053.
- Martin KC, Kandel ER (1996) Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 17:567-570.
- Martini R, Schachner M (1986) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *J Cell Biol* 103:2439-2448.
- Martini R, Xin Y, Schachner M (1994) Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and neurites in culture. *Glia* 10:70-74.
- Mathur M, Tucker PW, Samuels HH (2001) PSF is a novel corepressor that mediates its effect through Sin3A and the DNA binding domain of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* 21:2298-2311.
- Matsumoto-Miyai K, Ninomiya A, Yamasaki H, Tamura H, Nakamura Y, Shiosaka S (2003) NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23:7727-7736.
- Matthews V, Schuster B, Schutze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ, Rose-John S (2003) Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* 278:38829-38839.
- Matunis MJ, Wu J, Blobel G (1998) SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 140:499-509.
- Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V, Altevogt P (2001) Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 155:661-673.
- Meehan RR, Lewis JD, Bird AP (1992) Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 20:5085-5092.
- Melchior F (2000) SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:591-626.
- Meli ML, Carrel F, Waibel R, Amstutz H, Crompton N, Jaussi R, Moch H, Schubiger PA, Novak-Hofer I (1999) Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int J Cancer* 83:401-408.
- Mintz CD, Dickson TC, Gripp ML, Salton SR, Benson DL (2003) ERMs colocalize transiently with L1 during neocortical axon outgrowth. *J Comp Neurol* 464:438-448.
- Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334:701-703.
- Morrison D (1994) 14-3-3: modulators of signaling proteins? *Science* 266:56-57.
- Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P (1994) Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom* 23:249-261.
- Mosammamaparast N, Pemberton LF (2004) Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol* 14:547-556.
- Mukaigawa J, Nayak DP (1991) Two signals mediate nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) polymerase basic protein 2. *J Virol* 65:245-253.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Mukhopadhyay D, Dasso M (2007) Modification in reverse: the SUMO proteases. *Trends Biochem Sci* 32:286-295.
- Mukhopadhyay D, Riezman H (2007) Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315:201-205.
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345-347.
- Muller S, Ledl A, Schmidt D (2004) SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* 23:1998-2008.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273.
- Mullock BM, Bright NA, Fearon CW, Gray SR, Luzio JP (1998) Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J Cell Biol* 140:591-601.
- Murrin LC, Talbot JN (2007) RanBPM, a scaffolding protein in the immune and nervous systems. *J Neuroimmune Pharmacol* 2:290-295.
- Nagase T, Miyajima N, Tanaka A, Sazuka T, Seki N, Sato S, Tabata S, Ishikawa K, Kawarabayasi Y, Kotani H, et al. (1995) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. III. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0081-KIAA0120) deduced by analysis of cDNA clones from human cell line KG-1. *DNA Res* 2:37-43.
- Nairn AC, Palfrey HC (1987) Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J Biol Chem* 262:17299-17303.
- Nakamura Y, Tamura H, Horinouchi K, Shiosaka S (2006) Role of neuropsin in formation and maturation of Schaffer-collateral L1cam-immunoreactive synaptic boutons. *J Cell Sci* 119:1341-1349.
- Nayeem N, Silletti S, Yang X, Lemmon VP, Reisfeld RA, Stallcup WB, Montgomery AM (1999) A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci* 112 (Pt 24):4739-4749.
- Needham LK, Thelen K, Maness PF (2001) Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-ankyrin interactions. *J Neurosci* 21:1490-1500.
- Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G (2001) gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294:2179-2181.
- Nishimura K, Yoshihara F, Tojima T, Ooashi N, Yoon W, Mikoshiba K, Bennett V, Kamiguchi H (2003) L1-dependent neuritogenesis involves ankyrinB that mediates L1-CAM coupling with retrograde actin flow. *J Cell Biol* 163:1077-1088.
- Offtender M, Schofer C, Weipoltshammer K, Grunt TW (2002) c-erbB-3: a nuclear protein in mammary epithelial cells. *J Cell Biol* 157:929-939.
- Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, Werb Z, Yong VW (1999) Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci* 19:8464-8475.
- Ohe Y, Hayashi H, Iwai K (1986) Human spleen histone H1. Isolation and amino acid sequence of a main variant, H1b. *J Biochem* 100:359-368.
- Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, Wong AJ, Saya H (2001) Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol* 155:755-762.
- Olmsted JB, Carlson K, Klebe R, Ruddle F, Rosenbaum J (1970) Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65:129-136.
- Paine PL, Moore LC, Horowitz SB (1975) Nuclear envelope permeability. *Nature* 254:109-114.
- Palm K, Belluardo N, Metsis M, Timmusk T (1998) Neuronal expression of zinc finger transcription factor REST/NRSF/XBR gene. *J Neurosci* 18:1280-1296.
- Pan D, Rubin GM (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271-280.
- Pante N, Kann M (2002) Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* 13:425-434.
- Paquette AJ, Perez SE, Anderson DJ (2000) Constitutive expression of the neuron-restrictive silencer factor (NRSF)/REST in differentiating neurons disrupts neuronal gene expression and causes axon pathfinding errors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12318-12323.
- Patton JG, Porro EB, Galceran J, Tempst P, Nadal-Ginard B (1993) Cloning and characterization of PSF, a novel pre-mRNA splicing factor. *Genes Dev* 7:393-406.
- Pemberton LF, Paschal BM (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6:187-198.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Perin MS, Brose N, Jahn R, Sudhof TC (1991) Domain structure of synaptotagmin (p65). *J Biol Chem* 266:623-629.
- Petersen TE, Thogersen HC, Skorstengaard K, Vibe-Pedersen K, Sahl P, Sottrup-Jensen L, Magnusson S (1983) Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:137-141.
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70:503-533.
- Pickart CM, Fushman D (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8:610-616.
- Pickart CM, Eddins MJ (2004) Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695:55-72.
- Pillay CS, Elliott E, Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363:417-429.
- Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, Bossi G, Chen H, De Camilli P, Di Fiore PP (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416:451-455.
- Poukka H, Aarnisalo P, Karvonen U, Palvimo JJ, Janne OA (1999) Ubc9 interacts with the androgen receptor and activates receptor-dependent transcription. *J Biol Chem* 274:19441-19446.
- Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402:884-888.
- Primakoff P, Myles DG (2000) The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16:83-87.
- Qi H, Rand MD, Wu X, Sestan N, Wang W, Rakic P, Xu T, Artavanis-Tsakonas S (1999) Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science* 283:91-94.
- Rajasekaran S, Balla S, Gradie P, Gryk MR, Kadaveru K, Kundeti V, Maciejewski MW, Mi T, Rubino N, Vyas J, Schiller MR (2009) Minomotif miner 2nd release: a database and web system for motif search. *Nucleic Acids Res* 37:D185-190.
- Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002) Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12:1231-1245.
- Rathjen FG, Schachner M (1984) Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *Embo J* 3:1-10.
- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *Embo J* 24:742-752.
- Ribbeck K, Gorlich D (2001) Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J* 20:1320-1330.
- Riedle S, Kiefel H, Gast D, Bondong S, Wolterink S, Gutwein P, Altevogt P (2009) Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J* 420:391-402.
- Riva S, Morandi C, Tsoulfas P, Pandolfo M, Biamonti G, Merrill B, Williams KR, Multhaup G, Beyreuther K, Werr H, et al. (1986) Mammalian single-stranded DNA binding protein UP I is derived from the hnRNP core protein A1. *Embo J* 5:2267-2273.
