



UNIVERSITÄT HAMBURG

# **Untersuchungen zur Interaktion zwischen dem Zelladhäsionsmolekül L1 und dem Zytoskelettprotein Cortactin**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**ANJA BEHRENDT**

aus Karlsruhe

**Hamburg, 2005**

Gutachter: Herr Prof. Dr. H. Marquardt

Frau Prof. Dr. M. Schachner

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 27.05.2005

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1	Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie .....	9
1.2	Das Zelladhäsionsmolekül L1 .....	11
1.2.1	Die L1 Familie.....	11
1.2.2	Struktur und Funktion .....	11
1.2.3	Expression und Entwicklung.....	12
1.2.4	Homo- und heterophile Adhäsion der extrazellulären Domäne.....	13
1.2.5	Signaltransduktion: regulatorische Mechanismen der intrazellulären Domäne....	14
1.2.6	Die GFAP-L1-Maus: Lernen und Gedächtnis, Genexpression.....	19
1.3	Das Zytoskelettprotein Cortactin.....	22
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>27</b>
3.1	Chemikalien.....	27
3.2	Lösungen und Puffer .....	28
3.3	Nährmedien .....	36
3.4	Bakterienstamm und Zell-Linien.....	37
3.5	Zellkulturlösungen und -Medien.....	38
3.6	Molekulargewichtsstandards .....	39
3.7	Vektoren .....	40
3.8	Antikörper .....	42
3.8.1	Primäre Antikörper.....	42
3.8.2	Sekundäre Antikörper.....	44

<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>45</b>
4.1	Molekularbiologische Methoden .....	45
4.1.1	Modifizierung von DNA .....	45
4.1.1.1	Spaltung durch Restriktionsendonukleasen .....	45
4.1.1.2	Dephosphorylierung von DNA .....	45
4.1.1.3	Ligation von DNA-Fragmenten .....	45
4.1.1.4	DNA-Modifikation mittels ortsspezifischer Mutagenese .....	45
4.1.2	Plasmidisolierung aus E. Coli DH5 $\alpha$ .....	46
4.1.3	Agarosegelelektrophorese .....	47
4.1.4	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	47
4.1.5	Reinigung von DNA-Fragmenten .....	47
4.1.6	Transformation von Bakterien .....	48
4.1.7	Reinheitsanalyse und Konzentrationsbestimmung .....	48
4.1.8	DNA-Sequenzanalyse .....	48
4.2	Proteinbiochemische Methoden .....	49
4.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen (BCA-Test) .....	49
4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
4.2.3	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot) .....	50
4.2.4	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen .....	50
4.2.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch verstärkte Chemolumineszenz .....	50
4.2.6	Präparation von Protein aus Zell-Lysat .....	51
4.2.6.1	Herstellung von Gesamtzell-Lysat .....	51
4.2.6.2	Detergenslöslicher Anteil des Zell-Lysates .....	51
4.2.7	Fraktionierte Präparation von Zellbestandteilen aus Maus-Gehirnhomogenat .....	51
4.2.8	Immunpräzipitation .....	52
4.2.8.1	N2A-Zell-Lysat und Gesamthirnhomogenat .....	52
4.2.8.2	Gesamtzell-Lysat von L929-L1-Fibroblasten und L929-wt-Fibroblasten .....	53
4.3	Zellkulturtechniken .....	54
4.3.1	Zellkultur von Zell-Linien .....	54

4.3.1.1	Kultur von Neuroblastom2A (N2A)-Zellen .....	54
4.3.1.2	Kultur von L929-L1-Fibroblasten und L929-wt-Fibroblasten .....	54
4.3.1.3	Transiente Transfektion von L929-Zellen.....	55
4.4	Immunzytochemische Methoden .....	56
4.4.1	Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläsern .....	56
4.4.2	Doppelimmunfluoreszenzfärbungen .....	56
4.4.2.1	Hippocampusneuronen .....	56
4.4.2.2	L929- und L929-L1-Fibroblasten.....	57
4.4.2.3	Neuroblastom2A Zellen (N2A).....	58
4.4.3	Antikörperstimulation von N2A-Zellen .....	58
4.4.4	L1-Stimulation von L929-L1-Fibroblasten und L929-wt-Fibroblasten.....	58
4.4.5	Neuritenwachstum und Neuritogenese von Hippocampusneuronen.....	59
4.5	Immunhistochemie .....	60
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
5.1	Untersuchung der Lokalisation von L1 und Cortactin .....	61
5.1.1	Doppelimmunfluoreszenzfärbungen an Primärkulturen von Hippocampus- neuronen .....	61
5.1.2	Lokalisation von CAM-L1 und Cortactin im Hippocampus von P 5 Maus und adulter Maus .....	68
5.1.3	Subzelluläre Lokalisation von L1 und Cortactin in L1-stimulierten L929-L1- Fibroblasten und N2A-Zellen.....	71
5.2	Untersuchung einer direkten Interaktion von L1 und Cortactin.....	76
5.2.1	Koimmunpräzipitationen aus den detergenslöslichen Membranfraktionen des Gesamthirns einer P 6-Maus .....	76
5.2.2	Koimmunpräzipitationen aus den Zell-Lysaten L1-stimulierter N2A-Zellen.....	80
5.3	Untersuchungen zum Einfluss der L1-Stimulation auf die Cortactin-Tyrosin- Phosphorylierung.....	82

5.3.1	Änderung des Gesamtphosphotyrosinanteils von Cortactin in den Gesamtzell-Lysaten von L1-stimulierten L929-L1-Zellen .....	82
5.3.2	Untersuchung zu einer möglichen Cortactin-Y421-Phosphorylierung infolge der L1-Stimulation von L929-L1-Zellen .....	83
5.4	Untersuchung des Einflusses von Cortactin auf die Neuritogenese, die Neuritenzahl und das Neuritenwachstum .....	85
5.4.1	Untersuchung der Cortactinkonstrukte auf Proteinebene .....	85
5.4.2	Einfluss von Cortactin auf das L1- und NCAM-abhängige Neuritenwachstum hippocampaler Neuronen .....	88
5.4.3	Neuritogenese und Zahl der Neuriten von EGFP-C6-, EGFP-C12- und EGFP-CΔSH3-transfizierten Hippocampusneuronen .....	91
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>97</b>
6.1	Untersuchungen der Kolo-kalisation und Expressionsprofile von Cortactin und L1 in Primärkulturen von Hippocampusneuronen sowie im Hippocampus der Maus	98
6.2	Die subzelluläre Lokalisation von L1 und Cortactin in L1-stimulierten L929-L1-Fibroblasten und N2A-Zellen .....	103
6.3	Untersuchung einer direkten Interaktion von L1 und Cortactin durch Koimmunpräzipitationen.....	105
6.4	Untersuchungen zum Einfluss der L1-Stimulation auf die Cortactin-Tyrosin-Phosphorylierung an L929-L1-Fibroblasten.....	110
6.5	Der Einfluss von Cortactin auf das L1- oder NCAM-abhängige Neuritenwachstum, die Neuritogenese oder die Neuritenzahl.....	112
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>119</b>

<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>138</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis .....	138
9.2	Oligonukleotide .....	141
9.3	Accession numbers (Zuordnungsnummern) .....	142
9.4	Plasmide .....	143
9.4.1	EGFP-C1 .....	143
9.4.2	Klonierung von pEGFP-C6 und pEGFP-C12 .....	144
9.4.3	Klonierung von pEGFP-C $\Delta$ SH3 .....	146
9.5	Lebenslauf .....	148

# 1 Einleitung

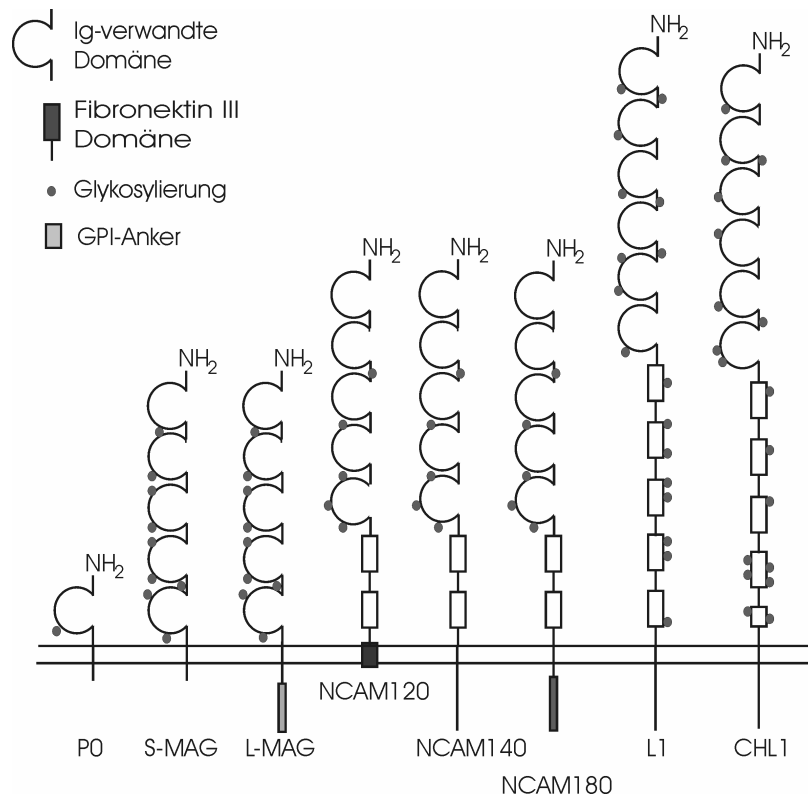
Die Entwicklung des Nervensystems hängt von einer Vielzahl ineinandergreifender Prozesse ab, die die Entstehung und Ausbildung der morphologischen Struktur des Gewebes und, damit verbunden, dessen Funktionalität regulieren. Zu diesen Prozessen zählen die Induktion, die Differenzierung und das Überleben neuraler Vorläuferzellen, die Wegfindung von Neuronen zu einem Bestimmungsort, sowie die Entstehung neuraler Kontakte (Purves und Lichtman, 1983, Goodman und Shatz, 1993, Edelman, 1986). Im adulten Nervensystem findet ein kontinuierlicher Neubildungsprozess von Gliazellen und, in bestimmten Gehirnregionen, von Nervenzellen statt, die in das umliegende Gewebe wandern und dort integriert werden müssen (für eine Übersicht: Gould and Gross 2002). Darüber hinaus sind erwachsene Neuronen befähigt, synaptische Kontakte umzustrukturieren und die Stärke von Synapsen zu verändern. Dieser Prozess wird als „synaptische Plastizität“ bezeichnet (im Überblick: Garner et al., 2002) und von Veränderungen in der Genexpression begleitet (im Überblick: Klann und Dever, 2004).

Grundlegend für diese Prozesse ist die Fähigkeit der Neuronen und ihrer auswachsenden Fortsätze und Dendriten, Kontakte mit anderen Neuronen und Gliazellen sowie mit der extrazellulären Matrix (EZM) auszubilden (Kater und Rehder, 1995, Gordon-Weeks und Fischer, 2000). Eine Vielzahl dieser Kontakte wird von integralen Membranproteinen vermittelt, die als Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules, CAMs*) bezeichnet werden. Sie werden aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft in Integrine (Hynes, 1992, Reichardt und Tomaselli, 1991), Cadherine (Kemler und Ozawa, 1989, Takeichi, 1991), Glykoproteine der EZM (Sanes, 1989, Reichardt und Tomaselli, 1991) und die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) (Williams und Barclay, 1988, Brümmendorf et al., 1993) unterteilt.



## 1.1 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) umfasst eine Gruppe von Molekülen, die nach ihrer extrazellulären Struktur mit mindestens einer Immunglobulin (Ig)-verwandten Domäne benannt wird. Die IgSF wiederum wird nach der Zahl der Ig-verwandten Domänen, dem Vorhandensein und der Anzahl von Fibronectin-Typ-III-verwandten Wiederholungen (FN-III), der Art der Molekülbindung an die Zellmembran und dem Vorhandensein katalytischer Domänen in verschiedene Untergruppen unterteilt. Neben der Gruppe der adhäsionsvermittelnden Moleküle unterscheidet man die Rezeptor-Phosphotyrosinphosphatasen (RPTP) und die Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Die extrazelluläre Domäne der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle (auch Zellerkennungsmoleküle genannt) variiert von einer Immunglobulineinheit, wie in P0, bis hin zu sechs N-terminal angeordneten Immunglobulinwiederholungen in L1 (L1) und dem *close homologue of L1* (CHL1). Diese Einheiten sind meist mit aneinander gereihten Fibronectin-Typ-III-Wiederholungen kombiniert, wie in NCAM, L1 und CHL1 (siehe Abb. 1). Die neuronalen Zelladhäsionsmoleküle sind entweder über eine Transmembrandomäne oder über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Zellmembran gekoppelt. Durch alternatives Spleissen eines primären Transkriptes entstehen drei Hauptisoformen von NCAM (Cunningham et al., 1987), von denen die 120 kDa-Isoform GPI-verankert vorliegt. Die beiden Isoformen höheren Molekulargewichtes (140 kDa und 180 kDa) sind mit einer Transmembrandomäne ausgestattet und unterscheiden sich durch einen 261-Aminosäure-Einschub in der intrazellulären Domäne (Abb. 1). Alle Mitglieder der IgSF verfügen über eine große Zahl an Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne. NCAM, L1 und CHL1 sind mit HNK-1-Kohlenhydrat-Epitopen dekoriert, die sulfatierte Glucuronsäure enthalten. Ein Kohlenhydrat, das bisher nur auf NCAM nachgewiesen wurde, ist das  $\alpha$ -2,8-gekoppelte Polysialinsäure (*polysialic acid*, PSA)-Kohlenhydrat. Menge und Verteilung des extrazellulär an NCAM gekoppelten PSAs beeinflusst die adhäsiven und Neuritenwachstum fördernden Eigenschaften des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls.



**Abb. 1: Übersicht über repräsentative Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (modifiziert nach Bormann, 2001).**

Zelladhäsionsmoleküle der IgSF Superfamilie. Zusätzlich zu den Ig-Domänen können noch mehrere FN-III-Domänen vorliegen. Die Verknüpfung mit der Zellmembran erfolgt über eine Transmembrandomäne, wie z. B. in NCAM 140 und NCAM 180, oder durch einen GPI-Anker, wie in NCAM 120.

## 1.2 Das Zelladhäsionsmolekül L1

### 1.2.1 Die L1 Familie

Das Zelladhäsionsmolekül L1 (Moos et al., 1988) gehört zur sog. L1-Unterfamilie der IgSF-Moleküle aus Wirbeltieren. Zu dieser Gruppe zählen weiterhin CHL1 (Holm et al., 1996), das *neuroglial cell adhesion molecule-related molecule* (NrCAM) aus Huhn (Grumet et al., 1991) und Neurofascin (Volkmer et al., 1992). In wirbellosen Tieren sind noch zwei L1-verwandte Moleküle entdeckt worden: Neuroglian aus *Drosophila* und Tractin aus Blutegel (Bieber et al., 1989 und Huang et al., 1997). Eine Übersicht geben Brümmendorf und Rathjen, (1996) sowie Hortsch, (1996). Die L1-Familie umfasst u. a. das Ratten-Homolog von L1, das *nerve growth factor-inducible large external glycoprotein* (NILE) (Prince et al., 1991) und die Zebrafisch Homologen L1.1 und L1.2 (Tongiorgi et al., 1995).

### 1.2.2 Struktur und Funktion

Das Zelladhäsionsmolekül L1 wurde Anfang der 1980er Jahre im zentralen Nervensystem (ZNS) der Maus identifiziert (Rathjen und Schachner, 1984). L1 fördert die Migration von Nervenzellen sowie das Auswachsen und die Bündelung von Neuriten. Außerdem unterstützt L1 die Regeneration von Axonen, das Überleben von Nervenzellen und die Myelinisierung von Schwann'schen Zellen *in vitro*. Darüber hinaus spielt L1 bei synaptischer Plastizität eine Rolle. Mutationen im L1-Gen des Menschen führen zu einer Reihe von Defekten während der Entwicklung des Zentralnervensystems und erzeugen eine neurologische Krankheit, die nach den hochvariabel auftretenden Krankheitsbildern mit der Bezeichnung CRASH-Syndrom bezeichnet wird: *corpus callosum hypoplasia*, *mental retardation*, *adducted thumbs*, *spastic paraplegia* und *hydrocephalus* (Fransen et al., 1995). Zu den Symptomen zählen angewinkelte Daumen, eine Hypoplasie des corpus callosum und/oder des Corticospinaltraktes, Hydro- oder Makrozephalus, eine Hypoplasie des vermis cerebelli und eine geistige Unterentwicklung (Willems et al., 1987). Das CRASH-Syndrom wird mit verschiedenen L1-Mutationen in Verbindung gebracht, wobei

zurzeit 134 pathogene Mutationen identifiziert worden sind. Die Mutationen des menschlichen L1-Gens, das auf dem X-Chromosom in der Region q28 liegt, betreffen alle Ig- und FN-III-Domänen sowie den zytoplasmatischen Bereich des Proteins (Van Camp et al., 1996). L1-*knock out* (ko-) Mäuse zeigen ähnliche Defekte wie die CRASH-Patienten und tragen wesentlich zur Untersuchung und Aufklärung der L1-Funktionen bei. L1 besteht extrazellulär aus sechs Ig-verwandten Domänen, gefolgt von fünf FN-III-Domänen, einer Transmembrandomäne und einem 114 AS umfassenden, phylogenetisch hoch konservierten zytoplasmatischen Rest (Abb. 1). Der extrazelluläre Teil vermittelt Wechselwirkungen mit L1 (homophile Interaktion) oder anderen Zelloberflächenmolekülen (heterophile Interaktion), während die intrazelluläre Domäne signalvermittelnd und regulatorisch wirkt. Von L1 existieren zwei Isoformen, die durch alternatives Spleissen eines einzigen Gens entstehen: eine neuronale Isoform und eine kürzere nicht-neuronale Isoform (z. B. Thor et al., 1987). Die neuronale Isoform enthält die gesamte kodierende Sequenz von 28 Exons, während der nicht-neuronalen Isoform die Exons 2 und 27 fehlen. Es konnte gezeigt werden, dass das Exon 27, das ein Tyrosin-basierendes Sortiermotiv (YRSL) innerhalb der zytoplasmatischen Domäne kodiert, für die clathrinvermittelte Endozytose notwendig ist (Kamiguchi et al., 1998). Neben dem 200 kDa großen *full-length* L1 konnten lösliche 180, 140 und 50 kDa-Fragmente (Lindner et al., 1983, Rathjen and Schachner, 1984) sowie ein 30 kDa großes membranassoziiertes Fragment (Gutwein et al., 2000, Mechttersheimer et al., 2001) identifiziert werden. Diese Fragmente entstehen durch proteolytische Prozessierung von L1 voller Länge, ein Vorgang von regulatorischer Bedeutung für die funktionellen Eigenschaften von L1.

### 1.2.3 Expression und Entwicklung

Die Expression von L1 beginnt während der frühen neuralen Entwicklung. L1 wird im zentralen Nervensystem (ZNS) von den meisten postmitotischen Zellen, hauptsächlich auf unmyelinisierten Axonen, exprimiert (Bartsch et al., 1989, Lindner et al., 1983). Gliazellen des ZNS exprimieren weder während der Embryonalentwicklung, noch nach der Geburt oder bei Läsion L1 (Bartsch et al., 1989, Jucker et al., 1996, Mohajeri et al., 1996). *In vivo*- und *in vitro*-Experimente zeigten, dass L1 sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Nervensystem wichtige Funktionen ausübt. So stören z. B. Antikörper gegen L1

die Migration von Körnerzellen in Kleinhirnexplantaten der Maus (Lindner et al., 1983) und die Bündelung von Neuriten *in vitro* und von Axonen *in vivo* (z. B. Fischer et al., 1986, Rathjen et al., 1987). Schließlich fördert L1, z. B. als gereinigtes Protein, auf der Zelloberfläche von Schwann'schen Zellen oder auf der Zelloberfläche von Astrozyten aus transgenen Mäusen das Wachstum von Neuriten (z. B. Appel et al., 1993, Mohajeri et al., 1996, Seilheimer und Schachner, 1988). Im lädierten peripheren Nervensystem (PNS) ist die Expression von L1 erhöht (Martini und Schachner, 1988) und könnte für die Regeneration von lädierten Nerven von Bedeutung sein. L1 spielt darüber hinaus eine Rolle bei Lernen und Gedächtnis (Rose, 1995) und bei synaptischer Plastizität (z. B. Lüthi et al., 1994 und 1996).

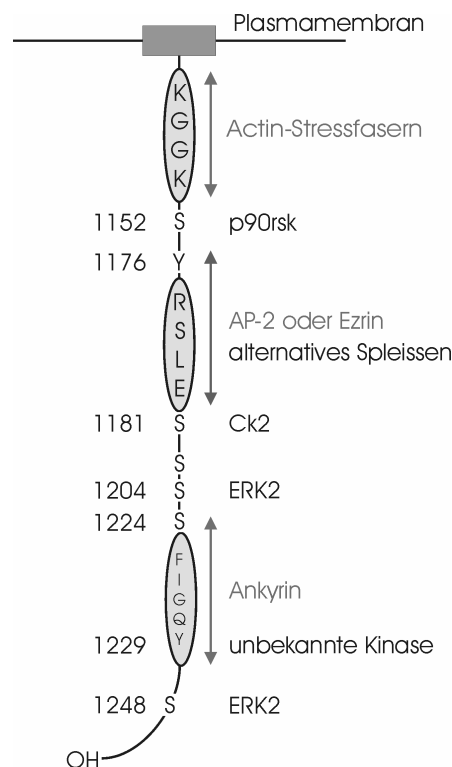
### **1.2.4 Homo- und heterophile Adhäsion der extrazellulären Domäne**

Während der Entwicklung des Nervensystems steuern die adhäsiven Eigenschaften von L1 das Neuritenwachstum, die Wegfindung und die Bündelung der Neuriten (für eine Übersicht: Brümmendorf et al., 1998, Kamiguchi und Lemmon, 1997). Die adhäsiven (oder abstoßenden) Eigenschaften von L1 werden von der extrazellulären Domäne vermittelt. Diese bindet *cis* oder *trans* sowohl homophil an L1 als auch heterophil an andere Ig-CAMs (für eine Übersicht: Grumet und Sakurai, 1996), z. B. an das GPI-verankerte Contactin/F3/F11 (Brümmendorf et al., 1993) oder an das *transiently expressed axonal glycoprotein-1* (TAG-1/axonin-1) (Kuhn et al., 1991, Malhotra et al., 1998), an DM1-GRASP (DeBernardo und Chang, 1996), an Laminin (Grumet et al., 1993) und an CD24/nectradrin (Kadmon et al., 1995, Sammar et al., 1997). Neben solchen homo- oder heterophilen Wechselwirkungen werden auch verstärkende oder inhibierende Effekte auf die homophile L1-L1-Interaktion infolge einer heterophilen NCAM-L1-Interaktion diskutiert (Horstkorte et al. 1993, Kadmon et al., 1990, Kristiansen et al., 1999). Darüber hinaus wurde eine Bindung von L1 an Integrine (Montgomery et al., 1996) und Rezeptor-Phosphotyrosinphosphatasen nachgewiesen (Friedlander et al., 1994). Aus dem extrazellulären Bereich von *full-length* L1 entstehen durch proteolytische Prozessierung lösliche Fragmente von 180, 140 und 50 kDa. Dieser Vorgang spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der integrin- und fibronektinvermittelten Zelladhäsion und

Zellmigration (Beer et al., 1999, Gutwein et al., 2000, Mechtersheimer et al., 2001) oder durch den Abbruch der homophilen L1-vermittelter Adhäsion (Nayeem et al., 1999).