- Rodriguez MS, Desterro JM, Lain S, Midgley CA, Lane DP, Hay RT (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* 18:6455-6461.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273:1227-1231.
- Roopra A, Qazi R, Schoenike B, Daley TJ, Morrison JF (2004) Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol Cell* 14:727-738.
- Roth D, Morgan A, Martin H, Jones D, Martens GJ, Aitken A, Burgoyne RD (1994) Characterization of 14-3-3 proteins in adrenal chromaffin cells and demonstration of isoform-specific phospholipid binding. *Biochem J* 301 (Pt 1):305-310.
- Rout MP, Aitchison JD (2000) Pore relations: nuclear pore complexes and nucleocytoplasmic exchange. *Essays Biochem* 36:75-88.
- Ruegsegger U, Beyer K, Keller W (1996) Purification and characterization of human cleavage factor Im involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem* 271:6107-6113.
- 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* 131:1881-1891.
- Rutishauser U, Landmesser L (1996) Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends Neurosci* 19:422-427.
- Sadoul R, Kirchhoff F, Schachner M (1989) A protein kinase activity is associated with and specifically phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 53:1471-1478.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Sahin U, Weskamp G, Kelly K, Zhou HM, Higashiyama S, Peschon J, Hartmann D, Saftig P, Blobel CP (2004) Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J Cell Biol* 164:769-779.
- Saitoh H, Hinchey J (2000) Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem* 275:6252-6258.
- Sakurai T, Gil OD, Whittard JD, Gazdoui M, Joseph T, Wu J, Waksman A, Benson DL, Salton SR, Felsenfeld DP (2008) Interactions between the L1 cell adhesion molecule and ezrin support traction-force generation and can be regulated by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci Res* 86:2602-2614.
- Salton SR, Richter-Landsberg C, Greene LA, Shelanski ML (1983) Nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein: studies of a central and peripheral neuronal marker. *J Neurosci* 3:441-454.
- Sambrook J, Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Woodbury, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sammar M, Aigner S, Altevogt P (1997) Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim Biophys Acta* 1337:287-294.
- Saugier-Weber P, Martin C, Le Meur N, Lyonnet S, Munnich A, David A, Henocq A, Heron D, Jonveaux P, Odent S, Manouvrier S, Moncla A, Morichon N, Philip N, Satge D, Tosi M, Frebourg T (1998) Identification of novel L1CAM mutations using fluorescence-assisted mismatch analysis. *Hum Mutat* 12:259-266.
- Schachner M (1997) Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr Opin Cell Biol* 9:627-634.
- Schaefer AW, Kamiguchi H, Wong EV, Beach CM, Landreth G, Lemmon V (1999) Activation of the MAPK signal cascade by the neural cell adhesion molecule L1 requires L1 internalization. *J Biol Chem* 274:37965-37973.
- Schaefer AW, Kamei Y, Kamiguchi H, Wong EV, Rapoport I, Kirchhausen T, Beach CM, Landreth G, Lemmon SK, Lemmon V (2002) L1 endocytosis is controlled by a phosphorylation-dephosphorylation cycle stimulated by outside-in signaling by L1. *J Cell Biol* 157:1223-1232.
- Schaeffer HJ, Weber MJ (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19:2435-2444.
- Schlondorff J, Blobel CP (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112 (Pt 21):3603-3617.
- Schmid RS, Pruitt WM, Maness PF (2000) A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires Src-dependent endocytosis. *J Neurosci* 20:4177-4188.
- Schmidt C, Kunemund V, Wintergerst ES, Schmitz B, Schachner M (1996) CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 43:12-31.
- Schoenherr CJ, Anderson DJ (1995) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267:1360-1363.
- Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ (1996) Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9881-9886.
- Schrander-Stumpel CT (1998) What's in a name? *Am J Med Genet* 79:228.
- Schwartz DC, Hochstrasser M (2003) A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 28:321-328.
- Seals DF, Courtneidge SA (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7-30.
- Seeler JS, Dejean A (2003) Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:690-699.
- Seilheimer B, Schachner M (1988) Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J Cell Biol* 107:341-351.
- Selinger CI, Day CJ, Morrison NA (2005) Optimized transfection of diced siRNA into mature primary human osteoclasts: inhibition of cathepsin K mediated bone resorption by siRNA. *J Cell Biochem* 96:996-1002.
- Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565-597.
- Senner V, Kismann E, Puttmann S, Hoess N, Baur I, Paulus W (2002) L1 expressed by glioma cells promotes adhesion but not migration. *Glia* 38:146-154.
- Sewer MB, Nguyen VQ, Huang CJ, Tucker PW, Kagawa N, Waterman MR (2002) Transcriptional activation of human CYP17 in H295R adrenocortical cells depends on complex formation among p54(nrb)/NonO, protein-associated splicing factor, and SF-1, a complex that also participates in repression of transcription. *Endocrinology* 143:1280-1290.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Shulman T, Sauer FG, Jackman RM, Chang CN, Landolfi NF (1997) An antibody reactive with domain 4 of the platelet-derived growth factor beta receptor allows BB binding while inhibiting proliferation by impairing receptor dimerization. *J Biol Chem* 272:17400-17404.
- Siebrasse JP, Peters R (2002) Rapid translocation of NTF2 through the nuclear pore of isolated nuclei and nuclear envelopes. *EMBO Rep* 3:887-892.
- Silletti S, Mei F, Sheppard D, Montgomery AM (2000) Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J Cell Biol* 149:1485-1502.
- Silletti S, Yebra M, Perez B, Cirulli V, McMahon M, Montgomery AM (2004) Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent gene expression contributes to L1 cell adhesion molecule-dependent motility and invasion. *J Biol Chem* 279:28880-28888.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Smothers JF, Henikoff S (2000) The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Curr Biol* 10:27-30.
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem* 271:611-614.
- Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B, Hardy J, Capell A, Meyn L, Grim ML, Baumeister R, Fechteler K, Haass C (2000) Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol* 2:848-851.
- Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P (2006a) A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 393:609-618.
- Stoeck A, Schlich S, Issa Y, Gschwend V, Wenger T, Herr I, Marme A, Bourbie S, Altevogt P, Gutwein P (2006b) L1 on ovarian carcinoma cells is a binding partner for Neuropilin-1 on mesothelial cells. *Cancer Lett* 239:212-226.
- Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* 3:321-330.
- Straub T, Grue P, Uhse A, Lisby M, Knudsen BR, Tange TO, Westergaard O, Boege F (1998) The RNA-splicing factor PSF/p54 controls DNA-topoisomerase I activity by a direct interaction. *J Biol Chem* 273:26261-26264.
- Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalon DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA (2002) Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16899-16903.
- Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C (2005) Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2:261-267.
- Sugawa M, Ono K, Yasui Y, Kishi T, Tsumori T (1997) Enhancement of neurite outgrowth by the soluble form of human L1 (neural cell adhesion molecule). *Neuroreport* 8:3157-3162.
- Suntharalingam M, Wenthe SR (2003) Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev Cell* 4:775-789.
- Tanaka K, Nishide J, Okazaki K, Kato H, Niwa O, Nakagawa T, Matsuda H, Kawamukai M, Murakami Y (1999) Characterization of a fission yeast SUMO-1 homologue, pmt3p, required for multiple nuclear events, including the control of telomere length and chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 19:8660-8672.
- Tang N, He M, O'Riordan MA, Farkas C, Buck K, Lemmon V, Bearer CF (2006) Ethanol inhibits L1 cell adhesion molecule activation of mitogen-activated protein kinases. *J Neurochem* 96:1480-1490.
- Tappenbeck N (2008) Potentielle Interaktionspartner der intrazellulären Domäne des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1. In: ZMNH, Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, p 92. Braunschweig: TU Braunschweig.

Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Tatham MH, Kim S, Yu B, Jaffray E, Song J, Zheng J, Rodriguez MS, Hay RT, Chen Y (2003) Role of an N-terminal site of Ubc9 in SUMO-1, -2, and -3 binding and conjugation. *Biochemistry* 42:9959-9969.
- Taylor DD, Black PH (1986) Shedding of plasma membrane fragments. Neoplastic and developmental importance. *Dev Biol (N Y)* 1985) 3:33-57.
- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2:569-579.
- Thies A, Schachner M, Moll I, Berger J, Schulze HJ, Brunner G, Schumacher U (2002) Overexpression of the cell adhesion molecule L1 is associated with metastasis in cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer* 38:1708-1716.
- Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G, Berg T (1996) Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J Cell Sci* 109 (Pt 12):2905-2914.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Tozaki H, Kawasaki T, Takagi Y, Hirata T (2002) Expression of Nogo protein by growing axons in the developing nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 104:111-119.
- Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, Pavletich NP, Carver BS, Cordon-Cardo C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chi SG, Kim HJ, Misteli T, Jiang X, Pandolfi PP (2007) Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128:141-156.
- Tuvia S, Garver TD, Bennett V (1997) The phosphorylation state of the FIGQY tyrosine of neurofascin determines ankyrin-binding activity and patterns of cell segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12957-12962.
- Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, Okawa K, Nishimoto T, Bito H, Ninomiya H, Sugimoto H, Kinoshita A, Shimohama S (2006) Activity-dependent regulation of beta-catenin via epsilon-cleavage of N-cadherin. *Biochem Biophys Res Commun* 345:951-958.
- Urban RJ, Bodenbun Y (2002) PTB-associated splicing factor regulates growth factor-stimulated gene expression in mammalian cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E794-798.
- Urban RJ, Bodenbun Y, Kurosky A, Wood TG, Gasic S (2000) Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor is a negative regulator of transcriptional activity of the porcine p450sc insulin-like growth factor response element. *Mol Endocrinol* 14:774-782.
- Urban S, Freeman M (2002) Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12:512-518.
- Van Camp G, Fransen E, Vits L, Raes G, Willems PJ (1996) A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion molecule L1CAM (Xq28). *Hum Mutat* 8:391.
- van der Blik AM, Redelmeier TE, Damke H, Tisdale EJ, Meyerowitz EM, Schmid SL (1993) Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J Cell Biol* 122:553-563.
- Vassar R (2002) Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1589-1602.
- Vergar A, Perdomo J, Crossley M (2003) Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* 4:137-142.
- Vidal M, Brachmann RK, Fattaey A, Harlow E, Boeke JD (1996) Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10315-10320.
- von Tresckow B, Kallen KJ, von Strandmann EP, Borchmann P, Lange H, Engert A, Hansen HP (2004) Depletion of cellular cholesterol and lipid rafts increases shedding of CD30. *J Immunol* 172:4324-4331.
- Walsh FS, Doherty P (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:425-456.
- Wang SC, Lien HC, Xia W, Chen IF, Lo HW, Wang Z, Ali-Seyed M, Lee DF, Bartholomeusz G, Ou-Yang F, Giri DK, Hung MC (2004) Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2. *Cancer Cell* 6:251-261.
- Wawrzynczak EJ, Perham RN (1984) Isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding human calmodulin. *Biochem Int* 9:177-185.
- Weis K (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* 112:441-451.
- Welch WJ, Mizzen LA (1988) Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J Cell Biol* 106:1117-1130.