### 1.2.5 Signaltransduktion: regulatorische Mechanismen der intrazellulären Domäne

Verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden werden infolge der extrazellulären Interaktionen aktiviert. Sie werden von der intrazellulären (IZ) Domäne übermittelt. Die IZ-Domäne enthält vier Phosphorylierungsstellen für Serin-Kinasen, zwei Tyrosinreste (von denen einer *in vitro* von pp60<sup>c-src</sup> phosphoryliert wird), eine Actin-Bindungsstelle, eine AP-2- oder Ezrin-Bindungsstelle und eine Ankyrin-Bindungsstelle, deren Phosphorylierungszustand die Interaktion von L1 mit dem Actinzytoskelett reguliert (Abb. 2).



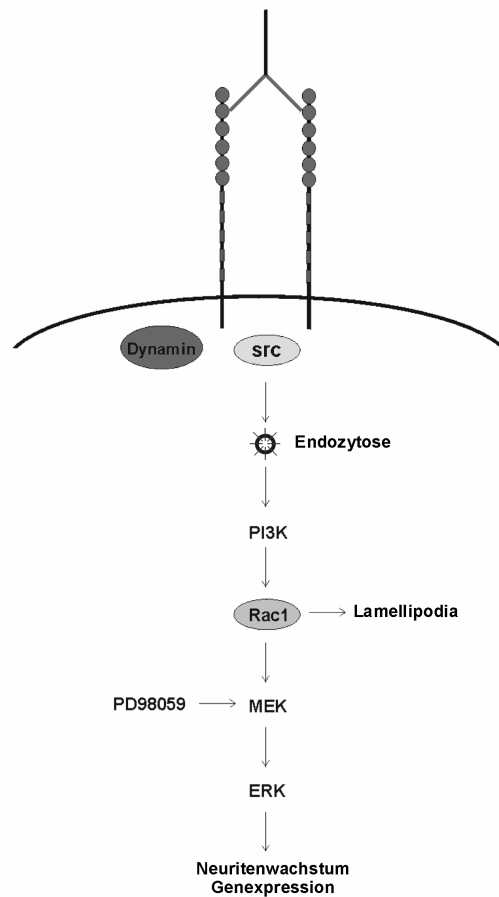
**Abb. 2: Bindungs- und Phosphorylierungsstellen in der intrazellulären Domäne von L1 (modifiziert nach Kenwrick et al., 2000).**

Schematisch dargestellt sind die verschiedenen Serin- und Tyrosinphosphorylierungsstellen der intrazellulären Domäne von L1 und, soweit bekannt, die Kinasen, die diese Reste phosphorylieren. Die

Bindungsmotive sowie die bindenden Proteine und die alternative Spleißstelle sind mit Doppelpfeilen markiert.

Die Serin-/Threonin-Kinase *ribosomal S kinase* ( $p90^{rsk}$ ), eine Komponente der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalkaskade, phosphoryliert L1, präzipitiert mit L1 und reguliert möglicherweise das L1-abhängige Neuritenwachstum (Wong et al., 1996). Auch ein Einfluss der nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase  $pp60^{c-src}$  (Src) auf das Neuritenwachstum konnte belegt werden, da das L1-abhängige Neuritenwachstum Src-negativer Neuronen beeinträchtigt ist (Ignelzi et al., 1994). Ng-CAM wird von der *chicken embryo kinase 5* (Cek5/EphB2), einer Rezeptor-Tyrosinkinase der Eph-Kinase Familie phosphoryliert (Zisch et al., 1997). Auch die Serin-/Threoninkinase *Casein kinase II* (CK II) phosphoryliert die neuronale und nicht-neuronale Isoform von L1 und konnte zusammen mit L1 koimmunpräzipitiert werden (Wong et al., 1996).

Ausgelöst durch das Clustern der extrazellulären Domänen von L1 durch anti-L1-Antikörper konnte eine Signalkaskade ermittelt werden, die zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK, auch: *extracellular signal regulated kinase*, ERK1 und ERK2) führt. Dieser Signaltransduktionsweg involviert die GTPase Dynamin,  $pp60^{c-src}$ , Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase und die GTPase  $p21^{rac}$ . Für die Aktivierung dieser Signalkaskade ist die  $pp60^{c-src}$ - und dynaminabhängige Endozytose von L1 notwendig (Schmid et al., 2000), (Abb. 3). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass die spezifische Inhibition der MAPK das L1-abhängige Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen auf L1-Substrat hemmt. Zusammengenommen ergibt sich ein Modell, dass das komplexe Zusammenspiel von extrazellulärer Aktivierung und intrazellulärer Regulierung verdeutlicht:  $pp60^{c-src}$ -Kinase reguliert die dynaminvermittelte Endozytose von L1 als Voraussetzung für das MAPK-abhängige Neuritenwachstum auf L1-Substrat. Darüber hinaus wird L1 nach extrazellulärer Stimulation von ERK 2 phosphoryliert und kopräzipitiert mit ERK 2 (interessanterweise bevorzugt mit endozytiertem L1) und mit der Serin-/Threonin-Kinase Raf-1 (Schaefer et al., 1999), ein weiterer Hinweis auf die regulatorischen Mechanismen infolge der extrazellulären Aktivierung.



**Abb. 3: Der L1-vermittelte Signaltransduktionsweg (modifiziert nach Schmid et al., 2000).**

Nach Aktivierung der extrazellulären Domäne von L1 wird die dynamin- und Src-abhängige Endozytose von L1 aktiviert. Es folgt schrittweise die Aktivierung von PI3K, Rac1, MEK und MAPK (ERK 1 und 2). Da der MEK-Inhibitor PD98059 das Neuritenwachstum inhibiert, ist diese Signalkaskade für das Neuritenwachstum notwendig. Es wird vorgeschlagen, dass die Rac-Aktivierung in Wachstumskegeln zu Veränderungen des Zytoskeletts und der Bildung von Lamellipodia führt. Weiterhin könnte die MAPK-Aktivierung Transkriptionsfaktoren aktivieren, die die Expression von Genen, die für das Neuritenwachstum erforderlich sind, auslösen.

Eine weitere wichtige Funktion der IZ-Domäne von L1 ist die Regulation der Endozytose, des intrazellulären Transports und der Zelloberflächenverteilung von L1. Vor der RSLE-Sequenz in der neuronalen Isoform von L1 befindet sich ein Tyrosinrest (Y1176). Die gesamte Sequenz YRSLE bildet ein tyrosinbasiertes Sortiermotiv für die Endozytose von L1 mittels clathrinüberzogener Vesikel (Kamiguchi et al., 1998). Diese Sequenz stellt *in vitro* eine Bindungsstelle für die  $\mu$ 2-Kette des clathrinassoziierten AP-2-Komplexes dar.



Darüber hinaus unterbinden Mutationen des Tyrosinrestes Y1176 oder die Deletion des RSLE-Motives die AP-2-Interaktion mit L1 und infolge dessen die clathrinvermittelte Endozytose von L1. In *dorsal root ganglion* (DRG-) Neuronen, die auf L1-Fc Substrat wachsen, findet die clathrinvermittelte Endozytose von L1 bevorzugt auf der Rückseite von Wachstumskegeln statt, was eine lokale Regulation der L1-Endozytose und, verknüpft mit dessen Wiederverwertung an anderen Orten der Zelloberfläche, an der Beweglichkeit der Wachstumskegel vermuten lässt (Kamiguchi und Lemmon, 2000b). Kamiguchi und Yoshihara (2001) konnten zeigen, dass eine Hemmung der L1-Endozytose durch AP-2-Antikörper zu einer verringerten Wanderungsgeschwindigkeit von Wachstumskegeln auf L1 führt. Außerdem ist die neuronale Isoform von L1 weniger adhäsiv, weil die äußerst schnelle Endozytose von L1 zu einer kürzeren Verweildauer des Moleküls auf der Zelloberfläche führt (Long et al., 2001). Der Phosphorylierungszustand von Y1176 entscheidet über die AP-2-Bindung und damit über die clathrinvermittelte Endozytose von L1: Y1176 wird *in vivo* phosphoryliert; *in vitro* findet diese Phosphorylierung durch pp60<sup>src</sup>-Kinase statt. Das AP-2-Adaptormolekül bindet jedoch an das dephosphorylierte Bindungsmotiv, das von einem spezifischen Antikörper an Stellen von Zell-Zell-Kontakten und an endozytierten Vesikeln nachgewiesen wird (Schaefer et al., 2002). Der Phosphorylierungszustand der YRSLE-Sequenz reguliert also die Endozytose und die damit verbundene Signaltransduktion in der Zelle. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Ezrin, ein Mitglied der Ezrin-, Radixin- und Moesin- (ERM-) Familie an die YRSLE-Sequenz von L1 bindet. Diese Interaktion könnte an der Koordination der axonalen Morphogenese beteiligt sein (Dickson et al., 2002).

Ein gemeinsames Merkmal der Mitglieder der L1-Familie ist deren Fähigkeit, mit dem Actinzytoskelett über das Ankyrin-Adaptorprotein zu interagieren (Davis und Bennet, 1993 und Hortsch, 2000). Die Funktion von Zelladhäsionsmolekülen, sowohl bei der Adhäsion als auch bei Bewegungsprozessen, hängt direkt von der Interaktion mit dem Zytoskelett ab (z. B. Gil et al., 2003, Bennett und Chen, 2001). Diese Interaktion wird durch die Kopplung des Ankyrin-Adaptor-Proteins einerseits an das Actinzytoskelett und andererseits an das (S)FIGQY-Motiv von L1 vermittelt (Davis and Bennett, 1993 und 1994, Hortsch, 2000). Dabei ist der Tyrosinrest dieses Motivs notwendig. Sowohl die Phosphorylierung, als auch die Mutation des Tyrosinrestes innerhalb der Bindungssequenz

inhibiert die Ankyrinbindung von L1 (Garver et al., 1997, Zhan et al., 1998, Hortsch et al., 1998). Die S1224L-Mutation in der (S)FIGQY-Sequenz reduziert zwar die Ankyrinbindung, beeinflusst jedoch nicht die Endozytose von L1. Dagegen verstärkt die Y1229H-Mutation die Endozytose von L1 (Needham et al., 2001), was regulierende Eigenschaften des (S)FIGQY-Motives auf L1-vermittelte Signalkaskaden vermuten lässt. Interessanterweise zeigen Ankyrin-B-ko-Mäuse einen ähnlichen Phänotyp wie L1-ko-Mäuse (Scotland et al., 1998). Möglicherweise trägt die Kopplung von L1 an das Zytoskelett zur Stabilisierung des Zelladhäsionsmoleküls in der Zellmembran bei. L1 kolokalisiert mit filamentösem Actin in den Filopodia und Lamellipodia von Wachstumskegeln (Letourneau und Shattuck, 1989). Das Sequenzmotiv, das für die Bindung von Actin-Stressfasern nötig ist, ist in der Nähe der p90rsk- (Serin-) Phosphorylierungsstelle lokalisiert, was einen Zusammenhang zwischen L1-abhängigem Neuritenwachstum und dem Actinzytoskelett vermuten lässt (Dahlin-Huppe et al., 1997). Eine weitere (gekoppelte) Signalkaskade, die mit dem CAM-aktivierten Neuritenwachstum einhergeht, führt zu Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Doherty und Walsh, 1996). Da das CAM-induzierte Neuritenwachstum von Kinase-Inhibitoren oder Kalziumkanal-Antagonisten inhibiert wird (Williams et al., 1992), vermutet man, dass Zelladhäsionsmoleküle sekundäre Botenstoffe aktivieren. Die Beteiligung des FGF-Rezeptors an diesem Vorgang wird kontrovers diskutiert: einerseits vermutet man, dass der FGF-Rezeptor (in *cis*) über eine extrazelluläre Bindungsstelle an *cis*-gekoppelte Zelladhäsionsmoleküle bindet, dann autophosphoryliert und den Phospholipase C ( $\text{PLC}\gamma$ )-Weg aktiviert (Williams et al., 1994a,b, Doherty et al., 1996, Doherty und Walsh, 1996, Brittis et al., 1996, Walsh und Doherty, 1997, Saffell et al., 1997, Lom et al., 1998, Meiri et al., 1998, Kolkova et al., 2000, Rønn et al., 2000). Da eine direkte Bindung zwischen L1 und dem FGF-Rezeptor bisher nicht nachgewiesen wurde, können die bisherigen Daten auch alternativ durch eine Konvergenz der aktivierten Signalkaskaden von L1 und dem FGF-Rezeptor nach einer extrazellulären Stimulation erklärt werden (Für eine Übersicht: Kamiguchi und Lemmon, 2000a).

### 1.2.6 Die GFAP-L1-Maus: Lernen und Gedächtnis, Genexpression

Da L1 das Neuritenwachstum fördert, wurde untersucht, ob die Expression von L1 in Astrozyten deren (im Zusammenhang mit Myelin) wachstumsinhibierenden Eigenschaften (Schwab et al., 1993, Schachner et al., 1994) überwinden kann.

Für diese Untersuchung wurden Mäuse erzeugt, die ektopisch die neuronale Isoform von L1 in (normalerweise L1-negativen) differenzierten Astrozyten exprimierten. Die Tiere wurden nach der Lokalisation der L1-kodierenden cDNA im Exon 1 des *glial fibrillary acidic proteins* GFAP-L1-Mäuse genannt. Tatsächlich konnte an Kryoschnitten der läsionierten optischen Nerven dieser Tiere ein deutlich verstärktes Neuritenwachstum nachgewiesen werden (Mohajeri et al., 1996). Neben seinen adhäsionsvermittelten Eigenschaften hat L1 auch einen Einfluss auf die synaptische Plastizität. Darunter versteht man die eine Reihe synaptischer Veränderungen, die natürlicherweise mit Lernvorgängen einhergehen: Neubildung und Umverteilung synaptischer Kontakte, die morphologische Modulation eines synaptischen Kontaktes z. B. durch Regulation der lokalen Proteinsynthese und eine anhaltende Veränderung der synaptischen Transmission (Murase und Schumann, 1999). Der Einfluss von L1 auf die synaptische Plastizität konnte durch eine Reihe von Experimenten belegt werden. Die hippocampale Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) wird durch funktionsunterbindende Antikörper gegen L1 in der CA1-Region auf Hippocampusschnitten und in L1-ko-Mäusen, die Defekte in der Bündelung von Axonen und dem Verteilungsmuster von Moosfasern aufweisen, reduziert (Lüthi et al., 1994). Die Expression von L1-mRNA kultivierter DRG-Neuronen wird durch Impulse niedriger Frequenz beeinflusst (Itoh et al., 1995 und 1997). Darüber hinaus konnte auch eine Beteiligung von L1 an der Gedächtniskonsolidierung von frisch geschlüpften Hühnern nachgewiesen werden (Scholey et al., 1995). Im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität, Lernen und Gedächtnis wurden weitere Experimente mit der GFAP-L1-Maus durchgeführt, um den Einfluss der L1-Expression in differenzierten Gliazellen zu untersuchen. Interessanterweise wurde einerseits eine signifikante Reduktion der LTP in der CA1-Region beobachtet (Lüthi et al., 1996), andererseits zeigten die GFAP-L1-Mäuse ein deutlich verbessertes räumliches Lernverhalten im *Morris Water Maze-Test* im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (Wolfer et al., 1998). Eine wichtige Folge

synaptischer Plastizität sind Änderungen der lokalen Genexpression in der Synapse (für eine Übersicht: Klann und Dever, 2004). Neuere Daten belegen, dass (im Zusammenhang mit Zellbeweglichkeit und -Invasion) der L1-aktivierte MAPK-Signaltransduktionsweg die Genexpression beeinflusst (Silletti et al., 2004). Darüber hinaus sind mehrere Schlüsselproteine des L1-vermittelten Signaltransduktionsweges auch an der translationalen Regulation der synaptischen Proteinexpression beteiligt (Klann und Dever, 2004). Um weitere Proteine zu identifizieren, deren Expression, im Zusammenhang mit synaptischer Plastizität, von L1 reguliert werden, wurden die GFAP-L1-Mäuse und eine Wildtyp-Kontrollgruppe dem *Morris Water Maze Test* unterzogen, da dieser Test das räumliche Lernvermögen der GFAP-L1-Tiere deutlich verbessert (Wolfer et al., 1998). Anschließend wurden die Hippocampi (eine Hirnregion, deren besondere Bedeutung für Lern- und Gedächtnisprozesse bekannt ist) dieser Tiere entfernt und mit Hilfe der *serial analysis of gene expression* (SAGE) -Technologie (Velculescu et al., 1995) die Genexpression vieler tausend mRNA-Transkripte gleichzeitig semi-quantitativ erfasst. Die Analyse wurde von der Fa. LION bioscience (Heidelberg, Deutschland) mit Hilfe der ARAKIS-DNA-Sequenzierungstechnologie und der BioSCOUT-Software der Fa. LION analysiert. Mehrere Tausend in GFAP-L1- und Wildtyp-Gewebe differentiell exprimierter Gene und *expressed sequence Tags* (ESTs) konnten so identifiziert werden. Tabelle 1 zeigt einen kleinen Ausschnitt aus dieser Liste.

<b>Protein</b>	<b>Häufigkeit und Verhältnis (L1:Wt)</b>
14-3-3-Zeta	17:1
beta-III-spektrin	3:8
DNA-binding protein NF1-A	6:0
Cortactin	1:6
Eph-Rezeptor A4	5:0
Dynein	6:0
membrane-associated guanylate kinase	0:7
Actin	113:107

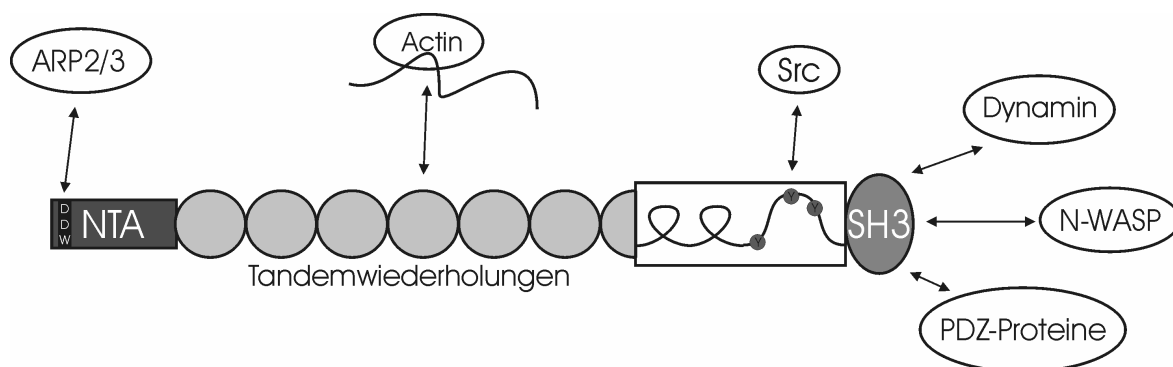
GAPDH	104:100
-------	---------

**Tab. 1: Auszug aus der Liste von Genen, die in GFAP-L1-Tieren und Wildtyp-Kontrolltieren nach dem Morris Water Maze Test unterschiedlich exprimiert wurden.**

Aufgelistet ist eine Auswahl von Genen, die mit verschiedener Häufigkeit in den Hippocampi der GFAP-L1-Mäuse (L1) und der Wildtyp-Kontrollgruppe (Wt) nachgewiesen wurden. Sowohl die Anzahl der Häufigkeiten als auch das Verhältnis der Häufigkeiten wurden semi-quantitativ erhoben. Als Kontrolle wurden sog. *housekeeping* Gene verwendet, die in allen Geweben gleich stark exprimiert werden (hier exemplarisch ausgewählt Actin und GAPDH). (Aus: „Modellregion Rhein-Neckar Dreieck: Untersuchungen von Expressionsprofilen zur Aufklärung des Mechanismus der Regeneration von Nervenzellen“, 2002).

### 1.3 Das Zytoskelettprotein Cortactin

Das multifunktionelle Protein Cortactin wurde vor mehr als zehn Jahren als Src-Substrat entdeckt (Wu et al., 1993). Humanes, Nagetier- und Affen-Cortactin haben eine konservierte molekulare Struktur und eine hohe Sequenzhomologie (Wu et al., 1993, Zhan et al., 1993, Schuurin et al., 1993, Ohako Y. und Takai, 1998). *EMS1*, das humane Analogon von Cortactin, ist auf dem Chromosom 11q13 lokalisiert. Cortactin besteht N-terminal aus ca. 90 Aminosäuren, die einen hohen Anteil saurer Reste enthalten, die sog. *N-terminal acidic* (NTA) Region. Innerhalb der NTA-Region ist ein konserviertes tryptophanhaltiges DDW-Motiv enthalten, das den *actin-related protein* (ARP)2/3-Komplex bindet (Higgs und Pollard, 2001, Weed et al., 2000). Es folgen 6,5 Wiederholungen aus 37 AS und eine 50-AS-Region, die eine große Zahl von Prolin-, Serin- und Threoninresten enthält. Cortactin endet C-terminal mit der SH3-Domäne (Abb. 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur von Cortactin.**

Der ARP2/3-Komplex, ein Nukleator der Actinpolymerisation, bindet an das DDW-Motiv innerhalb der NTA-Region. Es folgen 6,5 Tandemwiederholungen (TW), die vierte TW bindet filamentöses Actin. Die helikale/prolinreiche Domäne enthält Phosphorylierungsstellen für Serin-/Threonin-Kinasen und Src-Kinase. Die C-terminale SH3-Domäne kann mit Dynamin 2, PDZ-Proteinen oder N-WASP interagieren.