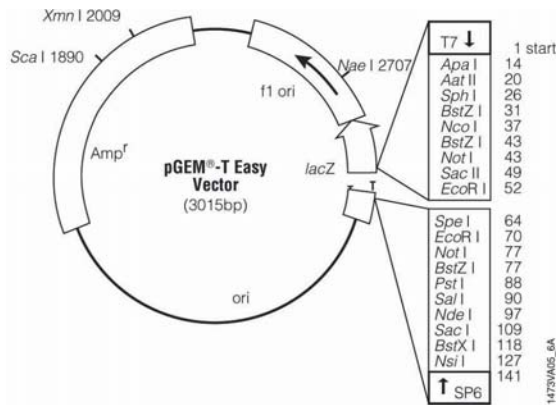
Kapitel 8 Literaturverzeichnis

- Weller S, Gartner J (2001) Genetic and clinical aspects of X-linked hydrocephalus (L1 disease): Mutations in the L1CAM gene. *Hum Mutat* 18:1-12.
- Werb Z, Yan Y (1998) A cellular striptease act. *Science* 282:1279-1280.
- Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138:141-143.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513-517.
- Wolff T, Unterstab G, Heins G, Richt JA, Kann M (2002) Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *J Biol Chem* 277:12151-12157.
- Wong EV, Schaefer AW, Landreth G, Lemmon V (1996a) Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 66:779-786.
- Wong EV, Schaefer AW, Landreth G, Lemmon V (1996b) Involvement of p90rsk in neurite outgrowth mediated by the cell adhesion molecule L1. *J Biol Chem* 271:18217-18223.
- Wood IC, Belyaev ND, Bruce AW, Jones C, Mistry M, Roopra A, Buckley NJ (2003) Interaction of the repressor element 1-silencing transcription factor (REST) with target genes. *J Mol Biol* 334:863-874.
- Wysocka J, Myers MP, Laherty CD, Eisenman RN, Herr W (2003) Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* 17:896-911.
- Xiao Z, Watson N, Rodriguez C, Lodish HF (2001) Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol Chem* 276:39404-39410.
- Xue Y, Zhou F, Fu C, Xu Y, Yao X (2006) SUMOsp: a web server for sumoylation site prediction. *Nucleic Acids Res* 34:W254-257.
- Yabkowitz R, Meyer S, Black T, Elliott G, Merewether LA, Yamane HK (1999) Inflammatory cytokines and vascular endothelial growth factor stimulate the release of soluble tie receptor from human endothelial cells via metalloprotease activation. *Blood* 93:1969-1979.
- Yamamoto H, Ihara M, Matsuura Y, Kikuchi A (2003) Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *Embo J* 22:2047-2059.
- Yan WL, Lerner TJ, Haines JL, Gusella JF (1994) Sequence analysis and mapping of a novel human mitochondrial ATP synthase subunit 9 cDNA (ATP5G3). *Genomics* 24:375-377.
- Yang SH, Sharrocks AD (2004) SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression. *Mol Cell* 13:611-617.
- Yang YS, Hanke JH, Carayannopoulos L, Craft CM, Capra JD, Tucker PW (1993) NonO, a non-POU-domain-containing, octamer-binding protein, is the mammalian homolog of Drosophila nonAdiss. *Mol Cell Biol* 13:5593-5603.
- Yasutomo Y, Suga T, Wada S, Kosano H, Takishima K, Mamiya G, Kugai N, Nagata N (1991) Purification and partial sequencing of inhibitory factor on renal membrane adenylate cyclase in pancreatic cancer extract: identity with histones H1b or H1d. *Biochem Biophys Res Commun* 176:255-261.
- Zhang H, Saitoh H, Matunis MJ (2002) Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 22:6498-6508.
- Zhang WW, Zhang LX, Busch RK, Farres J, Busch H (1993) Purification and characterization of a DNA-binding heterodimer of 52 and 100 kDa from HeLa cells. *Biochem J* 290 (Pt 1):267-272.
- Zhang X, Davis JQ, Carpenter S, Bennett V (1998) Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J Biol Chem* 273:30785-30794.
- Zhang Z, Carmichael GG (2001) The fate of dsRNA in the nucleus: a p54(nrb)-containing complex mediates the nuclear retention of promiscuously A-to-I edited RNAs. *Cell* 106:465-475.
- Zhao X, Yip PM, Siu CH (1998) Identification of a homophilic binding site in immunoglobulin-like domain 2 of the cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 71:960-971.
- Zonta B, Tait S, Melrose S, Anderson H, Harroch S, Higginson J, Sherman DL, Brophy PJ (2008) Glial and neuronal isoforms of Neurofascin have distinct roles in the assembly of nodes of Ranvier in the central nervous system. *J Cell Biol* 181:1169-1177.
- Zupan LA, Steffens DL, Berry CA, Landt M, Gross RW (1992) Cloning and expression of a human 14-3-3 protein mediating phospholipolysis. Identification of an arachidonoyl-enzyme intermediate during catalysis. *J Biol Chem* 267:8707-8710.

Kapitel 9 ANHANG

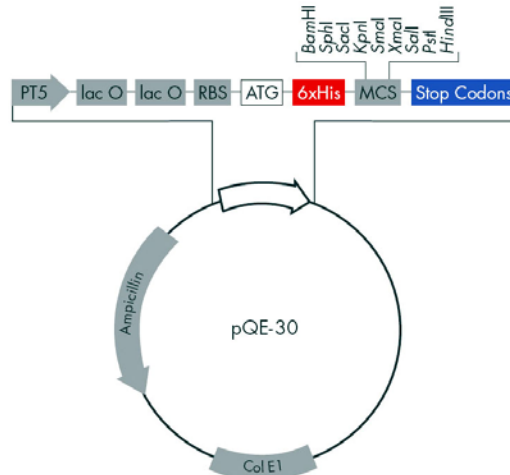
9.1 PLASMIDKARTEN

pGEM-T Easy, Promega



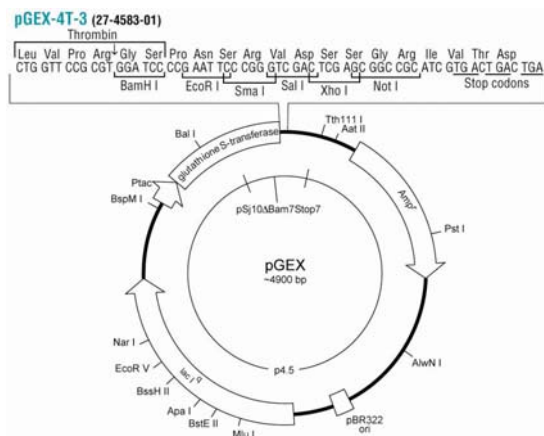
Quelle: Technisches Handbuch, pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Stand 12.05

pQE-30, Qiagen



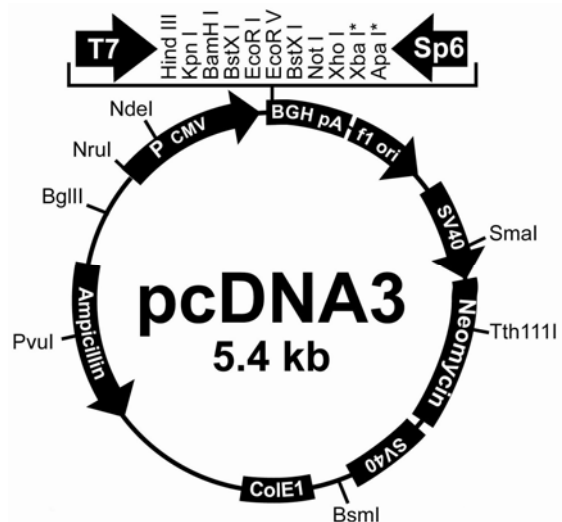
Quelle: The QIAexpressionist™, Stand 06.03

pGEX, Amersham Biosciences

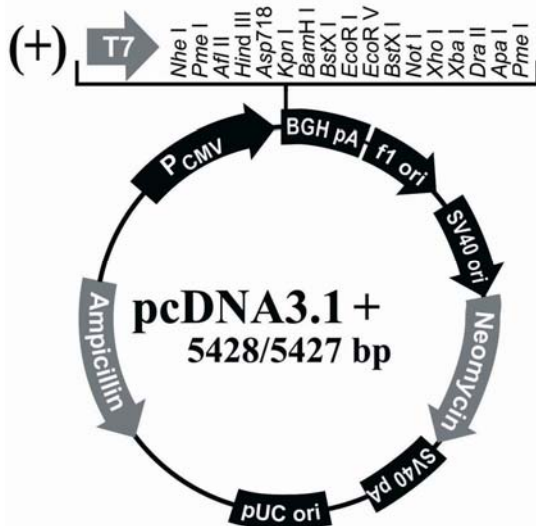


Quelle: Handbuch GST Gene Fusion System, Stand 2002

pcDNA3, Invitrogen

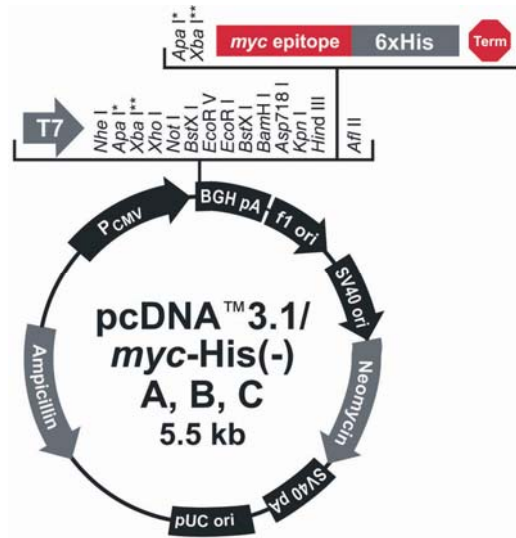


pcDNA3.1, Invitrogen



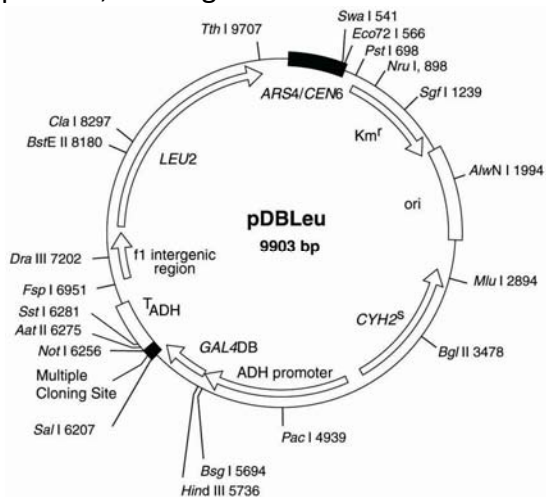
Quelle: Handbuch pcDNA3.1(+), Version 1, Stand 2001