Cortactin wird in nahezu allen Geweben der Maus exprimiert (Migliarese et al., 1994, Yundru et al., 1998). Während Cortactin auf mRNA-Ebene im Gehirn stark exprimiert ist, wurde kein Cortactin in der Milz oder im Skelett-Muskel nachgewiesen. Die subzelluläre

Verteilung von Cortactin lässt auf eine Beteiligung bei der Reorganisation des Actinzytoskeletts schließen. In humanem Gewebe wurde Cortactin verstärkt an der apikalen Oberfläche polarisierter Epithelzellen nachgewiesen. Darüber hinaus war es in neuronalen Wachstumskegeln und dendritischen Dornen kultivierter Ratten-Hippocampusneuronen und *platelet-derived growth factor-* (PDGF-) und *epidermal growth factor-* (EGF-) induzierten Podosomen und Lamellipodia angereichert (Du et al., 1998, Kinnunen et al., 1998, Mizutani et al., 2002, Wu und Parsons, 1993). Mit Immunogold-Elektronenspektroskopie konnte die Lokalisation von Cortactin in den dendritischen Dornen des erwachsenen Hippocampus zugeordnet werden: während der Großteil im Zentrum der dendritischen Dornen akkumuliert war, befand sich nur eine Subfraktion in direkter Nähe der postsynaptischen Dichte (PSD). Es wurde vorgeschlagen, dass, neben der zytoskelettalen Reorganisation der dendritischen Dornen, ein kleiner synaptischer Pool des Proteins, möglicherweise als Folge synaptischer Aktivität, die PSD modifiziert (Racz und Weinberg, 2004). Eine Änderung der subzellulären Verteilung aus dem Zytoplasma an die Zellperipherie in Bereiche aktiver Actinreorganisation fand nach Wachstumsfaktor-induktion, Zelladhäsion, bakterieller Invasion oder mechanischem Stress statt (Ozawa et al., 1995, Weed et al., 1998, Cantarelli et al., 2000, Lopez et al., 2001, Birukov et al., 2002, Di Ciano et al., 2002). Neben diesen zellform- oder zellmobilitätsändernden Faktoren führte die synaptische Stimulation und NMDA-Rezeptor-Aktivierung zu einer schnellen Umverteilung von Cortactin aus dendritischen Dornen von Ratten-Hippocampusneuronen in den dendritischen Schaft, ein Reorganisationsvorgang, der möglicherweise bei Entwicklung und der späten Phase der Langzeitpotenzierung von Bedeutung ist (Hering und Sheng, 2003). Da in Karzinomen eine Cortactinüberexpression nachgewiesen wurde, vermutet man eine Beteiligung von Cortactin bei der Gewebeinvasion dieser Tumoren (Bowden et al., 1999, Lagarkova et al., 2000, Li et al., 2001). Cortactin ist ein multifunktionelles Protein, das an Prozessen beteiligt ist, denen eine schnelle Reorganisation des kortikalen Zytoskeletts zugrunde liegt, wie Zellwanderung (Liu et al., 1999, Huang et al., 1998, Huang et al., 2003), Zelladhäsion (Vuori und Ruoslati, 1995), Endozytose (Schafer, 2002, Cao et al., 2003, Lynch et al., 2003, Sauvonnnet et al., 2005), Vesikel-Transport (Kaksonen et al., 2000), Lamellipodiabildung (Vidal et al., 2002), Neuritenwachstum (Martinez et al., 2003) oder synaptische Plastizität (Hering und Sheng 2003, Racz und Weinberg, 2004). Bei diesen Prozessen wirkt Cortactin als Adaptorprotein

und interagiert mit Bestandteilen verschiedener Signaltransduktionswege. Diese Funktionen werden durch die einzelnen Domänen des Proteins ausgeübt und durch extrazelluläre Stimuli ausgelöst. Der Arp2/3-Komplex, ein Katalysator der Actinpolymerisation, bindet über das N-terminal lokalisierte DDW-Motiv (Weed et al., 2000, Uruno et al., 2001). Filamentöses Actin bindet an die vierte Tandemwiederholung. Die Actinpolymerisation wurde *in vitro* von N-WASP und WASP aktiviert. Ein denkbarer Regulationsprozess beruht auf dem Phosphorylierungszustand der helikalen/prolinreichen Domäne: ERK phosphoryliert Serin (S405 und S418), setzt die intramolekular gebundene SH3-Domäne von Cortactin frei, und der (N-)WASP-Komplex kann mit der SH3-Domäne von Cortactin interagieren. Die Phosphorylierung der Tyrosinreste Y421, Y466 und Y482 durch die Src-Kinase verursacht eine sterische Hinderung und unterbricht die (N-)WASP-Interaktion (Martinez-Quiles et al., 2004). Diese Theorie wird durch frühere Ergebnisse bestätigt: die F-Actin-Polymerisation wurde durch die Src-vermittelte Phosphorylierung vermindert (Hung et al., 1997). Weiterhin haben die Src-Phosphorylierungsstellen Y421, Y466 und Y482 einen Einfluss auf die Zellmobilität (Huang et al., 1998, Liu et al., 1999). Auch die nicht-Rezeptortyrosinkinase Fyn phosphoryliert Y421, Y466 und Y482 und beeinflusste die Zellbeweglichkeit von Melanomzellen (Huang et al., 2003). Zudem ist die GTPase Rac1 an der Phosphorylierung der Tyrosinreste Y421 und Y466 beteiligt (Head et al., 2003). Zu den Transmembranrezeptorvermittelten Stimuli, die die Phosphorylierung beeinflussen, gehört (neben der FGF-1-Aktivierung) auch die Aktivierung des Zelladhäsionsmoleküls ICAM, das mit phosphoryliertem Cortactin aus den Zell-Lysaten von Endothelzellen kopräzipitierte (Durieu-Trautmann et al., 1994, Tilghman und Hoover, 2002a). Als Adaptorprotein bindet Cortactin mit der SH3-Domäne auch Proteine der postsynaptischen Dichte, z. B. das *Cortactin binding Protein* (CBP90), das ausschließlich im Gehirn exprimiert wird (Ohoka und Takai, 1998). Die SH3-Domäne bindet weiterhin Proteine, die an der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt sind, nämlich die GTPase Dynamin und das *Cortactin-CD2-associated Protein* (CD2AP) (Lynch et al., 2003). Zusammen mit Arp2/3 und CD2AP vermittelt Cortactin zwischen der (EGF-aktivierten) Endozytose und dem Actinzytoskelett (Lynch et al., 2003). Cortactin und Dynamin regulieren die Abschnürung clathrinüberzogener Partikel (Cao et al., 2003). Ein kürzlich erschienener Artikel beschreibt den Einfluss von Cortactin sowohl auf die



## 1. EINLEITUNG

---

clathrinabhängige Endozytose, als auch auf die clathrinunabhängige Endozytose unter Beteiligung von Dynamin (Sauvonnet et al., 2005).

## 2 Ziel der Arbeit

Nachdem GFAP-L1-Mäuse, die die neuronale Isoform von L1 ektopisch in Astrozyten exprimierten, den *Morris Water Maze*-Test absolviert hatten, zeigten die GFAP-L1-Mäuse im Vergleich zur wt-Kontrollgruppe ein verbessertes Lernvermögen. Daraufhin wurde die Genexpression in Hippocampi transgener und wildtypischer Mäuse auf mRNA-Ebene mit Hilfe der SAGE-Technologie analysiert. Das zytoskelettale Protein Cortactin war als Ergebnis der SAGE-Analyse in der transgenen Maus im Verhältnis zur wt-Kontrolle deutlich herunterreguliert. Es wird natürlicherweise im Gehirn stark exprimiert. Cortactin ist in eine Vielzahl von Prozessen involviert, an denen auch L1 beteiligt ist, etwa Adhäsion, Zellbewegung, Endozytose, Neuritenwachstum oder synaptische Plastizität. All diese Prozesse sind mit einer schnellen Reorganisation des Actinzytoskeletts verbunden. Cortactin kann durch extrazelluläre Stimuli (unter Beteiligung von Transmembranrezeptoren oder des Ig-verwandten Moleküls ICAM) aktiviert werden. Viele Komponenten des L1-vermittelten Signaltransduktionsweges sind auch an der Regulation von cortactinabhängigen Prozessen beteiligt.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, basierend auf dem Ergebnis der SAGE-Analyse, eine direkte oder indirekte Interaktion von L1 und Cortactin immunhistochemisch, zellbiologisch oder biochemisch zu überprüfen. Die mögliche Beteiligung von Cortactin an der biologischen Funktion von L1 sollte durch Neuritenwachstumsexperimente untersucht werden.

## **3 Materialien**

### **3.1 Chemikalien**

Sämtliche Chemikalien wurden in p.A. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Invitrogen (Groningen, Niederlande), Macherey & Nagel (Düren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland). Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) und Molekulargewichtsstandards von Invitrogen bezogen. DNA-Aufreinigungskits wurden von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) und Qiagen (Hilden, Deutschland) gekauft. Plasmide und molekularbiologische Reagenzien wurden von den Firmen Amersham Bioscience, Clontech (Heidelberg, Deutschland), Invitrogen, Promega (Mannheim, Deutschland), Qiagen, Roche (Mannheim) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande) erhalten. Oligonukleotide wurden bei Metabion (München, Deutschland) bestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Plasmide sind im Anhang aufgeführt. Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Greiner Bio-One (Solingen, Deutschland), Nunc (Roskilde, Dänemark), Gibco (Karlsruhe, Deutschland) und PAA (Cölbe, Deutschland) bezogen.

## 3.2 Lösungen und Puffer

(in alphabetischer Reihenfolge)

<b>BCA-Reagenz A</b> ( <i>BCA-Test</i> )	1 % (w/v) Bicinchoninsäure Dinatriumsalz 1,7 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O 0,16 % (w/v) Natriumtartrat 0,4 % (w/v) NaOH 0,95 % (w/v) NaHCO <sub>3</sub> , pH 11,25
<b>BCA-Reagenz B</b> ( <i>BCA-Test</i> )	4 % (w/v) CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
<b>5 x SDS Probenpuffer</b> ( <i>SDS-PAGE</i> )	312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Glycerin 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
<b>Blockierungspuffer</b> ( <i>Western Blot</i> )	3 % (w/v) Milchpulver in TBS 0,05 % Tween-20
<b>Blockierungspuffer für Cortactin-P-Y421</b> ( <i>Western Blot</i> )	3 % TOP BLOCK (Sigma) in TBS 0,05 % Tween-20

### 3. MATERIALIEN

---

<b>Blockierungspuffer</b> <i>(Immunzytochemie)</i>	3 % (w/v) BSA in PBS II
<b>100 x BSA</b> <i>(Molekularbiologie)</i>	10 mg/ml BSA in H <sub>2</sub> O
<b>Carragen</b> <i>(Immunhistochemie)</i>	0,5 % (w/v) Carragen in PBS II 0,2 % NaN <sub>3</sub>
<b>DNA-Probenpuffer (5x)</b> <i>(DNA-Gelelektrophorese)</i>	50 % (w/v) Glycerol in TAE-Puffer 100 mg Orange G
<b>Elutionspuffer QF</b> <i>(Qiagen, Plasmid Maxi Kit)</i>	50 mM Tris-HCl, pH 8,5 1,25 M NaCl 15 % (v/v) Isopropanol
<b>Equilibrierungspuffer QBT</b> <i>(Qiagen, Plasmid Maxi Kit)</i>	50 mM MOPS, pH 7 750 mM NaCl 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % (w/v) Triton <sup>®</sup> X-100
<b>Gelsolubilisierungspuffer QG</b> <i>(Qiagen, Gel Extraction Kit)</i>	guanidinhydrochloridhaltiger Puffer

### 3. MATERIALIEN

---

<b>dNTP-Stock-Lösung</b> <i>(PCR)</i>	25 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP
<b>Elutionspuffer QF</b> <i>(Qiagen, Plasmid Maxi Kit)</i>	50 mM Tris-HCl, pH 8,5 1,25 M NaCl 15 % (v/v) Isopropanol
<b>Equilibrierungspuffer QBT</b> <i>(Qiagen, Plasmid Maxi Kit)</i>	50 mM MOPS, pH 7 750 mM NaCl 15 % (v/v) Isopropanol
<b>Ethidiumbromid Lösung</b> <i>(DNA Gele)</i>	10 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer
<b>Fixierlösung</b> <i>(Immunzytochemie, Immunhistochemie)</i>	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS II
<b>L929-Lysepuffer</b> <i>(Zell-Lyse)</i>	60 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % (v/v) Glycerol 0,5 % (v/v) Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) DNase, frisch zugegeben
<b>Laufpuffer</b> <i>(SDS-PAGE)</i>	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,05 % (w/v) SDS

### 3. MATERIALIEN

---

<b>Lösung I</b> ( <i>GFX™ Plasmid isolation</i> )	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA 400 µg/ml RNase
<b>Lösung II</b> ( <i>GFX™ Plasmid isolation</i> )	190 mM NaOH 1 % SDS
<b>Lösung III</b> ( <i>GFX™ Plasmid isolation</i> )	chaotroper Acetatpuffer
<b>Lysierpuffer P2</b> ( <i>Qiagen, Plasmid Maxi Kit</i> )	200 mM NaOH 1 % SDS
<b>Natriumcitrat</b> ( <i>Immunhistochemie</i> )	0,01 M Natriumcitrat, pH 9
<b>Neutralisationspuffer P3</b> ( <i>Qiagen, Plasmid Maxi Kit</i> )	3 mM Kaliumacetat, pH 5,5
<b>10 x PCR-Puffer</b>	200 mM Tris-HCl, pH 8,8 100 mM KCl 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1 % (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100 1 mg/ml BSA

### 3. MATERIALIEN

---

<b>PBS II</b> <i>(Immunzytochemie)</i>	1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 136 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl
<b>Permeabilisierungspuffer</b> <i>(Immunzytochemie)</i>	3 % BSA in PBS II 0,1 % oder 0,2 % (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100
<b>50 x Protease Inhibitor Stock-Lösung</b> <i>(COMPLETE<sup>®</sup>, EDTA free)</i>	1 Tablette auf 1 ml H <sub>2</sub> O
<b>Puffer für Antikörperverdünnung</b> <i>(Immunzytochemie)</i>	3 % BSA in PBS II
<b>Puffer für Antikörperverdünnung MTBST</b> <i>(Western Blot)</i>	5 % Milchpulver in TBST 0,05 % (v/v) Tween-20
<b>Puffer für die Cortactin-P-Y421- Antikörperverdünnung TBTBST</b> <i>(Western Blot)</i>	3 % TOP-BLOCK (Sigma) in TBST 0,05 % (v/v) Tween-20



### 3. MATERIALIEN

---

<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH 7,5
<i>(Zell-Lyse)</i>	150 mM NaCl
	1 mM Na <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> x 10 H <sub>2</sub> O
	1 % (w/v) Nonidet P-40
	1 mM EGTA*
	0,1 mM PMSF*
	1 mM NaF*
	2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> *
	1 x <i>Complete</i> <sup>®</sup> Inhibitor Lösung*
	* frisch vor Gebrauch zugeben
<b>SDS-Polyacrylamid-</b>	256 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,8
<b>sammelgel (4 %)</b>	3,15 deionisiertes Wasser
<i>(SDS-PAGE)</i>	31 µl 30 % (w/v) Acrylamid
	4 µl TEMED
	40 µl 10 % (w/v) SDS
	20 µl 10 % (w/v) APS
<b>SDS-Polyacrylamid-</b>	256 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,8
<b>sammelgel (5 %)</b>	3,15 ml deionisiertes Wasser
<i>(SDS-PAGE)</i>	531 µl 30 % (w/v) Acrylamid
	4 µl TEMED
	40 µl 10 % (w/v) SDS
	20 µl
	10 % (w/v) APS

### 3. MATERIALIEN

---

<b>SDS-Polyacrylamidtrenngel (8 %)</b> <i>(SDS-PAGE)</i>	2,63 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,8 2,45 ml deionisiertes Wasser 1,87 ml 30 % (w/v) Acrylamid 3,5 µl TEMED 70 µl 10 % (w/v) SDS 35 µl 10 % (w/v) APS
<b>SDS-Polyacrylamidtrenngel (10 %)</b> <i>(SDS-PAGE)</i>	2,63 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,8 1,96 ml deionisiertes Wasser 2,35 ml 30 % (w/v) Acrylamid 3,5 µl TEMED 70 µl 10 % (w/v) SDS 35 µl 10 % (w/v) APS
<b>Strip-Lösung</b> <i>(Proteinbiochemie)</i>	0,5 M NaCl 0,5 M Essigsäure
<b>T4 DNA Ligationspuffer, 2x</b> <i>(Roche, Rapid Ligation Kit)</i>	keine Herstellerangaben
<b>TAE</b> <i>(DNA-Gele)</i>	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0 2 mM EDTA
<b>TBS</b> <i>(Proteinbiochemie)</i>	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl

### 3. MATERIALIEN

---

<b>TBST</b> <i>(Proteinbiochemie)</i>	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween-20
<b>TN</b> <i>(Proteinbiochemie)</i>	25 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0 % - 1 % (v/v) Triton <sup>®</sup> X-100 * 1 mM EDTA * 1 mM EGTA * 1 mM NaF* 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> * 1 x <i>Complete</i> <sup>®</sup> Inhibitor Lösung * * frisch vor Gebrauch zugeben
<b>Transferpuffer</b> <i>(Western Blot)</i>	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
<b>Waschpuffer PE</b> <i>(Qiagen, Gel Extraction Kit)</i>	enthält 80 % Ethanol

### 3.3 Nährmedien

Die Nährmedien wurden autoklaviert, Antibiotika wurden nach Abkühlen auf unter 50 °C zugegeben.

<b>LB-Medium</b>	10 g/l Trypton, pH 7,4 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl
<b>LB-Amp.-Medium</b>	100 mg/l Ampicillin in LB-Medium
<b>LB-Kan.-Medium</b>	25 mg/l Kanamycin in LB-Medium
<b>LB-Amp.-Platten</b>	20 g/l Agar in LB-Medium 100 mg/l Ampicillin
<b>LB-Kan.-Platten</b>	20 g/l Agar in LB-Medium 25 mg/l Kanamycin

### 3.4 Bakterienstamm und Zell-Linien

<b>Escherichia Coli DH5<math>\alpha</math></b>	Kompetente Zellen, F <sup>-</sup> $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 <math>\lambda</math><sup>-</sup></i> (Invitrogen).
<b>Neuroblastom2A (N2A)</b>	Maus-Neuroblastomzell-Linie, etabliert von einem spontanen Tumor eines Albino A Mäusestamms.
<b>L929</b>	Fibroblasten-Zell-Linie, abgeleitet von einer männlichen C3H/An-Maus.
<b>L929-L1</b>	L929-Zell-Linie, die stabil mit der neuronalen Isoform von L1 transfiziert ist.

### 3.5 Zellkulturlösungen und -Medien

Die Zellkulturmedien wurden von PAA inklusive 4,5 g/l Glukose gekauft und mit den u. a. Zusätzen verwendet:

<b>N2A-Kulturmedium</b>	Dulbecco's MEM (DMEM) 10 % (w/v) fötales Kälberserum (FCS) 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 4 mM L-Glutamin 1 mM Pyruvat
<b>L929-Kulturmedium</b>	Dulbecco's MEM (DMEM) 10 % (w/v) fötales Kälberserum (FCS) 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 4 mM L-Glutamin
<b>L929-L1-Kulturmedium</b>	Dulbecco's MEM (DMEM) 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS) 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 4 mM L-Glutamin 0,3 mg/ml Geneticin (G418)
<b>Versen</b>	Gibco BRL

### 3.6 Molekulargewichtsstandards

**1 kb DNA Leiter**

*(Life Technologies)*

Für die Bestimmung des Molekulargewichts (14 Banden zwischen 0,2-10 kBp) wurde ein Agarosegel mit 12  $\mu$ l Marker pro Tasche beladen.

**Benchmark™ Proteinleiter**

*(Life Technologies)*

SDS-Gele wurden mit 20  $\mu$ l des Molekulargewichtsstandards pro Tasche beladen (10 Banden von ~10 kDa-190 kDa).

### 3.7 Vektoren

- PJL6** Retroviraler Expressionsvektor MGIN, der für GFP-Cortactinfusionsprotein kodiert, Ampicillin (Amp.)-Resistenz. (Ein Geschenk von Jiali Liu/Xi Zhan, Holland Laboratory, Rockville).
- PJL12** Retroviraler Expressionsvektor MGIN, der für GFP-CortacinF421/466/482-Fusionsprotein (enthält Mutationen in den Src-Phosphorylierungsstellen) kodiert, Amp.-Resistenz. (Zur Verfügung gestellt von Jiali Liu/Xi Zhan, Holland Laboratory, Rockville).
- pEGFP-C1-Cortactin $\Delta$ SH3** Vektor, dessen GFP- und Cortactin $\Delta$ SH3-(Cortactin, dessen SH3-Bindungsstelle deletiert ist) kodierende Sequenzen durch 98 Bp getrennt sind, Kanamycin-/Neomycin-(Kan./Neo.)Resistenz. (Zur Verfügung gestellt von H. Rauvala, (Neuroscience Center and Department of Biosciences, University of Helsinki).
- pEGFP-C1** Klonierungsvektor zur Expression N-terminal GFP-fusionierter Proteine in Säugetier-Zellen, Kan./ Neo.-Resistenz (Clontech).
- pEGFP-C6** Vektor für die Expression von GFP-Cortactinfusionsprotein in Säugetierzellen, Kan./Neo.-Resistenz.
- pEGFP-C12** Expressionsvektor für GFP-CortacinF421/466/482-Fusionsprotein in Säugetierzellen (enthält Cortactin mit Mutationen in den Src-Phosphorylierungsstellen Y421/466/482), Kan./Neo.-Resistenz.



### 3. MATERIALIEN

---

#### **pEGFP-C $\Delta$ SH3**

Vektor für die Expression von GFP-Cortactin $\Delta$ SH3-Fusionsprotein (enthält Cortactin, dessen SH3-Bindungsstelle deletiert ist.), Kan./Neo.-Resistenz.

## 3.8 Antikörper

### 3.8.1 Primäre Antikörper

IB: Immunoblot, IHC: Immunhistochemie, IP: Immunpräzipitation, IZC: Immunzytochemie

<b>anti-<math>\beta</math>-Catenin</b>	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (Santa Cruz), (ein Geschenk von Gaby Rune, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg).  IZC: 1:500 (3 % BSA in PBS II)
<b>anti-Cortactin (4F11)</b>	Monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen ein Epitop in der Actinbindungsdomäne (Upstate).  IB: 1:1000, 1 $\mu$ g/ml (3-5 % MPBST) IHC: 1:250 (0,5 % Carragen in PBS II) IZC: 1:50 (3 % BSA in PBS II) IP: 5 $\mu$ g
<b>anti-Cortactin-P-Y421 (421B)</b>	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, gerichtet gegen Cortactin-P-Y421 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt und produziert im Labor von Scott Weed, University of Colorado Health Sciences Center, Colorado).  IB: 1:5000 (3 % TBTBST)
<b>anti-EGFP</b>	Polyklonaler Antikörper aus Ziege, gerichtet gegen das GFP-Epitop (Rockland).  IB: 1:1000 (5 % MTBST)
<b>anti-GAPDH (6C5)</b>	Monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen GAPDH aus Skelettmuskel (Chemicon).  IB: 1:2000 (3 % MTBST)

<b>anti-L1 (pab <math>\alpha</math>L1)</b>	<p>Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen. Gerichtet gegen L1-Fc-Fusionsprotein. (Produziert im Labor von M. Schachner).</p> <p>IB: 1:80000 (0,5 <math>\mu</math>g/ml in 3-5 % MTBST)</p> <p>IZC: 1:500 (7 <math>\mu</math>g/ml in 3 % BSA in PBS II)</p> <p>IHC: 1:50 (3,7 <math>\mu</math>g/ml affinitätsgereinigter pab <math>\alpha</math>L1 in 0,5 % Carragen in PBS II)</p>
<b>anti-L1 (555)</b>	<p>Monoklonaler Antikörper aus Ratte, gerichtet gegen eine extrazelluläre Domäne von L1 (hergestellt im Labor von M. Schachner).</p> <p>IZC: 1:500 (3,8 <math>\mu</math>g/ml in Zellkulturmedium)</p> <p>IP: 4 <math>\mu</math>g (N2A-Lysat), 10 <math>\mu</math>g (Gesamthirnhomogenat)</p>
<b>anti-NCAM (2B2)</b>	<p>Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, gerichtet gegen NCAM-Fc (hergestellt im Labor von M. Schachner).</p> <p>IB: 1:30000 (0,5 <math>\mu</math>g/ml in 5 % MTBST)</p>
<b>anti-NCAM (1B1)</b>	<p>Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, gerichtet gegen NCAM-Fc (hergestellt im Labor von M. Schachner).</p> <p>IB: 1:15000 (0,5 <math>\mu</math>g/ml in 5 % MTBST)</p>
<b>anti-NCAM (D3)</b>	<p>Monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen das Exon 18 der intrazellulären Domäne von NCAM 180.</p> <p>IP: 4 <math>\mu</math>g (N2A-Lysat), 10 <math>\mu</math>g (Gesamthirnhomogenat)</p>
<b>anti-Phosphotyrosin (P-Tyr-100)</b>	<p>Monoklonaler Antikörper aus Maus, gerichtet gegen Gesamtphosphotyrosin (Cell Signalling).</p> <p>IB: 1:2000 (2 % MTBST)</p>
<b>anti-Tubulin</b>	<p>Monoklonaler Antikörper aus Maus (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa).</p> <p>IZC: 1:20 (3% BSA in PBS II)</p>

#### **3.8.2 Sekundäre Antikörper**

Alle Zweitantikörper wurden von Dianova (Hamburg, Deutschland) gekauft. Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper wurden im Western Blot in einer 1:10000-Verdünnung eingesetzt.

Für die Immunzytochemie und Immunhistochemie wurden Cy2-, Cy3- und Cy5-gekoppelte Zweitantikörper in 1:100-(IZC) und 1:200-(IHC) Verdünnung verwendet.

## **4 Methoden**

### **4.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.1.1 Modifizierung von DNA**

##### **4.1.1.1 Spaltung durch Restriktionsendonukleasen**

(Sambrook et al., 1989). Die DNA wurde in H<sub>2</sub>O mit der zweifachen benötigten Menge des entsprechenden Restriktionsenzym, dem zugehörigen Puffer und BSA gemischt und 2 h bei 37 °C inkubiert.

##### **4.1.1.2 Dephosphorylierung von DNA**

(Shrimp alkaline phosphatase (SAP), Roche). 1 µl (50 ng) DNA, 1 µl SAP und 1 µl 10 x Dephosphorylierungspuffer wurden mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SAP 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

##### **4.1.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten**

(Rapid Ligation Kit, Roche). 10 µl des hitzeinaktivierten Dephosphorylierungsansatzes wurden mit 150 ng Fragment (Vektor- zu Fragmentverhältnis = 1:3), 1 µl T4 Polymerase und 10 x Ligationspuffer mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt und 10 min bei RT inkubiert. Der Ligationsansatz wurde ohne weitere Reinigung direkt für die Transformation verwendet.

##### **4.1.1.4 DNA-Modifikation mittels ortsspezifischer Mutagenese**

Die Deletion eines 98 Bp großen Fragmentes aus Vektor-DNA (pEGFP-C1-Cortactin $\Delta$ SH3) wurde nach dem Herstellerprotokoll des QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kits der Fa. Promega durchgeführt. Die Primerauswahl erfolgte nach den dort angegebenen Kriterien wie folgt: die verwendeten Primer enthielten die Deletion etwa in der

Primermitte. Die Länge der Primer betrug 45 Bp mit einer Schmelztemperatur von 80 °C und höher. Für die PCR wurden 1 µl (25 ng) pEGFP-C1-CortactinΔSH3, 1,25 µl (125 ng) Oligonukleotid 1 (CdelSH3fw) und 1,25 µl (125 ng) Oligonukleotid 2 (CdelSH3rev), 1 µl 25 mM Nukleotide (dNTPs), 5 µl 10 x *Pfu-turbo*-PCR-Puffer (Promega) und 1 µl *Pfu-turbo*-Polymerase (Promega) mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Für die Mutagenese wurden folgende Temperatur- und Zeiteinstellungen programmiert:

1. Start: Denaturierung	94 °C	30 sec
2. Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Anlagerung	60 °C	1 min
4. Synthese	68 °C	6 min (1 min/kb)
5. Kühlung	4 °C	fortlaufend

Die Zahl der Zyklen (Schritt, 2-4) wurde auf 17 eingestellt. Zum Restriktionsverdau der methylierten Vorlage-DNA wurde 1 µl *DpnI* direkt dem PCR-Reaktionsansatz zugegeben und bei 37 °C 1 h inkubiert. Anschließend wurden je 1 µl und 3µl des Reaktionsansatzes in DH5α-Zellen transformiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und 5 ml LB-Kan.-Medium angeimpft. Die Plasmide wurden isoliert und durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

#### **4.1.2 Plasmidisolierung aus E. Coli DH5α**

Für Plasmidisolationen in kleinem Maßstab wurde 5 ml LB-Amp.-Medium (100 µg/ml Ampicillin) oder 5ml LB-Kan.-Medium (25 µg/ml Kanamycin) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C konstant geschüttelt. Aus 2 ml der Kultur wurden die Zellen durch zentrifugieren pelletiert (1 min, 12000 rpm, RT). Die Plasmidisolation erfolgte mit dem GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Bioscience). Die DNA wurde mit 60 µl 10 mM Tris (ph 8) von den Säulen eluiert und abschließend zentrifugiert (12000 rpm, 1 min, RT). Für Plasmidisolationen in großem Maßstab wurden 100 ml LB-Amp.-Medium (100 µg/ml Ampicillin) oder 5 ml LB-Kan.-Medium (25 µg/ml Kanamycin) mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C konstant geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (10 min 6000 x g, RT). Die Plasmidisolation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des

Plasmidisolationskits (Plasmid Maxi Kit, Qiagen). Die DNA wurde in 200 µl 10 mM Tris (pH 8) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach der abschließenden Zentrifugation (1 min 12000 rpm, RT) wurde die Konzentration photometrisch bestimmt.

### **4.1.3 Agarosegelelektrophorese**

Für die qualitative und quantitative Analyse von DNA wurde ein Agarosegel (1 % Agarose in TAE-Puffer) mit DNA, gemischt mit 5 x DNA-Probenpuffer, beladen und bei konstanter Spannung (5 V/cm Gellänge) in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer (BioRad), bedeckt mit TAE-Puffer, aufgetrennt, bis die orange OrangeG-Bande den Rand des Geles erreichte. Für die Größenbestimmung wurde die 1 kb DNA-Leiter (Life Technologies) aufgetragen; für die Konzentrationsbestimmung wurde zusätzlich die SmartLadder (Eurogentec) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zum Färben der aufgetrennten Fragmente 20 min in ein Ethidiumbromidbad gelegt und anschließend fotografiert (E.A.S.Y. Dokumentationssystem, Herolab, Wiesloch, Deutschland).

### **4.1.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen**

Für die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das ethidiumbromidgefärbte Gel mit UV-Licht bestrahlt und die ausgewählte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten.

### **4.1.5 Reinigung von DNA-Fragmenten**

(Gel Extraction Kit, Qiagen). Die Elution des DNA-Fragmentes aus dem Agarosegel erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des Gelextraktionskits. Für die DNA-Isolierung wurde eine Säule für 10 µl Elutionsvolumen verwendet (PCR MinElute Purification Kit, Qiagen). Die DNA wurde mit 10 µl deionisiertem und sterilem H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert und die Konzentration mit einem Molekulargewichtsstandard (SmartLadder, Eurogentec) bestimmt.

### 4.1.6 Transformation von Bakterien

(Sambrook et al., 1989). Zu 100  $\mu$ l E. Coli DH5 $\alpha$  wurden auf Eis 50-100 ng DNA oder 1-5  $\mu$ l Ligationsansatz gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min Hitzeschock bei 42 °C und anschließender zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden 900  $\mu$ l LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37° C langsam geschüttelt. Die Zellen wurden 2 min bei 1000 x g zentrifugiert und der Überstand bis auf 100  $\mu$ l dekantiert. Die Zellen wurden resuspendiert und zu 9/10 und 1/10 auf 37 °C warme LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen plattiert. Die Platten wurden über Nacht (ü. N.) bei 37 °C inkubiert.

### 4.1.7 Reinheitsanalyse und Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte mit einem Spektrometer der Fa. Amersham-Pharmacia. Für die photometrische Messung wurde isolierte DNA 1:50 auf ein Volumen von 50  $\mu$ l mit dem Elutionsmittel verdünnt in eine 50  $\mu$ l Küvette pipettiert. Die Absorption wurde bei 260 nm ( $A_{260}$ ), 280 nm ( $A_{280}$ ) und 320 nm gemessen. Sofern die Absorption bei 260 nm zwischen 0,1 und 0,6 für eine zuverlässige Konzentrationsbestimmung lag, konnte aus dem Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  zwischen 1,8 und 2 auf eine ausreichende Reinheit der Probe geschlossen werden. Für die Konzentrationsbestimmung sehr kleiner Mengen DNA wurde ein Molekulargewichtsstandard verwendet (SmartLadder, Eurogentec, 14 Banden von 0,2 kbp-10 kbp/20-100 ng pro Bande). Dafür wurde eine Agarosegelelektrophorese mit 5  $\mu$ l Marker und 1  $\mu$ l DNA pro Tasche durchgeführt und die Konzentration durch Vergleich der Bandenintensitäten von Molekulargewichtsstandard und Fragment-DNA bestimmt.

### 4.1.8 DNA-Sequenzanalyse

DNA-Sequenzanalysen wurde von der Sequenzierungseinrichtung des ZMNH durchgeführt. Hierfür wurden ca. 600 ng DNA mit 7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O verdünnt und 1  $\mu$ l Primer (10 pM) zugegeben.



### 4.2 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen (BCA-Test)

(Ausubel, 1996). Die Gesamtproteinmenge einer Probe wurde mit einer frisch angesetzten Lösung (BCA-Reagenz B: BCA-Reagenz A im Verhältnis 1:50) des BCA Kits (PIERCE) bestimmt. 200 µl der Lösung wurden mit je 10 µl proteinhaltiger Probe in Mikrotiter-Platten vermischt. Als Konzentrationsstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe von 100 µg/ml-2 mg/ml zeitgleich mit den Proben angesetzt. Die Lösungen wurden bei 37 °C 30 min inkubiert, auf RT abgekühlt und die Extinktion bei 568 nm photometrisch bestimmt.

#### 4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970). Für die Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit dem BCA-Test bestimmt, die Proteine zum Denaturieren mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Für das verwendete Elektrophorese-system (Mini-Protean III, BioRad) wurden je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins vollständig polymerisierte Gele mit einem Acrylamidgehalt von 8-10 % w/v (Trenngel, 4,5 cm Höhe, 1 mm Dicke) bzw. 4-5 % (Sammelgel, 0,8 cm Höhe, 1 mm Dicke, 15-Taschen-Kamm) frisch hergestellt. Die Kammer wurde nach Herstellerangaben aufgebaut und die Taschen mit 20 µl bis 25 µl des denaturierten Proteins, zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (Benchmark™ Proteinleiter, Life Technologies) beladen. Freie Taschen wurden mit SDS-Probenpuffer beladen. Die Protein-Auftrennung erfolgte unter schrittweiser Erhöhung der Spannung von 80 V auf 200 V, bis die Bromphenolblaulinie das Ende des Gels erreichte. Die Gele wurden anschließend im Western Blot eingesetzt.

### **4.2.3 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)**

(Towbin et al., 1979). Für den Transfer von Proteinen aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protran Nitrozellulose BA, 45 µm, Schleicher & Schüll) wurde ein Mini Transblot-Apparat (Biorad) verwendet. Nach 5-minütigem Equilibrieren des SDS-PAGE Gels in Transferpuffer wurde das Blot-Sandwich nach Herstellerangaben aufgebaut. Der elektrophoretische Protein-Transfer wurde bei konstanter Spannung (80 V, 3 h) bei 4 °C in vorgekühltem Transferpuffer durchgeführt. Anschließend wurden die Membranen entpackt und mit TBST gewaschen.

### **4.2.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen**

(Ausubel, 1996). Für den immunologischen Nachweis wurden die gewaschenen Membranen ü. N. bei 4 °C oder 1 h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert, 2 h bei 4 °C oder ü. N. bei 4 °C mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung in MTBST versetzt und 8 x 3 min mit TBST gewaschen. Anschließend wurde der HRP-markierte Sekundärantikörper 1 h bei RT in MTBST zugegeben und durch acht weitere TBST-Waschungen entfernt. Die immunreaktiven Banden wurden mittels verstärkter Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

### **4.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch verstärkte Chemolumineszenz**

Die Membran wurde 3 min lang mit der Chemolumineszenzlösung Super Signal West Dura extended Duration (PIERCE) inkubiert. Nach Entfernen der Chemolumineszenzlösung wurde die Membran in Klarsichtfolie gebettet und die Signale durch Exposition von Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

### **4.2.6 Präparation von Protein aus Zell-Lysat**

#### **4.2.6.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysat**

L929-Fibroblasten wurden in 6 cm-Petrischalen bis zu 70-90 % Konfluenz kultiviert. Die Zell-Lyse erfolgte auf Eis nach 3maligem Waschen mit HBSS. 300 µl L929-Lyse-Puffer wurden direkt auf die Zellen gegeben und 3 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde gesammelt, in flüssigem Stickstoff eingefroren, aufgetaut, 2 x 30 sec bei 4 °C sonifiziert und 5 min auf 95 °C erhitzt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (1 min bei 14000 rpm) und der Überstand bei -20 °C für die Verwendung im Western Blot gelagert.

#### **4.2.6.2 Detergenzlöslicher Anteil des Zell-Lysates**

Zellen wurden in 6 cm-Petrischalen bis zu 70 % Konfluenz kultiviert. Die Zell-Lyse erfolgte auf Eis, nachdem die Zellen mit serum- und antibiotikafreiem Kulturmedium gewaschen wurden. 750 µl RIPA-Puffer wurde zu den Zellen gegeben und unter leichtem Schwenken 1 h bei 4 °C inkubiert. Das Lysat wurde gesammelt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation entfernt (10 min, 12000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde abgetrennt und für den Western Blot mit SDS-Probenpuffer 5 min 95 °C erhitzt oder für die Immunpräzipitation in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **4.2.7 Fraktionierte Präparation von Zellbestandteilen aus Maus-Gehirnhomogenat**

Ein Gesamthirn einer 6 Tage alten Maus (6/JBL) (präpariert von F. Brendel) wurde auf Eis in 5 ml TN-Puffer (ohne Triton X) homogenisiert. Kerne und Zelltrümmer wurden 12 min lang in einer Eppendorfszentrifuge bei 1000 x g, 4 °C abgetrennt (1000 x g-Pellet). Der Zytosol und Membranen enthaltende Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge (Beckmann L-70) 1 h lang bei 100000 x g, 4 °C in die Roh-Membranfraktion (100000 x g-Pellet) und die (im Überstand enthaltenen) zytosolischen Proteine aufgetrennt. Der 100000 x g-Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Detergenzlösliche Proteine wurden

mit TN (1 % Triton X) aus den resuspendierten 1000 x g- und 100000 x g-Pellets unter langsamen Routieren (ü. N., 4 °C) gelöst. Die Triton X-unlöslichen Bestandteile wurden durch erneute Zentrifugation bei 4 °C (Kern- und Zelltrümmerfraktion: 10 min 1000 x g, Roh-Membranfraktion: 1 h 100000 x g) abgetrennt und bei -20 °C gelagert. Die Triton X-löslichen Überstände wurden mit TN bis zu einer Konzentration von 0,5 % (w/v) verdünnt und für die Immunpräzipitation verwendet.

### **4.2.8 Immunpräzipitation**

#### **4.2.8.1 N2A-Zell-Lysat und Gesamthirnhomogenat**

Die Gesamtproteinkonzentration der detergendlöslichen Fraktionen von N2A-Zell-Lysaten oder Gehirnfractionen (1000 x g- und 100000 x g-Fractionen) wurde mit dem BCA-Test bestimmt. 500 µg oder 1000 µg (N2A-Lysat oder Gehirnfraction) wurden je Immunpräzipitation verwendet. Für NCAM-Präzipitationen wurden der D3-Antikörper (siehe 3.8.1) oder Maus-IgG (als Negativkontrolle) und ProteinA/G-gekoppelte Sepharosebeads verwendet. Für L1-Präzipitationen wurde der 555-Antikörper (siehe 3.8.1) oder Ratten-IgG (als Negativkontrolle) und Protein G-gekoppelte Sepharosebeads eingesetzt. Die Sepharosebeads wurden 4 x mit 1 ml Puffer (TBST für N2A-Lysat oder TN für Gehirnfractionen) gewaschen und resuspendiert. Zu den detergendlöslichen Fraktionen wurden bei langsamer Rotation 30 µl (N2A-Lysat) oder 60 µl (Gehirnfraction) Sepharosebeads (3 h bei 4 °C) gegeben und anschließend wieder abgetrennt (5 min, 3000 rpm, 4 °C), um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Anschließend wurde 4 µg (N2A-Lysat) oder 10 µg (Gehirnfraction) primärer Antikörper zugegeben und die Proben ü. N. bei 4 °C rotiert. Die Präzipitation erfolgte durch Zusatz von 30 µl (N2A-Lysat) oder 100 µl (Gehirnfraction) gewaschenen Sepharosebeads (3 h, 4 °C, langsame Rotation). Die Beads wurden abgetrennt (5 min, 3000 rpm, 4 °C) und 3 x mit TBST inkl. Inhibitoren (N2A-Lysat) oder TN (0,5 % Triton X) inkl. Inhibitoren (Gehirnfraction) gewaschen. Die Proteine wurden mit 30 µl 2 x SDS Probenpuffer 5 min bei 95 °C von den Beads eluiert. Der Überstand aus der Immunpräzipitation wurde mit 5 x SDS-Probenpuffer 5 min bei 95 °C erhitzt. Alle Proben wurden im Western Blot untersucht.

### **4.2.8.2 Gesamtzell-Lysat von L929-L1-Fibroblasten und L929-wt-Fibroblasten**

Die Gesamtproteinkonzentration des Gesamtzell-Lysates wurde mit dem BCA-Test bestimmt. 500 µg Gesamtprotein wurden je Immunpräzipitation verwendet. Für die Cortactinpräzipitation wurden der anti-Cortactin-Antikörper 4F11 (siehe 3.8.1) und ProteinA-gekoppelte magnetische Beads (Dynal) verwendet, die mit einer magnetverbundenen Halterung von der Flüssigkeit abgetrennt werden konnten. Die magnetischen Beads wurden 2 x mit 1 ml TBST gewaschen und anschließend in TBST resuspendiert. Das Zell-Lysat wurde 3 h bei RT mit 30 µl Beads von unspezifisch bindenden Proteinen gereinigt. 5 µg Antikörper wurden 30 min bei RT unter langsamer Rotation an 30 µl Beads gekoppelt. Die gekoppelten Beads wurden 3mal mit 1 ml TBST gewaschen und zu dem vorgereinigten Zell-Lysat gegeben. Die Präzipitation wurde ü. N. unter langsamer Rotation bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Beads abgetrennt und 3 x mit 1 ml TBST incl. Inhibitoren (siehe RIPA-Puffer) bei 4 °C gewaschen. Die Proteine wurden mit 40 µl 2 x SDS Probenpuffer 5 min bei 95 °C von den Beads eluiert und die Beads anschließend durch Zentrifugation (10 sec 14000 rpm) abgetrennt. Alle Proben wurden im Western Blot untersucht.

### 4.3 Zellkulturtechniken

#### 4.3.1 Zellkultur von Zell-Linien

##### 4.3.1.1 Kultur von Neuroblastom2A (N2A)-Zellen

N2A-Zellen wurden in 12 ml N2A-Kulturmedium in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen (Nunc) oder in 5 ml N2A-Kulturmedium in 6 cm-Petrischalen (Nunc) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei etwa 60-70 % Konfluenz wurden die Zellen aus den 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen passagiert. Nach dem Entfernen des Mediums wurden die Zellen 1 x mit 10 ml HBSS (37 °C) gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Versen abgelöst und in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (200 x g, 5 min, RT) und das Pellet in 10 ml N2A-Kulturmedium resuspendiert und für die weitere Kultur 1:3 geteilt. Für Antikörperstimulationen wurden 5,7 x 10<sup>4</sup> Zellen in 6 cm-Petrischalen bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Zur Vorbereitung für die Stimulation wurde das Medium zweimal gegen 2 ml serum- und antibiotikafreies N2A-Kulturmedium (37 °C) ausgetauscht und weitere 6 h kultiviert. Für die Immunzytochemie wurden 1,5 x 10<sup>4</sup> Zellen auf PLL-beschichtete Objektträger in 1 ml N2A-Medium pro 2,3 cm-Petrischale ausgesät und 24 h kultiviert. Für Kontrollexperimente wurde das N2A-Medium ü. N. gegen 1 ml OPTIMEM (Life technologies) ausgetauscht.

##### 4.3.1.2 Kultur von L929-L1-Fibroblasten und L929-wt-Fibroblasten

L929-Zellen und stabil mit der neuronalen Isoform von L1 transfizierte L929-L1-Zellen wurden in 12 ml des entsprechenden Zellmediums bis zu einer Konfluenz von 90 % in 75 cm<sup>2</sup>-Flaschen (Nunc) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für die weitere Kultivierung wurden die Zellen mit 2 ml Versen abgelöst, in 10 ml L929-Kulturmedium resuspendiert und 1:5 aufgeteilt. Für die Immunzytochemie wurden 10<sup>5</sup> Zellen auf PLL-beschichtete Deckgläser in 2 ml L929- bzw. L929-L1-Kulturmedium gesät und ü. N. kultiviert. Zum Vorbereiten der transienten Transfektion wurde 1 ml L929-Zellsuspension pro 6 cm-Petrischale in 5 ml antibiotikafreiem L929-Kulturmedium ausgesät und ü. N. bis zu einer Zelldichte von 90 % kultiviert. Für die L1-Stimulation

wurden  $1,8 \times 10^4$  Zellen in 6 cm-Petrischalen in 5 ml L929-Kulturmedium ausgesät. Nach 3 h waren die Zellen adhäriert, und das Kulturmedium wurde zweimal gegen 5 ml Stimulationsmedium (DMEM incl. 0,5 % FCS und 2 mM L-Glutamin) ausgetauscht. Danach wurden die Zellen weitere 48 h kultiviert.

### **4.3.1.3 Transiente Transfektion von L929-Zellen**

(Lipofectamin Plus Anleitung, Life Technologies). Für die transiente Transfektion von L929-Zellen wurde der Lipofectamin Plus Kit (Life Technologies) verwendet. Das Kulturmedium der antibiotikafrei kultivierten Zellen wurde zweimal gegen 2 ml serum- und antibiotikafreies Kulturmedium ausgetauscht. Für eine Transfektion wurde 6 µg DNA (EGFP-Fusionsprotein-cDNA oder EGFP-C1), 12 µl PLUS und 18 µl Lipofectamin nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach 3 h wurde das Transfektionsmedium auf die Kulturmediumzusammensetzung aufgefüllt. Die Zellen wurden weitere 24 h kultiviert und die Proteinexpression der lebenden Zellen fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. Für die Überprüfung im Western Blot wurde das Gesamtzell-Lysat verwendet.