pcDNA3.1 myc-His, Invitrogen



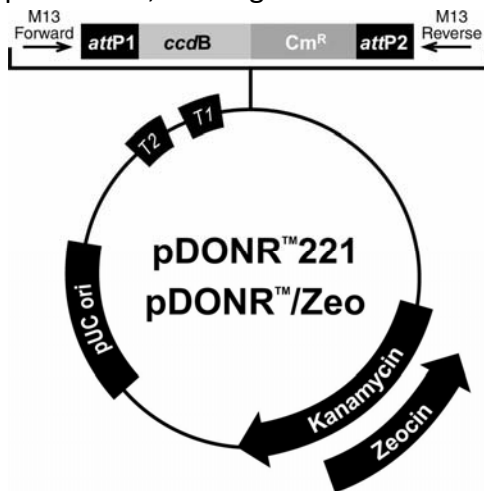
Quelle: pcDNA.3.1/myc-His(-) A, B, and C, Version F, Stand 02.03

pDBLeu, Invitrogen



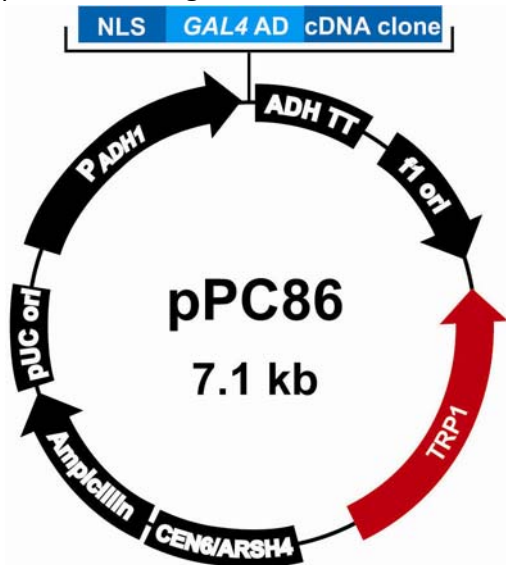
Quelle: Handbuch ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology, Version C, Stand 12.02

pDONR221, Invitrogen



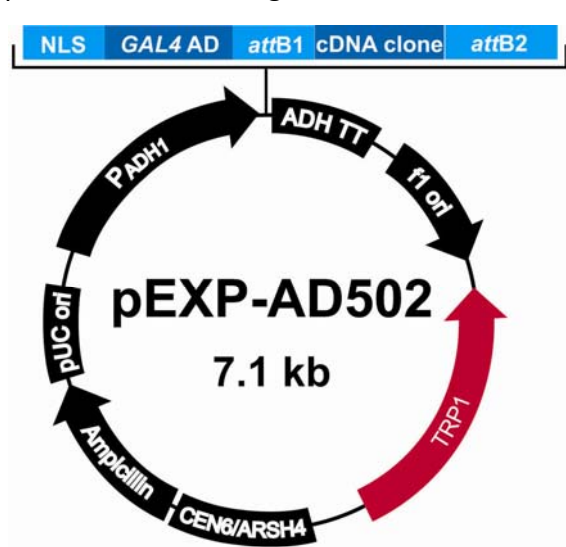
Quelle: Handbuch Gateway® Technology, Version E, Stand 07.03

pPC86, Invitrogen



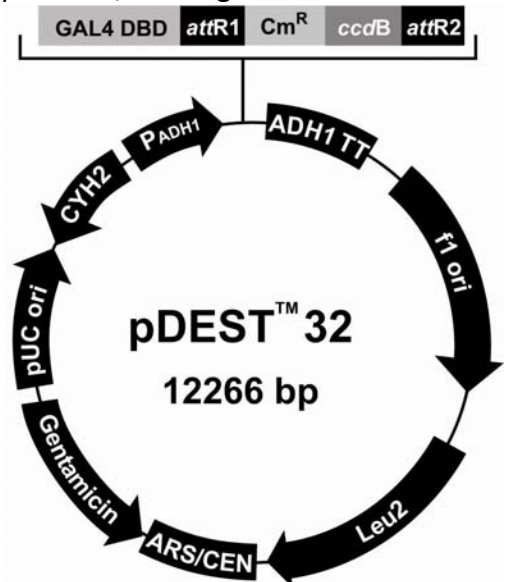
Quelle: Handbuch *ProQuest™ Pre-Made cDNA Libraries*, Version C, Stand 11.05

pEXP-AD502, Invitrogen



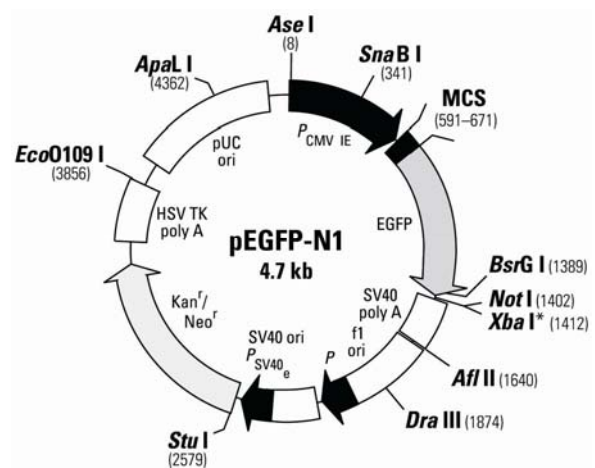
Quelle: Handbuch *ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology*, Version C, Stand 12.02

pDEST32, Invitrogen



Quelle: Handbuch *ProQuest™ Two-Hybrid System with Gateway® Technology*, Version C, Stand 12.02

pEGFP-N1, Clontech



Quelle: Handbuch *pEGFP-N1 Vector Information*, Stand 03.02

9.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|----------------|---|
| 3AT | 3-Amino-1,2,4-Triazol |
| 5'FOA | 5-Fluororotsäure |
| AD | Aktivierende Domäne |
| AD(T)P | Adenosin-di(tri)phosphat |
| ADAM | <i>a disintegrin and metalloprotease</i> |
| ARS | autonom replizierendes Segment |
| AS | Aminosäure |
| bp | Basenpaare |
| CAM | <i>cell adhesion molecule</i> |
| CHO | <i>chinese hamster ovary</i> |
| DAPI | 4'6,-diamidino-2-phenylindol |
| DB | DNS-bindende Domäne |
| DMEM | <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | dATP, dCTP, dGTP, dTTP (2'-Desoxy(ribo)-) |
| dsDNS | Doppelstrang-DNS |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | Escherichia coli |
| ECL | Elektrochemilumineszenz |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ExpASy | <i>Expert Protein Analysis System</i> |
| EZD | extrazelluläre Domäne |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| Fc | <i>fragment crystallizable region</i> |
| Fn-3 | Fibronectin Typ 3 Domäne |
| GMEM | <i>Glasgow Minimum Essential Medium</i> |
| HBSS | <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> |
| HEK | <i>human embryonic kidney</i> |
| His | Histidin |