### **4.4 Immunzytochemische Methoden**

#### **4.4.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläsern**

11 mm-Deckgläser wurden für 30 min mit HCl (12 %) gereinigt. Anschließend wurden die Deckgläser 2 x 10 min mit sterilem Wasser und 2 x 15 min mit Ethanol (100 %) gewaschen. Die Deckgläser wurden einzeln auf Alufolie ausgelegt und bei 180 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen auf RT wurden die Objektträger ü. N. bei 4 °C mit einer 0,025 %igen Poly-L-Lysin (PLL)-Lösung unter leichtem Schwenken beschichtet. Anschließend wurde überschüssiges PLL 3 x 5 min mit sterilem Wasser entfernt. Die Objektträger wurden einzeln auf Alufolie ausgelegt und unter der Reinraumbank 2 h lang getrocknet. Die Lagerung erfolgte steril bei 4 °C. Vor Gebrauch wurden die beschichteten Objektträger 15 min unter UV-Licht sterilisiert.

#### **4.4.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen**

##### **4.4.2.1 Hippocampusneuronen**

Dissoziierte Hippocampusneuronen wurden von G. Dityateva aus den Hippocampi 1 bis 3 Tage alter Mäuse präpariert (Brewer et al., 1993, Lochter et al., 1991). Die Neuronen wurden mit einer Dichte von  $10^3$  Zellen/mm<sup>2</sup> auf PLL-Beschichtung ausgesät und 2 Tage kultiviert. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde das Kulturmedium vorsichtig entfernt und anti-L1-Antikörper 555 (siehe 3.8.1), verdünnt in 150 µl Kulturmedium (37 °C), zugegeben. Die lebenden Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit 10 min inkubiert und das Medium anschließend vorsichtig entfernt. Die Zellen wurden 4 x mit 150 µl Kulturmedium (37 °C) gewaschen und mit 150 µl Sekundärantikörper (Cy5 anti-Ratte), verdünnt in Kulturmedium (37 °C), weitere 15 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung und bei RT durchgeführt. Das Medium wurde abpipettiert und 4 x mit 150 µl Kulturmedium gewaschen. Die Zellen wurden 15 min bei RT mit Fixierlösung inkubiert, die anschließend



durch 4 Waschschritte (5 min, 3 ml PBS II) gründlich entfernt wurde. Mit BSA-haltiger Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X) wurde 15 min blockiert und permeabilisiert, bevor 30 µl Cortactin-Antikörper 4F11 oder als Kontrolle  $\beta$ -Catenin- oder Tubulin-Antikörper (siehe 3.8.1), verdünnt in Blockierungspuffer, auf die Zellen gegeben wurde. Nach 60 min wurde der Antikörper entfernt und die Zellen 3 x 5 min mit PBS II gewaschen. Der entsprechende Sekundärantikörper wurde (in geeigneter Verdünnung) aufgetragen, nach 45 min abgenommen und durch vier fünfminütige Waschschritte entfernt. Nach 5 min Nachfixierung (2 % Paraformaldehyd (PA) in PBS II) und einem weiteren 5-minütigen Waschschrift mit PBS II wurden die Zellen mit Aqua-Poly/Mount (Polyscience) eingebettet und bei 4 °C gelagert. Die Untersuchung der Präparate erfolgte an einem Laser-Scanning-Mikroskop der Fa. Leica mit Hilfe der Zeiss LSM Image Browser Software. Für die Koimmunfluoreszenzfärbung an Hippocampusneuronen wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

### **4.4.2.2 L929- und L929-L1-Fibroblasten**

L929- und L929-L1 Zellen wurden auf PLL-beschichteten Objektträgern kultiviert. Die Objektträger wurden auf Parafilm gelegt und mit Primärantikörper pab  $\alpha$ -L1 (3.8.1) in L929-Kulturmedium (37 °C) 10 min, 1 h oder, 2 h bei konstanter Luftfeuchtigkeit bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Der anti-L1-Antikörper wurde entfernt und die Zellen 1 x 1 min und 3 x sehr kurz mit Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 15 min mit Fixierlösung behandelt und 4 x 5 min mit PBS II gewaschen. Die Zellen wurden 10 min mit Blockierungslösung inkubiert, bevor der Sekundärantikörper Cy2-anti-Kaninchen (zum Markieren und Sättigen extrazellulärer Bindungsstellen) 30 min lang aufgetragen wurde. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden unter Ausschluss direkter Lichteinstrahlung durchgeführt. Es wurde 4 x 5 min mit PBS II gewaschen, 5 min mit, 2 % PA in PBS II fixiert, 3 x 5 min mit PBS II gewaschen und mit Permeabilisierungslösung (0,2 % Triton X) 15 min lang inkubiert. Der in Blockierungslösung verdünnte anti-Cortactin-Antikörper 4F11 (3.8.1) wurde 1 h lang aufgetragen, durch 4 x 5 min waschen entfernt und das Präparat anschließend mit einer Mischung der Sekundärantikörper Cy3-anti-Maus und Cy5-anti-Kaninchen in Blockierungslösung 30 min lang inkubiert. Nach 5 min Nachfixierung mit 2 % PA in PBS

II und 1 x 5 min waschen mit PBS II wurden die Präparate mit Aqua-Poly/Mount Medium (Polyscience) eingedeckelt und bei 4 °C gelagert.

### **4.4.2.3 Neuroblastom2A Zellen (N2A)**

Die Koimmunfluoreszenzfärbung an N2A-Zellen wurde mit derselben Methode durchgeführt, die für L929- und L929-L1-Zellen beschrieben wurde. Als Kontrolle wurde die Färbung an OPTIMEM-kultivierten N2A-Zellen durchgeführt. Dafür wurde der primäre Antikörper anti-L1 (3.8.1) in 37 °C warmen OPTIMEM verdünnt.

### **4.4.3 Antikörperstimulation von N2A-Zellen**

Für die Stimulation von N2A-Zellen wurden die Zellen, wie in 4.3.1.1 beschrieben, vorbereitet. Die Zellen wurden mit anti-L1-Antikörper, anti-NCAM-Antikörper (2B2) (3.8.1) oder PBS (als Kontrolle) 10 min, 1 h oder 2h lang bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit stimuliert (200 µg polyklonaler Antikörper je ml Medium ohne Serum und Antibiotika). Für die Stimulation wurden die Zellen auf Styropor gestellt, das Kulturmedium vorsichtig entfernt und 2 ml Stimulationsmedium (37 °C) zugegeben. Die Stimulation wurde auf Eis gestoppt, das Stimulationsmedium entfernt und die Zellen 1 x mit serum- und antibiotikafreiem Medium (4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 750 µl RIPA-Puffer (4 °C) 1 h lang auf Eis bei 4 °C lysiert und der detergenslösliche Anteil des Zell-Lysates für die Proteinbestimmung, den Western Blot und die Koimmunpräzipitation präpariert.

### **4.4.4 L1-Stimulation von L929-L1-Fibroblasten und L929-wt-Fibroblasten**

Für die Antikörperstimulation wurden die Zellen, wie in 4.3.1.2 beschrieben, vorbereitet. Das Stimulationsmedium wurde gegen 2 ml Stimulationsmedium incl. 200 µg anti-L1-Antikörper/ml Medium ausgetauscht und die Zellen 10 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und das Gesamtzell-Lysat hergestellt.

### **4.4.5 Neuritenwachstum und Neuritogenese von Hippocampusneuronen**

Alle Präparationen von Hippocampusneuronen wurden von G. Dityateva und Dr. A. Dityatev angefertigt und in Fixierlösung zur Verfügung gestellt. Hierzu wurden dissoziierte Hippocampusneuronen aus den Gehirnen 1 bis 3 Tage alter Mäuse präpariert und mit 1,5 µg DNA/100 µl Elektroporationslösung (Nucleofector, AMAXA) elektroporiert. Die transfizierten Neuronen wurden auf PLL/Substrat-beschichteten „chamberslides“ (Nunc) ausgesät. Als Substratbeschichtung wurden die Fusionsproteine L1-Fc und NCAM-Fc verwendet, als Negativkontrolle PLL und als Positivkontrolle Laminin. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen und in Fixierlösung inkubiert. Die Fixierlösung wurde abpipettiert und die Kammern sowie der Kammerklebstoff von den Objektträgern entfernt. Die Präparate wurden 2 x mit PBS II gewaschen und mit Polymount (Polyscience) eingebettet. Die Untersuchung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss) und die Präparate wurden über die angeschlossene Digitalkamera und das zugehörige Computerprogramm (Zeiss) fotografiert.

Für die Analyse des Neuritenwachstums wurden jeweils die Neuriten einer transfizierten Zelle mit einer Länge größer als der Zelldurchmesser, die keinen Neuritenkontakt hatten, gemessen. Ein Experiment mit einer Transfektionseffizienz von ca. 30 % wurde ausgewertet. Die Gesamtneuritenlänge wurde aus den mittleren Gesamtneuritenlängen von 2-3 Wells (16-40 Zellen pro Well) ermittelt. Für die Quantifizierung der Neuritogenese und der Neuritenzahl wurden alle transfizierten Zellen ausgewertet. Nicht ausgewertet wurden jedoch Zellen, die Zellkörperkontakt mit Nachbarzellen hatten, die größer als der Zelldurchmesser waren oder ein Neuritenkontakt durch einen Neuriten bestand, dessen Länge den Zelldurchmesser nicht überschritt. Für die Quantifizierung der Neuritogenese oder der Neuritenzahl wurden zwei Experimente mit einer Transfektionseffizienz von 30 % und ca. 5-10 % analysiert. Pro Beschichtung wurden 50-200 Zellen ausgewertet. Die Prozentzahl der Zellen mit Neuriten oder die Neuritenzahl einer Zelle wurde aus den Mittelwerten von 7-8 Wells ermittelt.

### 4.5 Immunhistochemie

25 µm dicke Kryoschnitte von 4 % PA-fixierten Gesamthirnen 5 Tage alter Mäuse (P 5) (freundlicherweise präpariert von Dr. G. Loers) und adulter Mäuse (C57BL6/J) (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Irintchev) wurden 30 min bei 37 °C getrocknet, anschließend 30 min in Natriumcitrat bei 80 °C von unspezifischen Antigenen gereinigt und danach 15 min mit PBS II gewaschen. Nach 1 h NZS- (normales Ziegenserum) Blockierung wurden die Schnitte 48 h bei 4 °C mit affinitätsgereinigtem anti-L1-Antikörper und anti-Cortactin-Antikörper (3.8.1) inkubiert, 3 x mit PBS II gewaschen und 2 h mit den entsprechenden Sekundärantikörpern behandelt. Nach drei PBS II-Waschungen wurden die Zellkerne 15 min mit Bisbenzimid gefärbt, mit PBS II gewaschen und in Einbettmedium eingebettet. Die Fluoreszenz wurde mit einer Digitalkamera an einem Mikroskop (Axiophot, Zeiss), ausgestattet mit den entsprechenden Filtern, bei verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen.

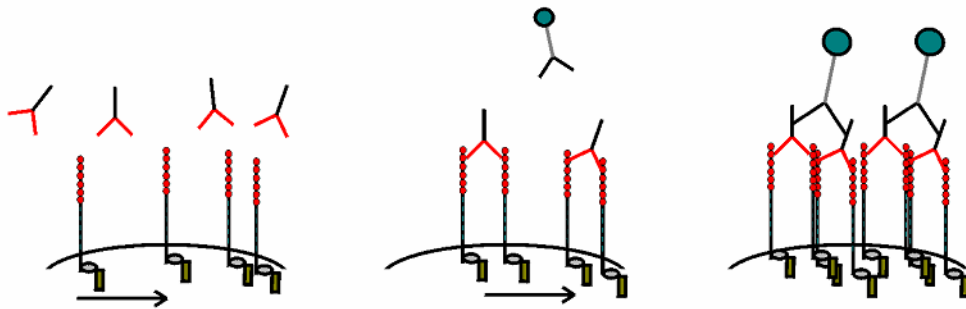
## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Untersuchung der Lokalisation von L1 und Cortactin**

Um Informationen über eine direkte oder indirekte Interaktion von L1 und Cortactin zu erhalten, wurden verschiedene Experimente zur L1-abhängigen subzellulären Verteilung von Cortactin und L1 durchgeführt, eine entwicklungsabhängige Veränderung der Expressionsprofile beider Proteine untersucht und die Kolo­kalisierung beider Proteine überprüft.

#### **5.1.1 Doppelimmunfluoreszenzfärbungen an Primärkulturen von Hippocampusneuronen**

Um einen Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen L1 und Cortactin zu erhalten, wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung (4.4.2.1) an kultivierten Hippocampusneuronen (2 DIV) durchgeführt. Für dieses sog. Cocappingexperiment wurden lebende Hippocampusneuronen mit L1-Antikörper und fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Durch die Antikörperverknüpfung der extrazellulären Domänen wird das zuvor homogen in der Plasmamembran verteilte Transmembranmolekül L1 in sog. Clustern konzentriert (Abb. 5). Proteine, die mit der intrazellulären Domäne von L1 interagieren, folgen dieser Umverteilung und kolo­kalisieren mit L1 in den Clustern. Dort lassen sich diese intrazellulären Bindungspartner durch Immunfluoreszenz nachweisen.



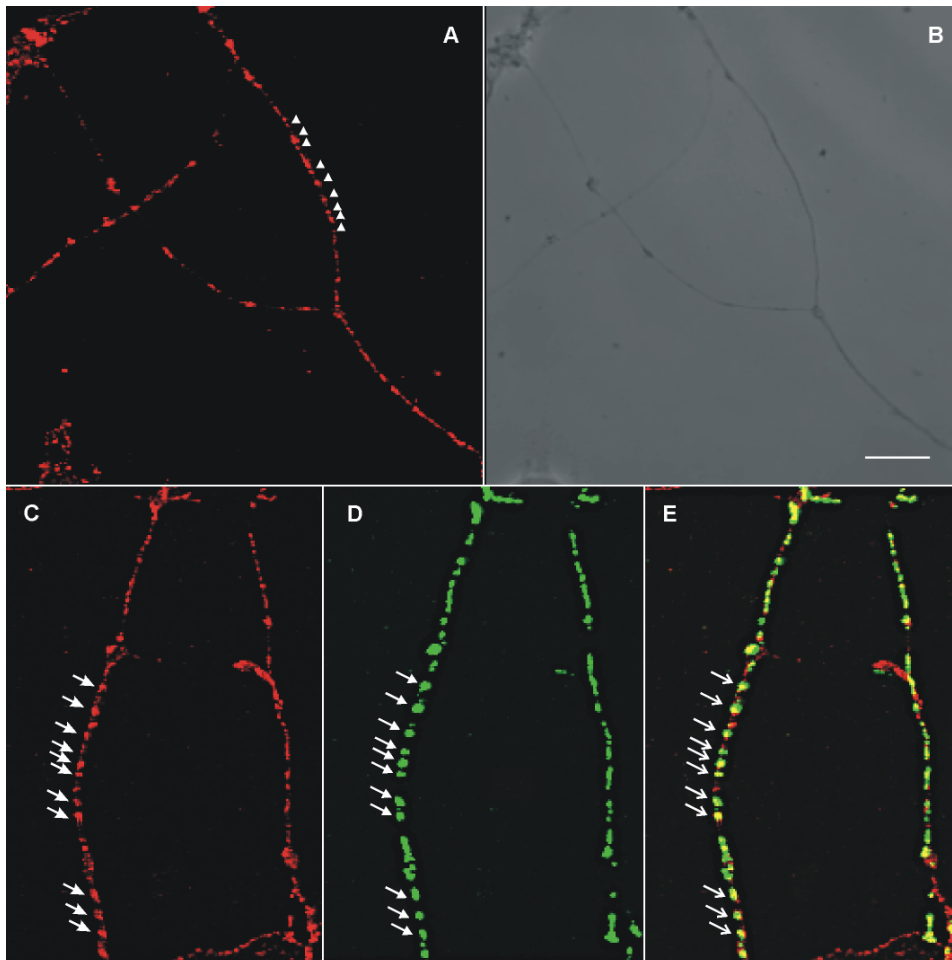
**Abb. 5: Schematische Darstellung des Cocappingexperimentes.**

Die extrazellulären Domänen des homogen in der Zellmembran verteilten Transmembranmoleküls werden durch den Erstantikörper verknüpft. Dadurch wird das Transmembranmolekül in der Zellmembran umverteilt und in sog. Clustern angereichert. Die Zugabe von fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Sekundärantikörper verstärkt diesen Effekt. Proteine, die an die intrazelluläre Domäne des Transmembranmoleküls binden, folgen dieser Umverteilung, so dass es zu einer Kolokalisation der Bindungspartner in den Clustern kommt.

In Abb. 6 sind repräsentative Aufnahmen von L1- und Cortactin-doppelimmunfluoreszenzfärbungen dargestellt. Die Inkubation von lebenden Hippocampusneuronen mit L1-Antikörper und fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Zweitantikörper führte zu einer perlenschnurartigen Anhäufung von L1 in Clustern entlang der Neuriten (Abb. 6, D). Auch Cortactin zeigt hierbei Akkumulationen entlang der Neuriten. Etwa 70 % der L1-Cluster überlagerten mit den cortactinhaltigen Bereichen (Abb. 9). Auch in den Wachstumskegeln der Hippocampusneuronen wurde Cortactin nachgewiesen (Abb. 7, A). Eine Kolokalisation von L1 und Cortactin konnte nicht überprüft werden, da L1 in den Wachstumskegeln bei der verwendeten Färbetechnik nicht nachweisbar war. Auffällig ist jedoch eine starke Akkumulation und Kolokalisation von L1 und Cortactin im „Nacken“ der Wachstumskegel.

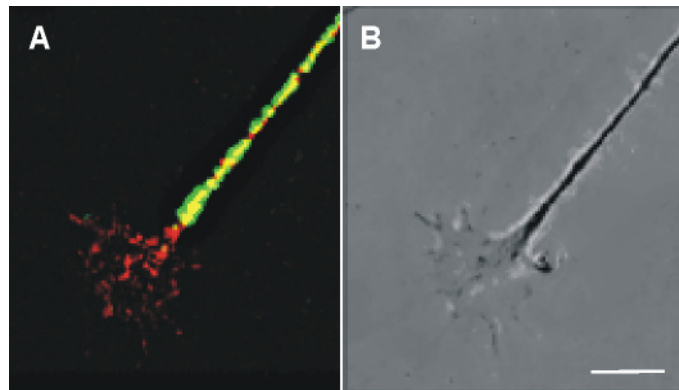
Als Kontrolle wurde eine Fluoreszenzfärbung mit Cortactin-Antikörper ohne Zugabe des L1-Antikörpers durchgeführt. In dieser Kontrolle war Cortactin sehr inhomogen entlang der Neuriten verteilt. Oft waren clusterartige Anhäufungen zu beobachten, wie in Abb. 6, A dargestellt. Das Cocappingexperiment würde jedoch nur dann auf eine mögliche direkte

Interaktion von L1 und Cortactin hindeuten, wenn sich die Cortactinverteilung infolge des L1-Clusterings änderte.



**Abb. 6: Cortactinimmunfluoreszenzfärbung und L1- und Cortactindoppelfärbungen an Hippocampusneuronen.**

An zwei Tage kultivierten Hippocampusneuronen wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit L1 (grün) und Cortactin (rot) durchgeführt (C-E). Als Kontrolle diente eine Cortactinimmunfärbung ohne gleichzeitige L1-Färbung (A). Cortactin lag in der Einfachfärbung in inhomogener, clusterähnlicher Verteilung entlang der Neuriten vor (Pfeilspitzen in A). In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung war L1 entlang der Neuriten in sog. Clustern in perlenschnurartiger Weise akkumuliert (Pfeile in D). Auch Cortactin war in clusterähnlicher Verteilung entlang der Neuriten akkumuliert (Pfeile in C). Die L1-Cluster überlagerten mit den cortactinhaltigen Bereichen (Pfeile in E). B: Differentielle Interferenzkontrastaufnahme zu A. (Skalierung: 8  $\mu\text{m}$ ).



**Abb. 7: Expression von Cortactin in den Wachstumskegeln von Hippocampusneuronen.**

Cortactin (rot) und L1 (grün). Cortactin wird in den Wachstumskegeln von 2 Tage kultivierten Hippocampusneuronen exprimiert (A). Auffällig ist die Akkumulation und Kolokalisation von L1 und Cortactin im „Nacken“ des Wachstumskegels (A). B: Differentielle Interferenzkontrastaufnahme zu A. (Skalierung: 8  $\mu\text{m}$ ).

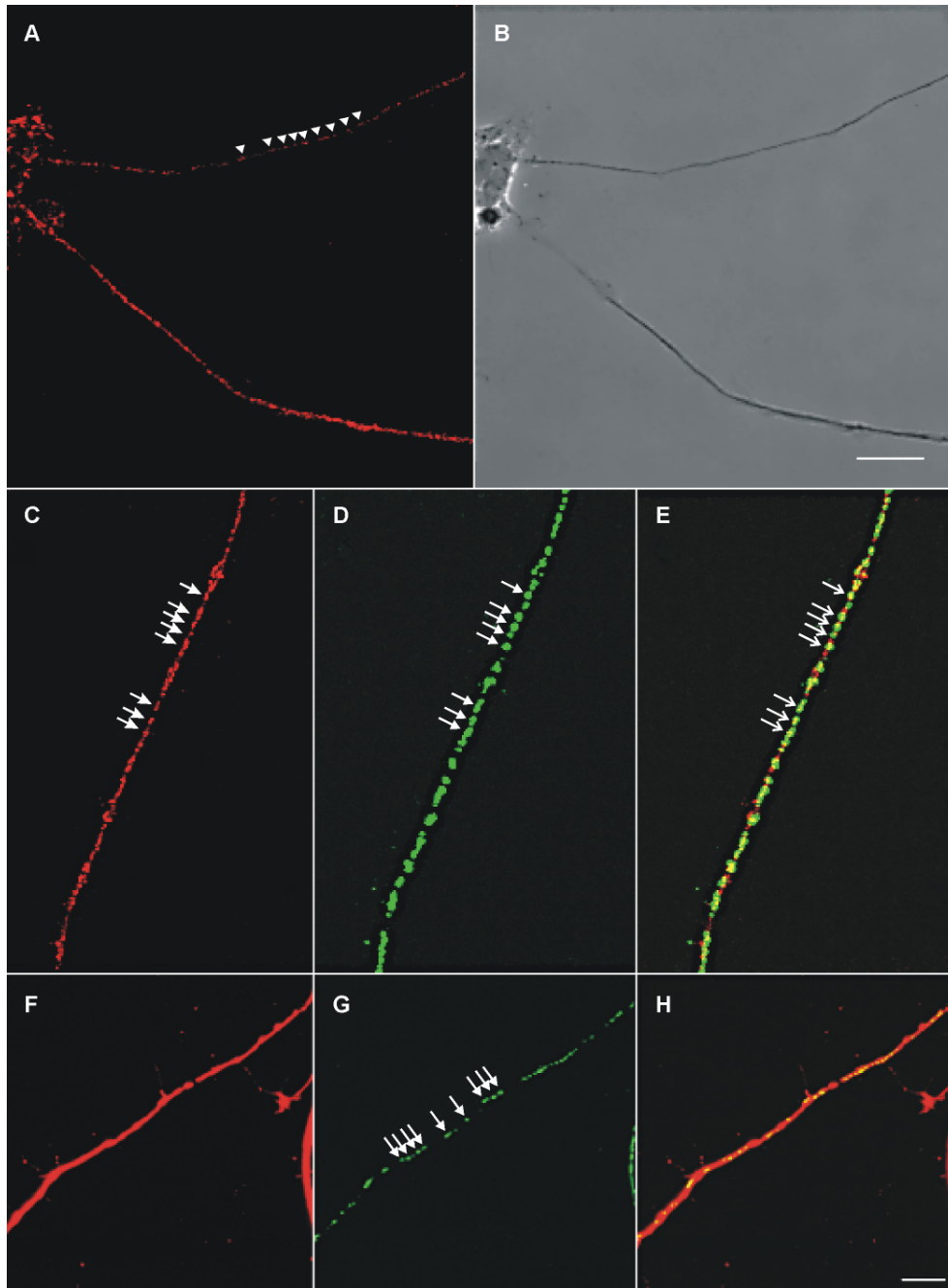
Um zu untersuchen, ob die Kolokalisation von L1 und Cortactin in den L1-haltigen Regionen eine Folge des L1-Clusterings war oder durch zufällige Überlagerungen der eng beieinander liegenden L1- und cortactinhaltigen Regionen verursacht wurde, wurden zwei weitere Kontrollen verwendet.

Zum einen wurde eine Immunfärbung gegen  $\beta$ -Tubulin durchgeführt. In der Fluoreszenzeinfachfärbung war das Zytoskelettprotein Tubulin homogen über die Neuriten verteilt. In der Koimmunfluoreszenzfärbung hatte die Umverteilung von L1 in L1-haltige Regionen keinen Einfluss auf die Tubulinverteilung (Abb. 8, F-H). Eine besser geeignete Kontrolle als der Antikörper gegen das wegen des Einbaus in Mikrotubuli zum Teil nicht mobile Tubulin war der zum anderen verwendete Antikörper gegen  $\beta$ -Catenin.  $\beta$ -Catenin bindet intrazellulär an das Transmembranmolekül N-Cadherin. Da bislang keine L1-Cadherin- oder L1-Catenin-Interaktionen bekannt sind, sollte die  $\beta$ -Cateninverteilung deshalb von einer L1-Umverteilung nicht beeinflusst werden.

In der Fluoreszenzeinfachfärbung zeigte die Verteilung von  $\beta$ -Catenin eine inhomogene Verteilung entlang der Neuriten, die, ebenso wie die Cortactinfärbung (Abb. 6, A), oft ein



clusterartiges Erscheinungsbild aufwies (Abb. 8, A). In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung überlagerten etwa 70 % der L1-Cluster mit  $\beta$ -cateninhaltigen Regionen (Abb. 9).



**Abb. 8: Doppelimmunfluoreszenzfärbung an primär kultivierten Hippocampusneuronen (2 DIV).**

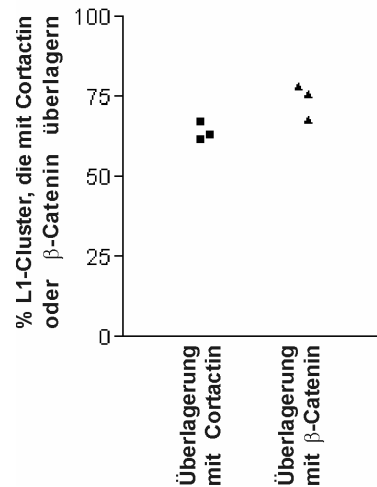
An zwei Tage kultivierten Hippocampusneuronen wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit L1 (grün) und  $\beta$ -Catenin (rot) durchgeführt (C-E). Als Kontrolle diente eine Immunfärbung für  $\beta$ -Catenin (A).

## 5. ERGEBNISSE

---

Als weitere Kontrolle wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen L1 (grün) und das Zytoskelettprotein Tubulin (rot) angefertigt (Abb. F-H). Catenin liegt (wie Cortactin in Abb. 6, A) in der Einfachfärbung in inhomogener, clusterähnlicher Verteilung entlang der Neuriten vor (Pfeilspitzen in A). In der Koimmunfluoreszenzfärbung ist L1 in perlenschnurartiger Weise entlang der Neuriten akkumuliert (Pfeile in D). Auch Catenin ist in clusterähnlicher Verteilung entlang der Neuriten angeordnet (Pfeile in C). Die L1-Cluster überlagern mit den cateninhaltenen Bereichen (Pfeile in E). B: Differentielle Interferenzkontrastaufnahme zu A. (Skalierung: 8  $\mu\text{m}$ ).

Um zu überprüfen, ob sich der prozentuale Anteil der Kolo-kalisation von L1-Clustern mit cortactinhaltigen Regionen von der Cateninkontrolle unterschied, wurde die Zahl der L1-Cluster gezählt, die mit cortactin- oder cateninhaltenen Regionen überlagerten (Abb. 9). Als „überlagernd“ wurde jeder L1-Cluster gezählt, der eine teilweise oder vollständige Überlagerung mit der Cortactin- bzw. Cateninfärbung zeigte. Während die L1-Cluster meist eine einheitliche Größe und Färbungsintensität aufwiesen, waren die cortactin- oder cateninhaltenen Regionen meist sehr viel kleiner und von unregelmäßiger Struktur und variierender Färbungsintensität. Beim Zählen der Überlagerungen wurde der Grad der Überlappung eines L1-Clusters mit der cortactin- oder cateninhaltenen Region und die Intensität der Überlagerung nicht bewertet.



**Abb. 9: Anteil von L1-Clustern, die in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit cortactin- oder cateninhaltigen Bereichen überlagern, an der Gesamtzahl der L1-Cluster.**

Die L1-Cluster, die in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit cortactinhaltigen Regionen überlagerten, wurden in drei unabhängigen Experimenten gezählt. Als Kontrolle wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit L1 und  $\beta$ -Catenin durchgeführt. Für das Auszählen an Überlagerungen von L1-Clustern mit cortactin- oder cateninhaltigen Bereichen wurde ein Cluster als ein abgeschlossenes, L1-immunopositives Areal definiert. Während die L1-Cluster meist eine einheitliche Größe und Färbungsintensität aufwiesen, waren die Cortactin- und Cateninregionen sehr viel kleiner und von unregelmäßiger Struktur und Färbungsintensität. Als Überlagerung wurde jeder L1-Cluster gezählt, der eine teilweise oder vollständige Überlagerung mit der Cortactin- bzw. Cateninfärbung zeigte. Der prozentuale Anteil an Überlappung eines L1-Clusters mit cortactin- oder cateninhaltigen Bereichen oder die Intensitäten der Überlagerung wurden nicht bewertet. Die Zahl der L1-Cluster, die mit cortactinhaltigen Regionen überlagerten, unterschied sich nicht von der Zahl der L1-Cluster, die in einem Kontrollexperiment mit  $\beta$ -cateninhaltigen Regionen überlagerten.

Da die Cortactinimmunfärbung ohne L1-Capping bereits eine clusterähnliche, inhomogene Cortactinverteilung aufwies, konnte nicht bewertet werden, ob die Überlagerungen von L1 mit Cortactin in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung eine Folge des L1-Clustering waren. Eine geeignete Negativkontrolle stand nicht zur Verfügung, da dieser Effekt auch bei der  $\beta$ -Cateninkontrolle auftrat. Zudem unterschieden sich die Prozentzahlen von L1-Clustern, die in der Koimmunfluoreszenzfärbung mit cortactinhaltigen Regionen überlagerten, nicht von denen des  $\beta$ -Cateninkontrollexperimentes. Wegen dieser methodischen Schwierigkeiten konnte das Cocappingexperiment nicht verwendet werden,

um eine Aussage über eine mögliche direkte Interaktion zwischen L1 und Cortactin zu treffen.

Als Ergebnis kann zusammengefasst werden, dass L1-Cluster in der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zu etwa 70 % mit cortactinhaltigen oder  $\beta$ -catenin-haltigen Bereichen kolokalisiert sind. Außerdem ist Cortactin in den Wachstumskegeln von 2 Tage kultivierten Hippocampusneuronen lokalisiert.

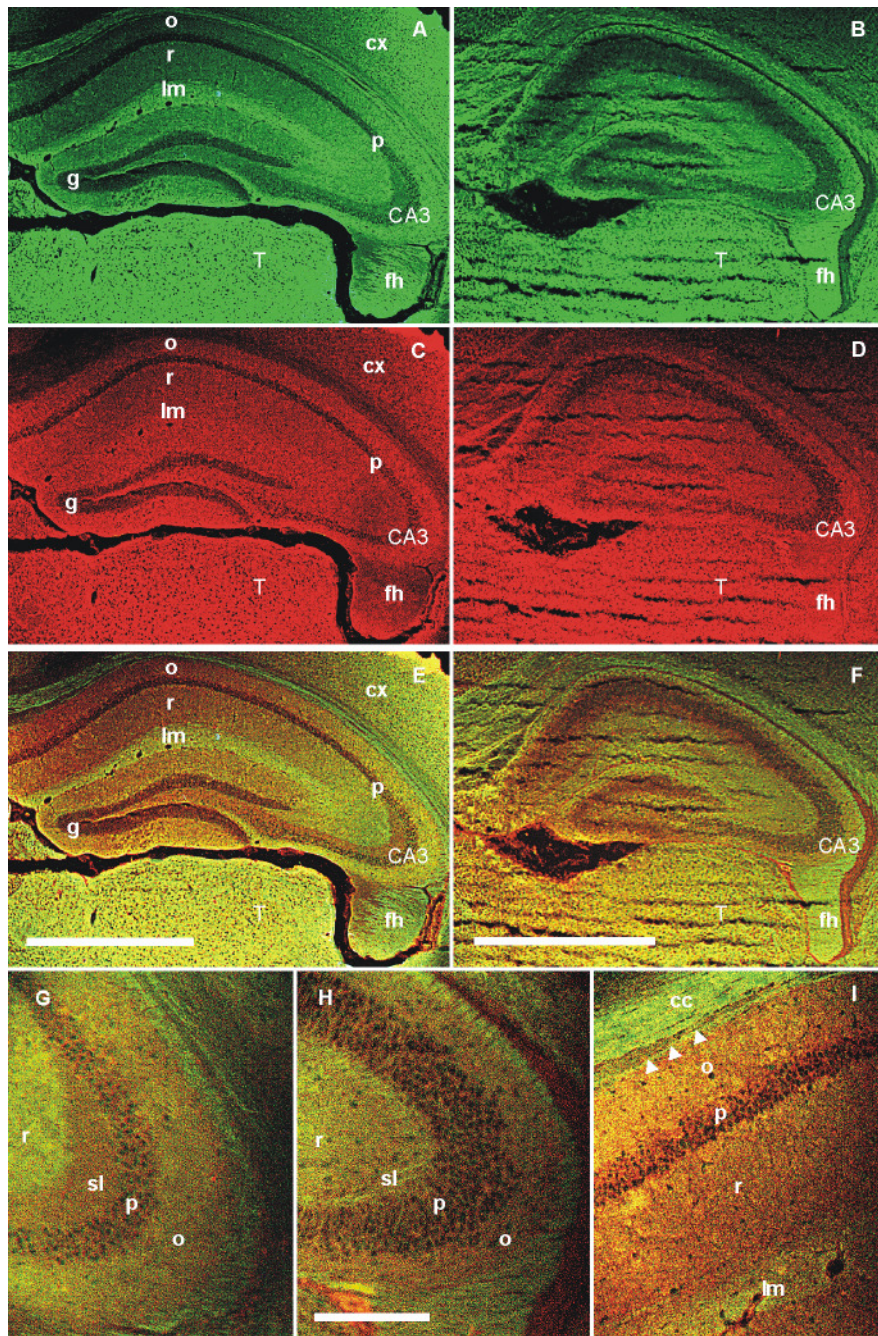
### **5.1.2 Lokalisation von CAM-L1 und Cortactin im Hippocampus von P 5 Maus und adulter Maus**

Es wurde bereits gezeigt, dass die Primärkulturen von Hippocampusneuronen L1- und Cortactin-positiv waren und dass Cortactin in den Wachstumskegeln dieser Primärkulturen deutlich angereichert war (siehe 5.1.1). Die Neuriten 2 Tage lang kultivierter Hippocampusneuronen sind jedoch noch nicht in Axone und Dendriten ausdifferenziert. Um die Verteilung und Lokalisation beider Proteine genauer zu untersuchen, wurden die Expressionsprofile von L1 und Cortactin in 25  $\mu$ m dünnen Kryoschnitten von Hippocampi 5 Tage alter (P 5-) und adulter C57BL6/J-Mäuse immunhistochemisch auf Cortactin und L1 untersucht (Abb. 10). Da sich das ZNS von P 5-Tieren noch in der Entwicklung befindet, während die Zellen im adulten Tier vollständig ausdifferenziert sind, kann ein Unterschied in der entwicklungsabhängigen Verteilung beider Proteine möglicherweise Hinweise auf die Funktion oder Wechselwirkung beider Proteine vermitteln. L1 und Cortactin sind im 5 Tage alten und adulten Hippocampus inhomogen verteilt. In der adulten Maus ist L1 in den axonreichen, dendritenfreien Arealen des Hippocampus (alveus, fimbria hippocampi) und des Großhirns, wie etwa corpus callosum, akkumuliert. L1 wird in axon- und dendritenreichen Regionen von CA1 (stratum radiatum und oriens) und im stratum lucidum von CA3 nur schwach exprimiert. Das stratum lacunosum-moleculare und stratum oriens und stratum radiatum in der CA3-Region sind stark L1-positiv (Abb. 10, A). Cortactin wird im Hippocampus in den gleichen Schichten wie L1 exprimiert, aber die Intensitätsverteilung ist eine andere: die strata radiatum und oriens sind stark Cortactin-positiv, das stratum lacunosum-moleculare und der alveus sind dagegen Cortactin-negativ. In der CA3-Region sind die Moosfasern im stratum lucidum Cortactin-positiv und nahezu L1-negativ (Abb. 10, A, C, E, G). Darüber hinaus enthalten

die Somata der Körnerzellen des Gyrus dentatus und die Somata der Pyramidenzellschicht Cortactin, aber nicht L1 (Abb. 10, E). Cortactin und L1 werden im stratum oriens von CA3 und in der Fimbria mit jeweils getrennten Intensitätsmaxima exprimiert (Abb. 10, E). L1 und Cortactin kolokalisieren in nahezu allen Schichten des Hippocampus sehr schwach, die deutlichste Kolokalisation ist im stratum oriens zu sehen (Abb. 10, E, I). Eine ausgeprägte Gleichverteilung beider Proteine wird hingegen im angrenzenden Thalamus (Abb. 10, E) beobachtet.

Im Hippocampus der P 5-Maus befinden sich die Zellschichten noch in der Entwicklung. Wie auch im adulten Hippocampus werden Cortactin und L1 in allen Regionen des P 5-Hippocampus mit verschiedenen Intensitäten exprimiert (Abb. 10, B, D, F, H). Die Expressionsprofile in früh postnatalem und adultem Hippocampus unterscheiden sich jedoch deutlich, besonders auffällig in der CA3-Region (Abb. 10, F, G, H). In den P 5-Mäusen ist das stratum oriens von CA3 Cortactin-positiv und nahezu L1-negativ, das stratum lucidum dagegen Cortactin-negativ und L1-positiv. Auch das stratum radiatum von CA3 enthält Cortactin. Die Fimbria enthält ausschließlich L1, und die Somata der Pyramidenzellen enthalten Cortactin. Die Zellschichten von CA1 und der Gyrus dentatus sind in der P 5-Maus noch nicht vollständig ausgebildet (im Vergleich Abb. 10, E, F). Auffällig ist die räumliche Abgrenzung der L1-Expression von der Cortactinexpression in der CA1-Region. Während im adulten Hippocampus eine schwache Kolokalisation beider Proteine im stratum oriens von CA1 und CA3 vorliegt (Abb. 10, E, G, I) ist im P 5-Hippocampus keine Kolokalisation beider Proteine zu sehen (Abb. 10, F, H).

Die Expressionsprofile von L1 und Cortactin ändern sich während der Entwicklung. Davon sind sowohl axon- als auch dendritenreichen Bereiche betroffen. Die verschiedenen Zellschichten enthalten, abhängig von der Region, überwiegend L1 oder Cortactin. Eine Kolokalisation beider Proteine liegt, unabhängig vom jeweiligen Expressionsprofil, nur schwach ausgeprägt oder gar nicht vor.



**Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis von L1- und Cortactin in Hippocampi 5 Tage alter und adulter wt-Mäuse.**

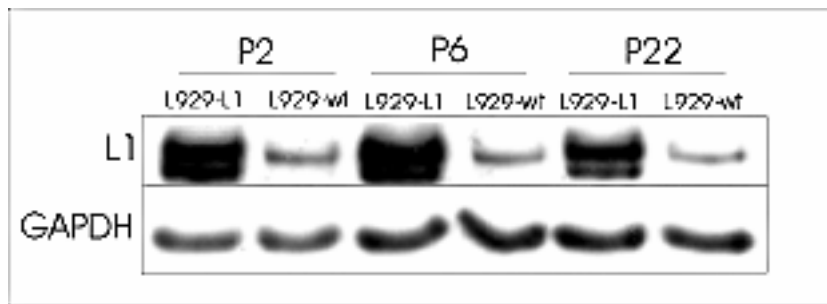
In der adulten Maus (A, C, E, G, I) wird L1 (grün) überwiegend in axonreichen Strukturen exprimiert (stratum oriens, radiatum, lacunosum-moleculare, alveus und fimbria hippocampi) und Cortactin (rot) überwiegend in dendritenreichen Regionen. Die axonhaltigen, dendritenfreien Regionen wie fimbria hippocampi und alveus enthalten kein Cortactin (C, E, I). Eine Ausnahme bilden die axonhaltigen Moosfasern des stratum lucidum in CA3, die stark Cortactin-immunreaktiv sind (C, E, G). Die Expressionsprofile von L1 und Cortactin unterscheiden sich im P 5-Hippocampus (B, D, F, H) deutlich von

denen der adulten Maus, besonders in der CA3-Region (H): das stratum oriens ist Cortactin-positiv und L1-negativ, das stratum lucidum ist L1-positiv. Im angrenzenden stratum radiatum folgt ein cortactinhaltiger Bereich. Beide Proteine kolokalisieren schwach im stratum oriens der CA1-Region des adulten Hippocampus (gelb, I) oder gar nicht im P 5-Hippocampus (F). cx: cortex; cc: corpus callosum; fh: fimbria hippocampi; g: Gyrus dentatus; lm: stratum lacunosum-moleculare; sl: stratum lucidum; o: stratum oriens; p: Pyramidenzellschicht; r: stratum radiatum; T: Thalamus; Pfeilspitzen: alveus. Skalierung in E und F: 250 µm; Skalierung in H (für G, H, I) 25 µm.

### **5.1.3 Subzelluläre Lokalisation von L1 und Cortactin in L1-stimulierten L929-L1-Fibroblasten und N2A-Zellen**

In verschiedenen Experimenten wurde gezeigt, dass Prozesse, die mit einer schnellen Reorganisation des Actinzytoskeletts verbunden sind, eine Umverteilung von Cortactin aus dem Zytoplasma an die Zellperipherie in Bereiche aktiver Actinreorganisation induzieren (Ozawa et al., 1995, Weed et al., 1998, Cantarelli et al., 2000, Lopez et al., 2001, Birukov et al., 2002, Di Ciano et al., 2002). Weiterhin wurde die Kopräzipitation des Ig-verwandten Moleküls ICAM mit phosphoryliertem Cortactin infolge einer Stimulation von ICAM (Tilghman und Hoover, 2002a) vermutlich durch den Transport von Cortactin aus dem Zytoplasma an die Zellmembran ermöglicht.

Um zu untersuchen, ob die extrazelluläre Aktivierung von L1 die Umverteilung von Cortactin aus dem Zytoplasma an die Zellmembran verursacht, wurden L929-L1-Zellen, die stabil mit der neuronalen Isoform von L1 transfiziert waren, erst mit polyklonalem L1-Antikörper stimuliert und daraufhin immunzytochemisch untersucht. Als Kontrolle wurden L929-Zellen verwendet, die die nicht-neuronale Isoform von L1 in geringer Menge exprimieren (Abb. 11). Der durch L1-Antikörper aktivierte Signaltransduktionsweg von L1 beinhaltet in Neuroblastomzellen die Endozytose von L1 (Schmid et al., 2000). Da die nicht-neuronale Isoform von L1 jedoch nicht endozytiert wird, waren die L929-wt-Zellen als Kontrolle geeignet.



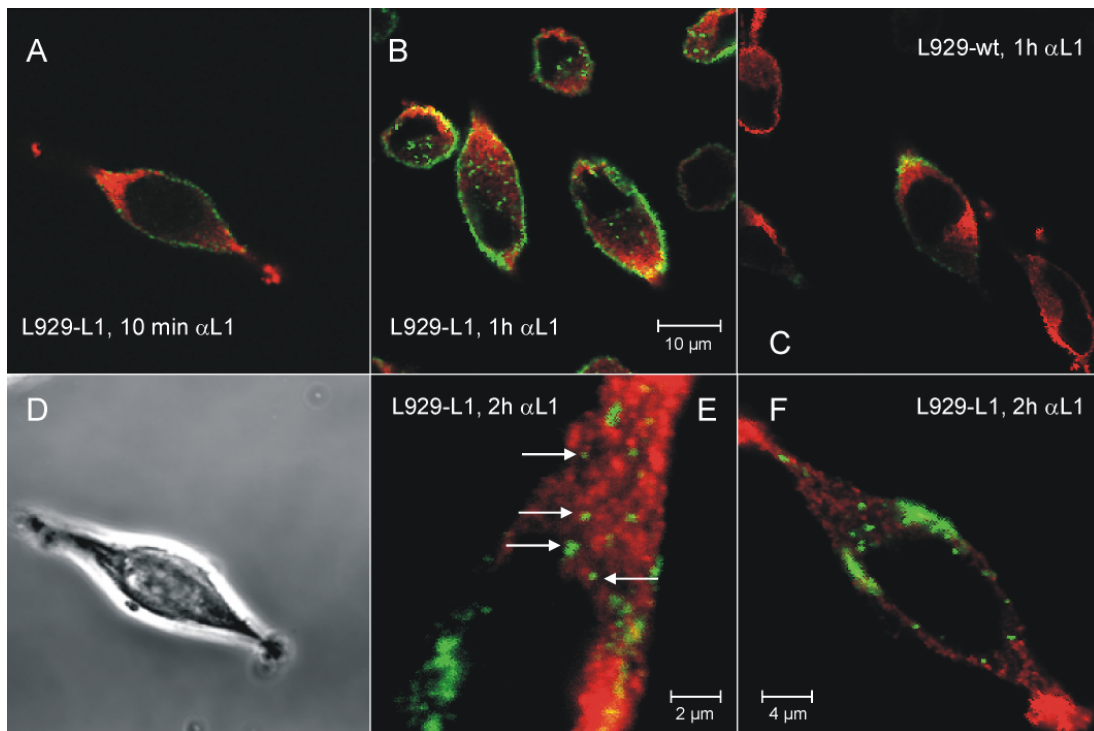
**Abb. 11: L1-Expression von L1 in L929-L1 und L929-wt-Zellen.**

Für den Western Blot wurden gleiche Proteinmengen aus Zell-Lysaten von L929-L1 und L929-Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurde die gleichmäßige Beladung des Geles durch GAPDH überprüft. Die mit der neuronalen Isoform von L1 transfizierten L929-L1-Zellen exprimieren über ca. 20 Passagen (P) hinweg gleich bleibende Mengen von L1. Die L929-Zellen exprimieren geringe Mengen der nicht-neuronalen Isoform von L1.