Kapitel 9 Anhang

| | |
|----------|--|
| ID | intrazelluläre Domäne |
| Ig | Immunglobulin |
| IgSF | Immunglobulin-Superfamilie |
| insol | “insoluble” fraction (Qproteome Kit, Qiagen) |
| kDa | Kilodalton |
| LB | <i>lysogeny broth</i> |
| Lys | Lysin |
| MALDI | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i> |
| MMP | Matrix Metalloprotease |
| MWCO | <i>molecular weight cut off</i> |
| N2a | Neuroblasom 2a |
| nab | <i>nucleic-acid-binding protein fraction</i> (Qproteome Kit, Qiagen) |
| NES | Kernexportsequenz |
| NLS | Kernlokalisierungssequenz |
| OD | optische Dichte |
| ORF | <i>open reading frame</i> (offener Leserahmen) |
| p.a. | pro analysis |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung) |
| PC5A | Prohormonkonvertase 5A |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion) |
| PMA | Phorbol 12-Myristat 13-Acetat |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| ssDNS | Einzelstrang-DNS |
| SUMO | <i>small ubiquitin-like modifier</i> |
| TAE | Tris/Acetat/EDTA |
| TBS | <i>tris buffered saline</i> (Tris gepufferte Salzlösung) |
| TE | Tris/EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan |

Kapitel 9 Anhang

| | |
|-------|---|
| Trp | Tryptophan |
| ü. N. | über Nacht |
| Ub | Ubiquitin |
| Ura | Uracil |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| w/v | <i>weight per volume</i> |
| YPAD | Hefeextrakt-Pepton-Andeninsulfat-Glukose Medium |
| YPD | Hefeextrakt-Pepton-Glukose Medium |
| zyto | zytosolische Fraktion (Qproteome Nuclear Protein Kit, Qiagen) |

9.3 VERZEICHNIS DER TABELLEN

| | |
|--|-----|
| Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften..... | 24 |
| Tabelle 2.2: Verwendete stabil transfizierte Zelllinien..... | 25 |
| Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Zellkulturmediums für CHO-Zellen | 25 |
| Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Zellkulturmediums für HEK-, N2a- sowie SH-SY5Y-Zellen..... | 26 |
| Tabelle 2.5: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme und ihre Eigenschaften | 27 |
| Tabelle 2.6: Verwendet stabil transformierte Hefestämme und deren Eigenschaften..... | 29 |
| Tabelle 2.7: Verwendete Antibiotika..... | 30 |
| Tabelle 2.8: Verwendete Inhibitoren | 31 |
| Tabelle 2.9: Verwendete Stimulanzen | 31 |
| Tabelle 2.10: Verwendete Peptide..... | 31 |
| Tabelle 2.11: Verwendete Oligonukleotide..... | 32 |
| Tabelle 2.12: Verwendete Plasmide..... | 33 |
| Tabelle 2.13: Verwendete Expressionskonstrukte | 34 |
| Tabelle 2.14: Verwendete Primärantikörper | 35 |
| Tabelle 2.15: Verwendete Sekundärantikörper | 36 |
| Tabelle 2.16: Online-Datenbanken und -Werkzeuge | 38 |
| Tabelle 3.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngellösungen..... | 43 |
| Tabelle 3.2: PCR-Ansätze im Überblick. | 70 |
| Tabelle 3.3: Verwendete PCR-Programme..... | 70 |
| Tabelle 3.4: Verwendete Touch Down-PCR-Programme. | 71 |
| Tabelle 3.5: Anhängen von Adenosin-Überhängen an PCR-Fragmenten ohne 3'- Adenosine | 74 |
| Tabelle 3.6: Ligation von PCR-Fragmenten in den pGEM®-T Easy-Vektor | 74 |
| Tabelle 4.1: Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid <i>screens</i> mit L1-ID als Köderprotein..... | 118 |
| Tabelle 4.2: Funktionen der potentiellen L1-ID Bindungspartner aus dem Y2H-screen..... | 119 |
| Tabelle 4.3: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen der zytosolischen Fraktion..... | 123 |
| Tabelle 4.4: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen der Zellkern-Fraktion | 124 |

Tabelle 4.5: Mögliche zytosolische L1-Bindepartner - Funktion, Lokalisierung und Referenz..... 125

Tabelle 4.6: Mögliche L1-Bindungspartner im Zellkern – Funktion, Lokalisierung und Referenzen... 126