In der immunzytochemischen Färbung wurden intrazelluläres und extrazelluläres L1 unterschieden, indem lebende Zellen erst mit L1-Antikörper stimuliert und anschließend fixiert wurden. Dann wurden hintereinander zwei (mit verschiedenen Farbstoffen gekoppelte) Zweitantikörper eingesetzt: der erste vor der Permeabilisierung (für die Markierung und Sättigung von Bindungsstellen von extrazellulärem L1-Antikörper) und der zweite nach der Permeabilisierung (Markierung von intrazellulärem L1). In den folgenden Abbildungen 12 und 13 wird der Übersichtlichkeit halber nur intrazelluläres L1 dargestellt.

Nach 1 h L1-Aktivierung wird L1 von L929-L1-Zellen deutlich endozytiert (Abb. 12, B), während in L929-Zellen (Negativkontrolle) keine Endozytose von L1 stattfindet (Abb. 12, C). Als weitere Kontrolle wurden L929-L1-Zellen auf Eis stimuliert. Auch unter diesen Bedingungen wurde keine Endozytose beobachtet (nicht dargestellt). Der Vergleich von 1 h stimulierten L929-L1-Zellen mit 10 min stimulierten L929-L1-Zellen und 1 h L1-stimulierten L929-Zellen zeigt jedoch keine Umverteilung von Cortactin aus dem Zytoplasma heraus an die Zellmembran (Abb. 12, A, B, C). Endozytiertes L1 kolokalisiert nach 1 h nicht mit zytoplasmatischem Cortactin. Auch die Verlängerung der Stimulationszeit auf 2 h bewirkt keine Kolokalisation beider Proteine in den L1-haltigen Endosomen (Abb. 12, E und F). An der Zellmembran überlagern L1 und Cortactin nur partiell und unabhängig von der Endozytose von L1 (Abb. 12, B, C, E, F).



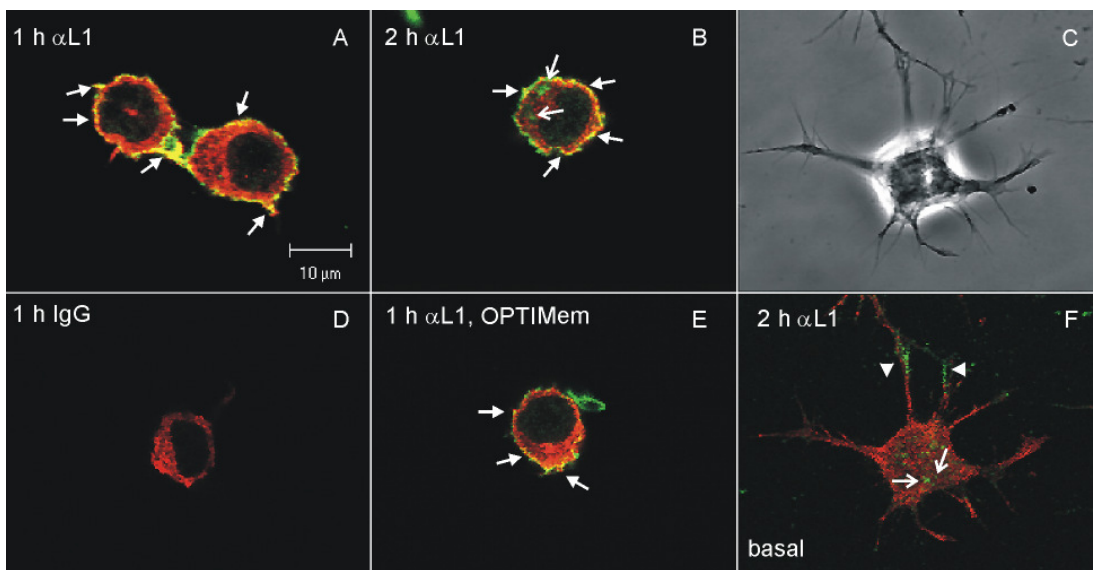


**Abb. 12: Immunzytochemische L1- und Cortactindoppelfärbung von L1-stimulierten L929-L1-Zellen.**

L929-L1-Fibroblasten wurden 10 min (A), 1 h (B) oder 2 h (E, F) mit polyklonalem L1-Antikörper stimuliert. Cortactin (rot) und intrazelluläres L1 (grün) wurden durch Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die Bilder wurden auf halber Zellhöhe der ca. 7 μm hohen Zellen aufgenommen. Die Färbung von intrazellulärem L1 ist nach 10 min Stimulationszeit sehr viel schwächer als nach 1 h. Cortactin wird weder nach 10 min, noch nach 1 h oder 2 h aus dem Zytoplasma heraus an die Zellmembran umverteilt. Nach 1 h und 2 h L1-Stimulation wird eine starke intrazelluläre L1-Färbung sichtbar (B, E, F), die in L929-Zellen (C) nicht zu beobachten ist. Weder nach 1 h und auch nicht nach 2 h Antikörperstimulation kolokalisieren intrazelluläres L1 und zytoplasmatisches Cortactin (Pfeile in E; F). In der Zellperipherie überlagern L1 und Cortactin schwach in Bereichen hoher Cortactindichte (B, C, E, F). D: Phasenkontrastaufnahme zu A.

Die Stimulation von L1 verursacht wahrscheinlich die Endozytose von L1 (ein Endosomenmarker wurde in dieser Arbeit nicht verwendet), aber keine Umverteilung von Cortactin aus dem Zytoplasma an die Zellperipherie und keine intrazelluläre Kolokalisation beider Proteine. Möglicherweise verfügen (nicht-neuronale) L929-Fibroblasten jedoch nicht über die nötige Maschinerie zur Aktivierung des L1-abhängigen Signaltransduktionsweges und der durch diesen verursachten Effekte. Deshalb wurde das Stimulationsexperiment in analoger Weise an Neuroblastom2A (N2A)-Zellen durchgeführt, die endogen L1 exprimieren (Abb. 13). Als Negativkontrolle wurde statt des

Stimulationsantikörpers Kaninchen-IgG verwendet. Weder nach 10 min (nicht dargestellt), noch nach 1 h (Abb. 13, A) oder nach 2 h Stimulation (Abb. 13, B) wurde eine Umverteilung von Cortactin beobachtet, das homogen im Zytoplasma verteilt ist. Auch die Endozytose von L1 wurde nicht in vergleichbar deutlicher Weise wie in L929-L1-Zellen aktiviert. Eine Änderung der Stimulationsbedingung auf serumfreies OPTIMEM-Medium, dessen Verwendung in den Fibroblasten-Zellen die Endozytose unterdrückte, hatte weder einen Einfluss auf die Cortactinverteilung, noch konnte die Endozytose von L1 induziert werden (Abb. 13, E). Eine Überlagerung von L1 und Cortactin ist an der Zellperipherie deutlich zu sehen (Abb. A, B, E). In den Neuriten der N2A-Zellen und an der basalen Zelloberfläche überlagern L1 und Cortactin nicht (Abb. 13, F).



**Abb. 13: Immunzytochemische L1- und Cortactindoppelfärbung von L1-stimulierten N2A-Zellen.**

N2A-Zellen wurden 10 min (nicht dargestellt), 1 h (A, E) oder 2 h mit L1-Antikörper stimuliert (B). Als Negativkontrolle wurde IgG eingesetzt (D). Die Bilder wurden auf halber Zellhöhe aufgenommen, mit Ausnahme der Aufnahme der basalen Zelloberfläche (F). Intrazelluläres L1 (grün) und Cortactin (rot) wurden immunzytochemisch markiert. Die L1- und die Cortactinfärbung überlagern (gelb) nach 1 h und 2 h stark an der Zellmembran (dicke Pfeilköpfe, B, E). Im Vergleich zur IgG-Kontrolle verursacht die L1-Stimulation keine Umverteilung von Cortactin an die Zellmembran. Obwohl in wenigen Zellen intrazelluläres L1 im Zytoplasma vorliegt (B, dünne Pfeilköpfe), zeigt sich kein punktförmiges Muster der intrazellulären L1-Färbung (wie bei L929-L1-Zellen, Abb. 12, B, E, F). An der basalen Zelloberfläche ist L1 in punktförmiger Verteilung akkumuliert und überlagert nicht mit Cortactin (F, dünne Pfeilköpfe). Neuroblastomzellen bilden

## 5. ERGEBNISSE

---

in Kultur Neuriten. Auch in den Neuriten liegen L1 und Cortactin deutlich getrennt vor. (F, Pfeilspitzen). C: Phasenkontrastaufnahme zu F.

Die L1-Aktivierung führte in den verwendeten Zell-Linien L929-L1, L929-wt und N2A nicht zu einer Änderung der subzellulären Verteilung von Cortactin aus dem Zytoplasma heraus an die Zellperipherie. L1-haltige Endosomen waren in Fibroblasten-Zellen nicht mit zytoplasmatischem Cortactin kolokalisiert. Eine Umverteilung von Cortactin an bestimmte Domänen der Zellmembran und/oder eine direkte (oder indirekte) Interaktion mit L1 infolge der L1-Aktivierung konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, zumal sich an der Zellmembran von N2A-Zellen eine Überlagerung der Färbungen für Cortactin und intrazelluläres L1 zeigt.

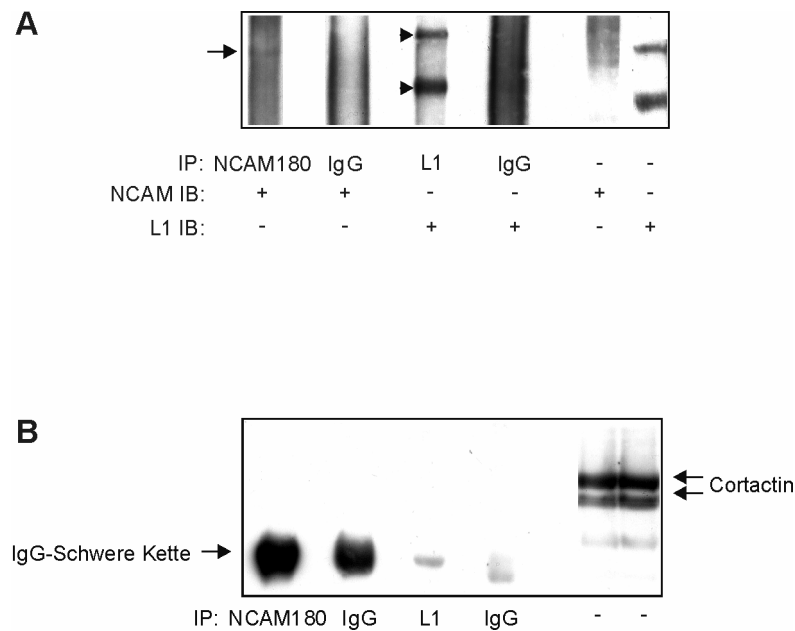
## **5.2 Untersuchung einer direkten Interaktion von L1 und Cortactin**

Bei der Untersuchung der gewebespezifischen Expression von L1 und Cortactin im Hippocampus wurde eine starke Kolokalisation von L1 und Cortactin im angrenzenden Thalamus der 5 Tage alten und der adulten Maus gezeigt (Abb. 10, E, F). Darüber hinaus ist eine starke Expression von L1 im sich entwickelnden ZNS (Bartsch et al., 1989, Lindner et al., 1983) und eine starke Expression von Cortactin im adulten Gehirn (Miglaresse et al., 1994, Yundruí et al., 1998) bereits aus früheren Veröffentlichungen bekannt. Auch in den Experimenten zur L1-abhängigen Cortactinverteilung in N2A-Zellen konnte eine deutliche Kolokalisation beider Proteine an der Zellmembran nachgewiesen werden (Abb. 13, A, B, E). Außerdem wurde eine direkte Interaktion des Ig-verwandten Transmembranmoleküls ICAM (in Abhängigkeit von der ICAM-Aktivierung) mit Cortactin durch Koimmunpräzipitationen nachgewiesen (Durieu-Trautmann et al., 1994, Tilghman und Hoover, 2002a). Ob die in 5.1 gezeigten Kolokalisationen von L1 und Cortactin durch eine direkte Interaktion der intrazellulären Domäne von L1 mit zytoplasmatischem Cortactin als Folge einer L1-Stimulation verursacht werden, wurde in den folgenden Experimenten durch Koimmunpräzipitationsexperimente untersucht.

### **5.2.1 Koimmunpräzipitationen aus den detergenslöslichen Membranfraktionen des Gesamthirns einer P 6-Maus**

Um zu untersuchen, ob L1 und Cortactin direkt (oder indirekt über ein Adaptormolekül) in Abhängigkeit von L1 interagieren, wurden für die Koimmunpräzipitationsexperimente Membranfraktionen aus dem Gesamthirn einer 6 Tage alten Maus hergestellt. In diesem Alter befindet sich das ZNS in einem frühen Entwicklungsstadium; viele Neuronen sind nicht differenziert, Neuriten wachsen aus, Zellen migrieren, bündeln Axone oder bilden synaptische Kontakte. Diese Prozesse werden u. a. von den adhäsiven Eigenschaften von L1 vermittelt, so dass das frühe Entwicklungsstadium des ZNS ein geeignetes Modell für Untersuchungen einer L1-abhängigen Interaktion von L1 und Cortactin darstellt. Das Transmembranmolekül L1 ist vorwiegend in der Zellmembran verankert, und auch eine Subfraktion von Cortactin ist an der Zellmembran angereichert. Um die

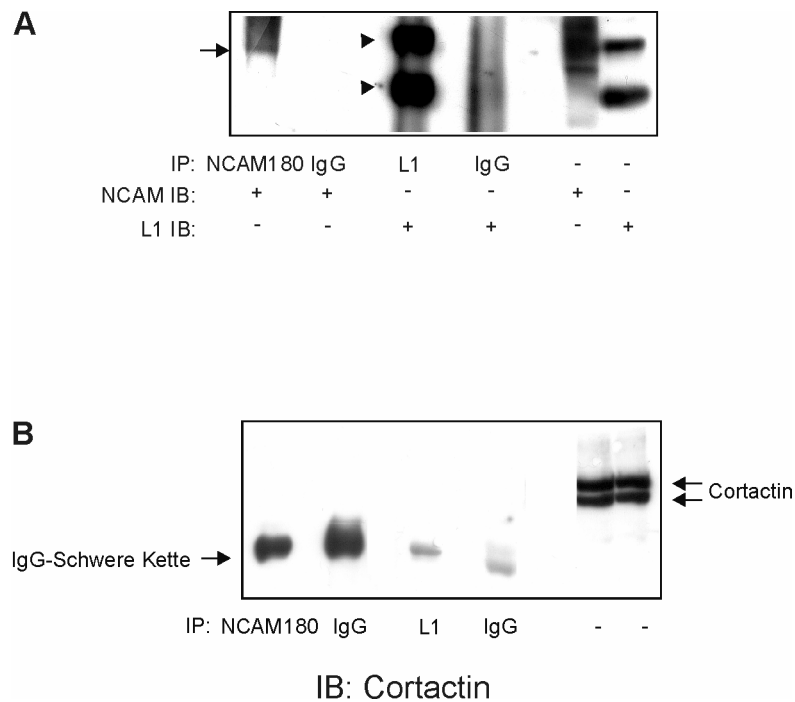
Membranbestandteile des Gehirns zu isolieren und enthaltene Proteine anzureichern, wurden zwei verschiedene Membranfraktionen aus einem P 6-Gesamthirn isoliert (die experimentelle Durchführung ist unter 4.2.7 im Methodenteil beschrieben). Die 100000 x g-Fraktion enthält Zellmembranen und assoziierte Proteine. Da die 1000 x g-Fraktion, die Zellmembranen zytoplasmatischer Kompartimente enthält, ebenfalls mit L1 angereichert ist (persönliche Information von G. Loers, unveröffentlichte Daten), wurde auch diese Fraktion für eine Koimmunpräzipitation verwendet. Die Triton X-löslichen Proteine wurden aus beiden Membranfraktionen isoliert und L1 aus diesen Fraktionen präzipitiert. Als Kontrolle wurde IgG verwendet oder mit einem NCAM 180-spezifischen Antikörper präzipitiert, da NCAM mit Cortactin aus Zell-Lysaten von Pankreas- $\beta$ -Tumorzellen koimmunpräzipitiert werden konnte (Cavallaro et al., 2001). Für die Präzipitationen wurden jeweils gleiche Mengen an Gesamtprotein verwendet. Die Proteinpräzipitation wurde mit einem Immunoblot auf L1 oder NCAM überprüft. Zusätzlich wurde kontrolliert, ob die jeweils für die Immunpräzipitation (IP) eingesetzte Fraktion (Input) L1- oder NCAM-positiv war (Abb. 14, A und 15, A). Anschließend wurde eine mögliche Kopräzipitation von Cortactin im Immunoblot untersucht. Zusätzlich wurde kontrolliert, ob der verwendete Input Cortactin-positiv war (Abb. 14, B und 15, B).



**Abb. 14 Immunoblots von L1- und NCAM 180-Präzipitationen aus der Triton X-löslichen 1000 x g-Fraktion (Maus, P6, Gesamthirn).**

L1 und NCAM 180 wurden aus der Triton X-löslichen 1000 x g-Fraktion präzipitiert. Für die Immunoblots wurden polyklonaler anti-L1- oder anti-NCAM-Antikörper verwendet. Die präzipitierten Proteine L1 (Pfeilspitzen) und NCAM 180 (Pfeil) wurden im Immunoblot nachgewiesen (A). Zusätzlich wurde der Input auf L1 oder NCAM überprüft. L1 war in der Triton X-löslichen 1000 x g-Fraktion deutlich angereichert, während vergleichsweise wenig NCAM enthalten war. Entsprechend wurde wenig NCAM, aber relativ viel L1 immunpräzipitiert. Bei Verwendung des entsprechenden IgGs als Negativ-Kontrolle wurde keine unspezifische Präzipitation von NCAM oder L1 beobachtet. Cortactin kopräzipitierte aus den Triton X-löslichen 1000 x g-Fraktionen nicht mit L1 oder NCAM, obwohl der verwendete Input stark Cortactin-positiv war (B).

Die Triton X-lösliche 1000 x g-Fraktion enthält sowohl L1 als auch (in sehr viel geringerer Menge) NCAM. L1 oder NCAM wurden aus dieser Fraktion präzipitiert. Die IgG-Kontrolle präzipitierte keine unspezifisch bindenden Proteine (Abb. 14, A). In der Triton X-löslichen 1000 x g-Fraktionen ist auch Cortactin stark angereichert, kopräzipitiert jedoch nicht mit L1 oder NCAM (Abb. 14, B).



**Abb. 15: Immunoblots von L1- und NCAM 180-Präzipitationen aus der Triton X-löslichen 100000 x g-Fraktion (Maus, P6, Gesamthirn).**

L1 und NCAM wurden aus der Triton X-löslichen 100000 x g-Fraktion immunpräzipitiert und der Erfolg der IP durch einen Immunoblot (für die Immunoblots wurden polyklonaler anti-L1- oder anti-NCAM-Antikörper verwendet) kontrolliert (A, Pfeil: NCAM 180, Pfeilspitzen: L1). Zusätzlich wurde der Input auf L1 oder NCAM überprüft. L1 und NCAM sind in der Triton X-löslichen 100000 x g-Fraktion deutlich angereichert. Beide Proteine wurden aus diesen Fraktionen immunpräzipitiert (A). Die IgG-Kontrolle präzipitierte kein unspezifisch bindendes Protein. Cortactin wurde aus den Triton X-löslichen 100000 x g-Fraktionen weder mit L1 noch mit NCAM 180 kopräzipitiert, obwohl der verwendete Input stark Cortactin-positiv war (B).

In der Triton X-löslichen 100000 x g-Zellmembranfraktion wurden L1 und NCAM nachgewiesen, und sowohl L1 als auch NCAM wurden aus dieser Fraktion präzipitiert. Die IgG-Kontrolle präzipitierte keine unspezifisch bindenden Proteine (Abb. 15, A). Obwohl in der Triton X-löslichen 1000 x g-Fraktionen eine hohe Konzentration von Cortactin nachgewiesen wurde, konnte es nicht mit L1 oder NCAM kopräzipitiert werden (Abb. 15, B).

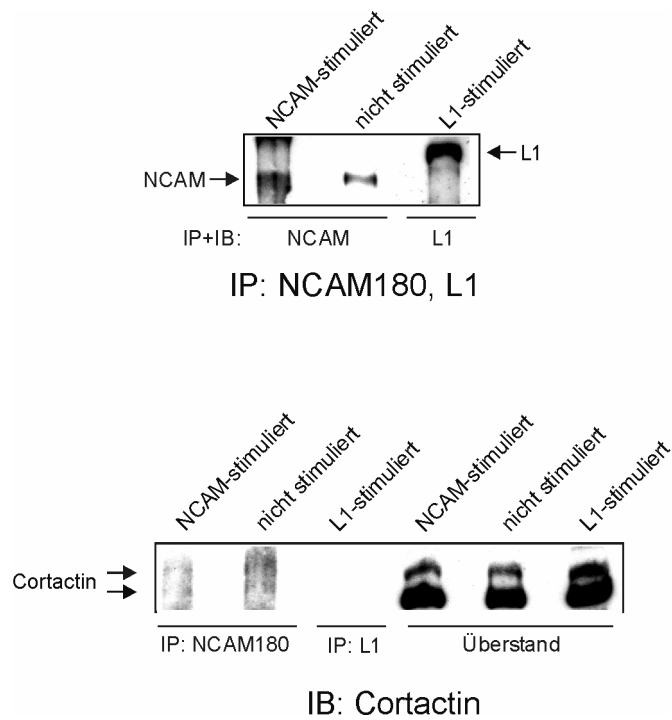
Das Ergebnis dieser Experimente ist, dass L1 und NCAM sowohl in der 1000 x g- als auch der 100000 x g-Fraktion vorhanden sind, wobei eine vergleichsweise geringe Menge NCAM in der Triton X-löslichen 1000 x g-Fraktion nachgewiesen wurde. Cortactin war

sowohl in der Triton X-löslichen 1000 x g- als auch in der 100000 x g-Fraktion in hoher Konzentration nachweisbar. Obwohl L1 und NCAM präzipitiert wurden, und eine Subfraktion des Zytoskelettproteins Cortactin offensichtlich membranassoziiert vorliegt, konnte eine direkte Interaktion von NCAM und Cortactin oder von L1 mit Cortactin in den durchgeführten Koimmunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden.