9.4 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer C1-Typ Ig-ähnlichen Domäne | 9 |
| Abbildung 1.2: Die Zell-adhäsionsmoleküle der L1-Familie..... | 10 |
| Abbildung 2.1: 100 bp DNA Ladder, Invitrogen..... | 37 |
| Abbildung 2.2: 1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen | 37 |
| Abbildung 2.3: BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen | 37 |
| Abbildung 2.4: Precision Plus Dual Color, Bio-Rad..... | 37 |
| Abbildung 4.1: Immunhistochemische Analyse der L1-ID Kernlokalisierung in unstimulierten und antikörperstimulierten Kleinhirnneuronen..... | 84 |
| Abbildung 4.2: Immunhistochemische Untersuchung der L1-Verteilung in N2a-Zellen unter Verwendung des Antikörpers L1-2C2..... | 85 |
| Abbildung 4.3: Carboxyterminale L1-Fragmente nach proteolytischer Prozessierung. | 87 |
| Abbildung 4.4: Welche proteolytischen Spaltprodukte von L1 gibt es – und welche sind im Zellkern? | 88 |
| Abbildung 4.5: Biochemische Analyse der L1-Kernlokalisierung in Kleinhirnneuronen. | 90 |
| Abbildung 4.6: Untersuchung des Einflusses von L1-557 auf den L1-Kernimport in Kleinhirnneuronen. | 91 |
| Abbildung 4.7: Einfluss von DAPT und GM6001 auf den L1-Kernimport..... | 93 |
| Abbildung 4.8: Einfluss von Ionomycin auf die L1-Prozessierung und Kernlokalisierung..... | 95 |
| Abbildung 4.9: Die Stimulation von SH-SY5Y Zellen mit Glutamat führt zu einer Abnahme von membranständigem L1 (L1-FL)..... | 96 |
| Abbildung 4.10: Einfluss von Glutamat-Stimulation und DAPT auf den L1-Kernimport..... | 97 |
| Abbildung 4.11: Stimulation von SH-SY5Y Zellen mit humanem und murinem L1-Fc..... | 98 |
| Abbildung 4.12: L1-Proteolyseexperiment mit Homogenat | 100 |
| Abbildung 4.13: Klonierungsschema der eukaryotischen L1-Konstrukte. | 101 |
| Abbildung 4.14: Übersicht über die Größe und Lokalisierung der L1-Konstrukte. | 102 |
| Abbildung 4.15: Biochemische Analyse der L1-Konstrukte auf Kernimport. | 103 |
| Abbildung 4.16: Immunhistochemische Untersuchung der Verteilung verschiedener L1-Konstrukte in HEK-Zellen. | 106 |
| Abbildung 4.17: Ist die L1-ID sumoyliert? | 108 |
| Abbildung 4.18: Biochemische Untersuchung zur potentiellen Sumoylierung von L1. | 109 |
| Abbildung 4.19: Biochemische Untersuchung zur potentiellen Ubiquitylierung von L1. | 110 |
| Abbildung 4.20: Ist der L1-Kernimport Importin abhängig? | 111 |
| Abbildung 4.21: Verteilung von L1 in endosomalen Fraktionen..... | 112 |
| Abbildung 4.22: Charakterisierung der endosomalen Fraktionen durch Markerproteine..... | 113 |
| Abbildung 4.23: Liegt L1 in ubiquitylierter Form in Endosomen vor?..... | 114 |
| Abbildung 4.24: Welche L1-Fragmente sind sowohl mit dem 557 und dem 172-R L1-Antikörper detektierbar?..... | 115 |
| Abbildung 4.25: Motive in der Transmembrandomäne von L1. | 116 |
| Abbildung 4.26: Titration von DB-X auf 3AT Platten. | 117 |

Kapitel 9 Anhang

| | |
|--|-----|
| Abbildung 4.27: Sequenzen der synthetisierten L1-Peptide..... | 120 |
| Abbildung 4.28: Qualitative Analyse von aufgereinigter, rekombinanter L1-ID..... | 121 |
| Abbildung 4.29: Aminosäuresequenzen der L1- und NCAM140-ID pQE-30 Konstrukte im Überblick. 122 | |
| Abbildung 4.30: Schema der Affinitätschromatographie..... | 122 |
| Abbildung 4.31: Pulldown Experimente zur Verifizierung der Affinitätschromatographie-Daten. | 127 |
| Abbildung 4.32: Co-Immunpräzipitation mit L1 Bindungspartnern aus dem Zellkern. | 128 |
| Abbildung 4.33: Immunhistochemische Untersuchung zur Co-Lokalisierung von L1-ID mit putativen Bindungspartnern in L1-557 stimulierten Kleinhirnneuronen. | 129 |
| Abbildung 4.34: Färbung von <i>Paraspeckle</i> Protein 1 in L1-557 stimulierten Neuronen..... | 130 |
| Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des konstitutiven und stimulierten L1-Kernimport in Neuronen..... | 141 |
| Abbildung 5.2: Vergleich der intrazellulären Domänen der L1-Familienmitglieder L1, ChL1, Neurofascin, Nr-CAM sowie weiterer γ -Sekretase Substrate deren ID in den Zellkern translozieren. | 144 |
| Abbildung 5.3: Vorgeschlagerener L1-Signalweg. | 145 |
| Abbildung 5.4: Vorschlag für das Zusammenspiel von L1 mit nuklearen Bindungspartnern. | 151 |

9.5 DANKSAGUNG

Die experimentellen Arbeiten wurden am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen durchgeführt. Mein ganz besonderer Dank hierfür gebührt an dieser Stelle Frau Professor Dr. Melitta Schachner, die mich zu jeder Zeit unterstützt hat und mir immer die Gewissheit gab, meine eigenen Ideen in dieser Arbeit verwirklichen zu können; ich danke Ihr für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Professor Dr. Matthias Kneussel möchte ich für die Übernahme der weiteren Gutachtertätigkeit ganz herzlich danken.

Priv.-Doz. Dr. Ralf Kleene möchte ich für die sehr gute Betreuung und den großen Input an Ideen während der Promotion besonders herzlich danken. Seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben zu großen Teilen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Dr. Gabriele Loers möchte ich mich für die freundschaftliche Betreuung und Hilfsbereitschaft in all den Jahren am ZMNH ganz herzlich bedanken.

Dr. Friedrich Buck (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, UKE) danke ich für die Analyse der L1-Interaktionspartner und für die Diskussionsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe und allen Kollegen aus dem Labor E.23, mit denen ich zusammen gearbeitet und viel Zeit verbracht habe. Für eine sehr gute Zusammenarbeit danke ich Carina Figge, Elisa Ramser und Nina Stemmer. Michael Knepper und Daniel Novak sind die coolsten boys. Claas Cassens danke ich für Freundschaft und *real life*. Ich möchte der EDV - und den weiteren hilfreichen Servicegruppen im ZMNH danken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für den Rückhalt und das Verständnis während der gesamten Promotion.