### **5.2.2 Koimmunpräzipitationen aus den Zell-Lysaten L1-stimulierter N2A-Zellen**

Zusätzlich zu den Triton X-löslichen Membranfraktionen aus dem Gesamthirn der 6 Tage alten Maus wurden die Zell-Lysate L1-stimulierter N2A-Zellen für die Überprüfung einer direkten Interaktion von L1 und Cortactin verwendet, da eine direkte Interaktion des (Ig-verwandten) Transmembranmoleküls ICAM mit Cortactin erst durch eine ICAM-Stimulation induziert wurde (Tilgham und Hoover, 2002a). Wegen der bekannten Kopräzipitation von Cortactin mit NCAM aus  $\beta$ -Tumorzellen (Cavallaro et al., 2001) wurde das Experiment parallel in analoger Weise mit NCAM durchgeführt. N2A-Zellen, die endogen alle drei NCAM-Isoformen exprimieren, wurden für diese Kontrolle mit polyklonalem NCAM-Antikörper stimuliert und NCAM 180 aus dem Zell-Lysat diesen Zellen präzipitiert. Als weitere Kontrolle wurden nicht-stimulierte Zellen für die IP verwendet. Die IP von L1 oder NCAM 180 wurde durch einen Immunoblot kontrolliert und eine Cortactinkopräzipitation durch einen weiteren Immunoblot überprüft (Abb. 16). Die in Abb. 16 gezeigte Kopräzipitation von NCAM und Cortactin konnte in insgesamt fünf weiteren Experimenten nicht reproduziert werden. In keinem dieser Experimente kopräzipitierte L1 mit Cortactin.





**Abb. 16: Immunoblots von L1- oder NCAM 180-Immünpräzipitationen aus L1- oder NCAM-stimulierten N2A-Zellen.**

Aus den Zell-Lysaten 20 min L1- oder NCAM-stimulierter N2A-Zellen wurde NCAM 180 oder L1 präzipitiert (oben). Für die Immunoblots wurden polyklonaler anti-L1- oder anti-NCAM-Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurde NCAM 180 aus nicht-stimulierten N2A-Zellen präzipitiert. Die Präzipitationen wurden im Immunoblot auf Cortactin überprüft. Cortactin konnte nicht mit L1 aus den Zell-Lysaten 10 min (nicht dargestellt) und 20 min stimulierter N2A-Zellen kopräzipitiert werden. Die hier dargestellte Kopräzipitation von Cortactin mit NCAM in den Zell-Lysaten 20 min NCAM-stimulierter Zellen konnte nicht reproduziert werden. Stattdessen wurde Cortactin im Überstand der IP in hoher Konzentration nachgewiesen (unten).

### **5.3 Untersuchungen zum Einfluss der L1-Stimulation auf die Cortactin-Tyrosin-Phosphorylierung**

Obwohl durch die Immunpräzipitationen (siehe 5.2) keine direkte Interaktion zwischen L1 und Cortactin nachgewiesen wurde, ist eine indirekte Interaktion zwischen beiden Proteinen denkbar. Eine solche indirekte Interaktion könnte z. B. durch Src vermittelt werden. Src ist ein Intermediat des L1-vermittelten Signaltransduktionswegs (Schmid et al., 2000) und phosphoryliert die Tyrosinreste Y421, Y466 und Y482 von Cortactin (Huang et al., 1998). In Src-überexprimierenden Fibroblasten konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von Cortactin Y466 von der Y421-Phosphorylierung abhängt (Head et al., 2003).

Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die L1-Aktivierung, möglicherweise vermittelt durch Src, einen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung von Cortactin ausübt.

#### **5.3.1 Änderung des Gesamtphosphotyrosinanteils von Cortactin in den Gesamtzell-Lysaten von L1-stimulierten L929-L1-Zellen**

L929-L1-Fibroblasten wurden 10 min, 1 h und 18 h lang mit L1-Antikörper stimuliert. Als Kontrolle wurden L929-L1-Zellen mit IgG inkubiert oder L929-wt-Zellen mit L1-Antikörper stimuliert. Die Gesamtzell-Lysate wurden im Western Blot auf Gesamtphosphotyrosin und Cortactin (80 kDa und 85 kDa) untersucht. Der prozentuale Anteil von Phosphotyrosin mit einem Molekulargewicht von 80 kDa und 85 kDa konnte in mehreren unabhängigen Experimenten aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht zuverlässig quantifiziert werden. Zum einen verursachte der Phosphotyrosinantikörper einen hohen unspezifischen Hintergrund, so dass Signale niedriger Intensität und Signale hoher Intensität nicht nebeneinander ausgewertet werden konnten. Zum anderen wurden die Phosphotyrosinsignale auf Höhe des Molekulargewichtes von Cortactin (80 und 85 kDa) nicht ausreichend von benachbarten Phosphotyrosinsignalen abgetrennt, um die Signalintensität mit dem Programm TINA 2.0 (Raytest) zu quantifizieren.

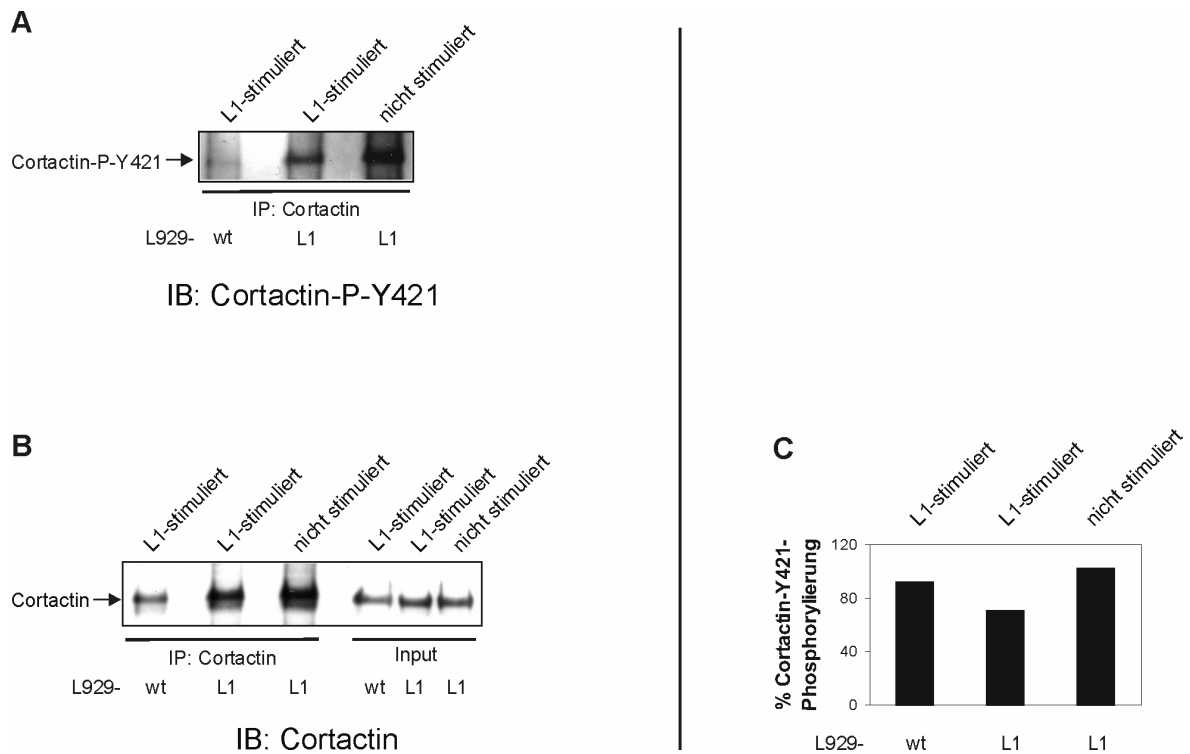
### **5.3.2 Untersuchung zu einer möglichen Cortactin-Y421-Phosphorylierung infolge der L1-Stimulation von L929-L1-Zellen**

Da die Methode der Bestimmung von Gesamtphosphotyrosin aus den Lysaten L1-stimulierter L929-L1-Zellen für eine Quantifizierung des cortactinspezifischen Phosphotyrosinsignals nicht geeignet war, wurden die Versuchsbedingungen geändert. Zum einen wurde anstelle des Gesamtphosphotyrosinantikörpers der Cortactin-P-Y421-Antikörper verwendet, der spezifisch gegen den phosphorylierten Tyrosinrest Y421 von Cortactin gerichtet war (Head et al., 2003). Zum anderen wurde Cortactin durch eine Immunpräzipitation aus den Gesamtzell-Lysaten von anderen Proteinen ähnlichen Molekulargewichts abgetrennt.

L929-L1-Zellen und L929-wt-Zellen, die als Kontrolle dienten, wurden 10 min mit L1-Antikörper stimuliert, wie in 4.4.4 beschrieben. Als weitere Negativkontrolle wurden nicht stimulierte L929-L1-Zellen verwendet. Aus den Gesamtzell-Lysaten der stimulierten Zellen wurde Cortactin präzipitiert und Cortactin-P-Y421 mit einem Immunoblot detektiert (Abb. 17, A). Anschließend wurde der Erfolg der IP durch den Nachweis von Gesamtcortactin überprüft (Abb. 17, B). Die Signalintensitäten wurden mit dem Programm TINA 2.0 (Raytest) bestimmt und der prozentuale Anteil von phosphoryliertem Cortactin Y421 im Verhältnis zu Gesamtcortactin analysiert (Abb. 17, C). Die Stimulation von L1 in L929-L1-Zellen verursachte im Vergleich zu nicht stimulierten L929-L1-Zellen und stimulierten wt-Zellen keine Zunahme der Y421-Phosphorylierung von Cortactin. Stattdessen war der prozentuale Anteil von Cortactin-P-Y421 niedriger als in den Negativkontrollen stimulierter L929-Zellen und nicht stimulierter L929-L1-Zellen.

Ob die L1-Stimulation einen inhibitorischen Effekt auf die Cortactin-Y421-Phosphorylierung ausübt oder die Phosphorylierung nicht beeinflusst, konnte in zwei weiteren Experimenten nicht überprüft werden. Mit dem Cortactin-P-Y421-Antikörper konnte kein Signal mehr detektiert werden, obwohl Cortactin in beiden Experimenten präzipitiert worden war.

## 5. ERGEBNISSE



**Abb. 17: Einfluss der L1-Stimulation von L929-L1-Zellen auf die Cortactin-Y421-Phosphorylierung.**

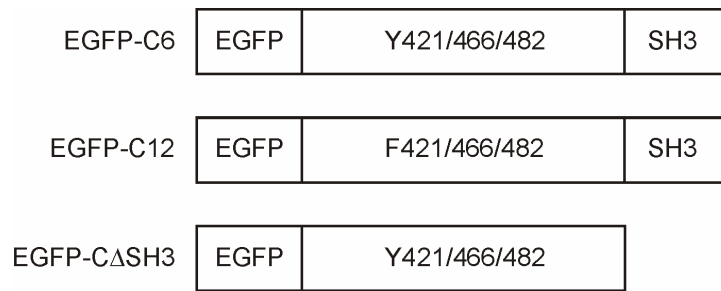
Aus den Gesamtzell-Lysaten 10 min lang mit L1-Antikörper stimulierter L929-L1-Zellen wurde Cortactin präzipitiert und im Immunoblot die Phosphorylierung von Cortactin-Y421 detektiert (A). Anschließend wurde der Blot auf Cortactin untersucht (B). Als Kontrolle wurden L1-stimulierte L929-wt-Zellen und nicht stimulierte Zellen verwendet. Die Signalintensität wurde mit dem Programm TINA 2.0 (Raytest) analysiert und aus den Messwerten einer Immunpräzipitation der prozentuale Anteil von phosphoryliertem Cortactin zu Gesamtcortactin (100 %) ermittelt (C). Die Stimulation von L1 in L929-L1-Zellen hat im Vergleich zu den Kontrollen keinen oder einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphorylierung von Cortactin-Y421 und verursacht keine Zunahme der Phosphorylierung (C).

## **5.4 Untersuchung des Einflusses von Cortactin auf die Neuritogenese, die Neuritenzahl und das Neuritenwachstum**

L1 ist an Prozessen beteiligt, die während der Entwicklung des ZNS eine zentrale Rolle spielen (Brümmendorf et al., 1998), wie z. B. der Wegfindung und dem Auswachsen von Neuriten. Da auch das Zytoskelettprotein Cortactin am Neuritenwachstum beteiligt ist (Du et al., 1998, Kinnunen et al., 1998, Martinez et al., 2003), wurde in den folgenden Experimenten der Einfluss von Cortactin auf das L1-abhängige Neuritenwachstum untersucht. Da die Kopräzipitation von NCAM und Cortactin in  $\beta$ -Tumorzellen auf eine NCAM-Cortactin-Interaktion hindeutet, wurde zusätzlich das NCAM-abhängige Neuritenwachstum untersucht. Für diese Experimente wurden Primärkulturen von Hippocampusneuronen mit verschiedenen EGFP-Cortactin-Fusionsproteinen (und als Kontrolle mit EGFP) transfiziert und auf mehreren Substraten ausgesät: L1-Fc-Fusionsprotein (fördert das Neuritenwachstum stark), NCAM-Fc (stimuliert das Neuritenwachstum schwächer und über einen anderen Mechanismus als L1-Fc), Laminin (vermittelt das Neuritenwachstum über einen L1-unabhängigen Mechanismus) und PLL (nichtphysiologisches Substrat, das das Neuritenwachstum nur schwach fördert). Die Gesamtlänge der Neuriten, die Neuritenzahl sowie die Anzahl der Zellen, die Neuriten gebildet hatten wurden bestimmt und auf einen Einfluss der verschiedenen Cortactin-konstrukte hin analysiert.

### **5.4.1 Untersuchung der Cortactinkonstrukte auf Proteinebene**

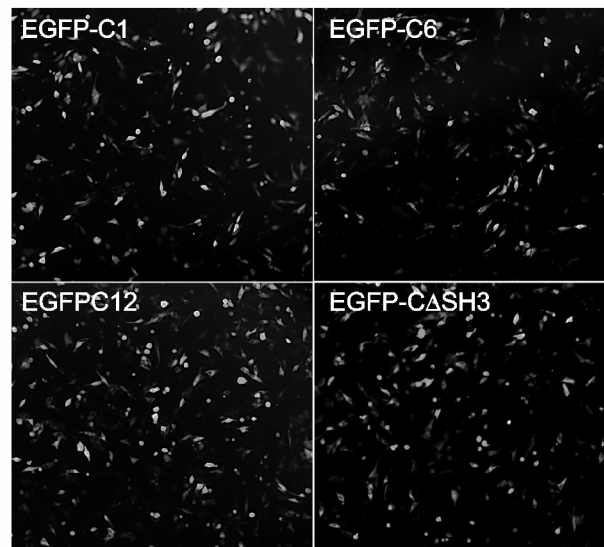
Um den Einfluss von Cortactin auf das L1- oder NCAM-abhängige Neuritenwachstum mechanistisch zu untersuchen, wurden folgende N-terminal EGFP-fusionierte Cortactin-konstrukte kloniert und für die Transfektion der Hippocampusneuronen verwendet: EGFP-wt-Cortactin (EGFP-C6), EGFP-Cortactin mit Mutationen in den Src-Phosphorylierungsstellen Y421/466/482 (EGFP-C12) und EGFP-C $\Delta$ SH3, dessen SH3-Domäne zum größten Teil deletiert ist (Abb. 18). Die Klonierungsstrategien sind im Anhang aufgeführt.



**Abb. 18: Schematische Übersicht über die Klonierungsvektoren.**

Die Klonierungsvektoren kodieren für N-terminal mit EGFP fusioniertes wt-Cortactin (EGFP-C6), Cortactin, das Mutationen in der Src-Bindungsstelle enthält (EGFP-C12) und Cortactin, dessen SH3-Domäne größtenteils deletiert ist (EGFP-C $\Delta$ SH3).

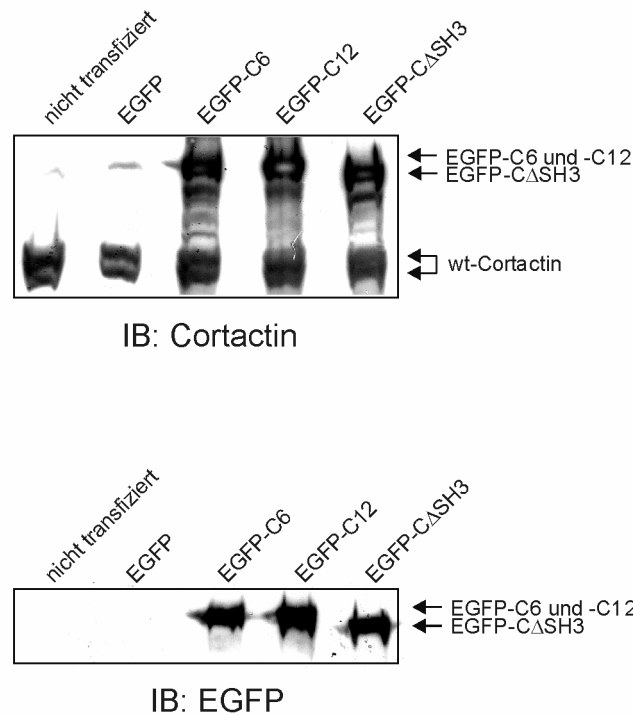
Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Cortactinkonstrukte auf Proteinebene exprimiert werden, wurden L929-Zellen mit den Klonierungsvektoren transient transfiziert und die Expression der EGFP-Fusionsproteine fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Als Kontrolle wurde der EGFP-Vektor (EGFP-C1) verwendet (Abb. 19). Die Fusionsproteine EGFP-C6, EGFP-C12, EGFP-C $\Delta$ SH3 wurden mit gleicher Effizienz wie der EGFP-C1-Vektor exprimiert und hatten keinen letalen Einfluss auf die transfizierten Zellen. In der verwendeten Vergrößerung konnte keine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden.



**Abb. 19: Expression der Cortactinkonstrukte in L929-Zellen.**

Die EGFP-Cortactin-Fusionsproteine EGFP-C6, EGFP-C12 und EGFP-C $\Delta$ SH3 wurden im Vergleich zum EGFP-C1-Vektor mit gleicher Effizienz in den transfizierten Zellen exprimiert und hatten keinen Einfluss auf die Zellmorphologie.

Die transfizierten Zellen wurden anschließend lysiert und das Gesamtzell-Lysat im Western Blot untersucht. EGFP (29 kDa), EGFP-C6 (114 kDa), EGFP-C12 (114 kDa) und EGFP-C $\Delta$ SH3 (97,5 kDa) wurden bei den erwarteten Molekulargewichten zusätzlich zum endogen exprimierten wt-Cortactin (80/85 kDa) mit Cortactin- oder mit EGFP-Antikörpern detektiert (Abb. 20).



**Abb. 20: Immunoblots der Zell-Lysate von mit EGFP, EGFP-C6-, EGFP-C12 und EGFP-CΔSH3 transfizierten L929-Fibroblasten.**

In den Gesamtzell-Lysaten von transient mit den verschiedenen Cortactinkonstrukten transfizierten L929-Zellen wurden die Proteine EGFP (nicht im EGFP-Immunoblot gezeigt), EGFP-C6, EGFP-C12 und EGFP-CΔSH3 zusätzlich zum endogen exprimierten wt-Cortactin in großer Menge exprimiert. Oben: Cortactin-Immunoblot, unten: EGFP-Immunoblot.

Da die klonierten Vektoren durch Sequenzanalyse überprüft worden waren, die Konstrukte auf der Proteinebene in geeigneter Effizienz exprimiert wurden und weder die Zellmorphologie noch das Überleben der Zellen beeinträchtigten, wurden die oben beschriebenen Expressionsvektoren im Neuritenwachstumstest verwendet.

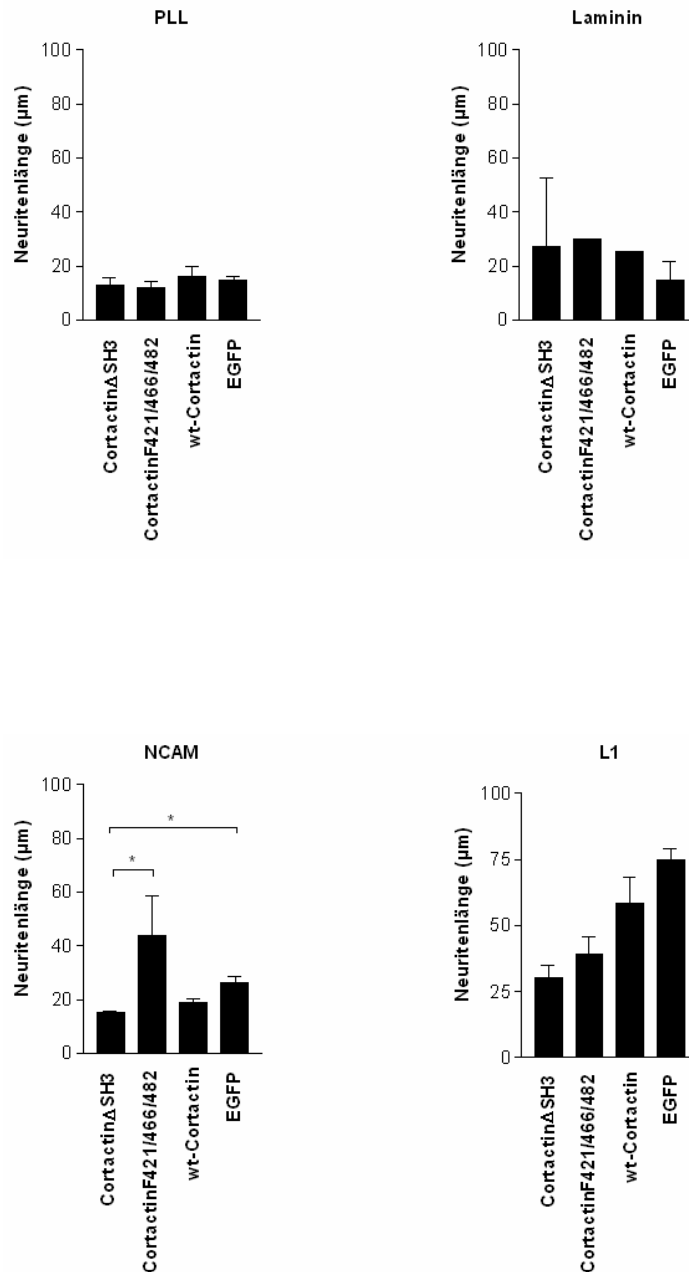
#### **5.4.2 Einfluss von Cortactin auf das L1- und NCAM-abhängige Neuritenwachstum hippocampaler Neuronen**

Für die Auswertung des Neuritenwachstumsversuches wurde die Gesamtlänge von Neuriten einer Zelle gemessen, sofern die Neuriten länger als der Zelldurchmesser waren. Zellen, die Kontakt mit anderen Neuriten hatten, wurden nicht in die Messung einbezogen.



Der Neuritenwachstumsversuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und je Experiment drei bis vier einzelne Wells pro Transfektionsansatz ausgewertet. Pro Well wurden zwischen 16 und 40 Zellen ausgewertet. Die erforderliche Zahl an auswertbaren Zellen konnte nur in einem Experiment bei einer Transfektionseffizienz von ca. 30 % analysiert werden. In Abb. 21 ist die Neuritenlänge auf den unterschiedlichen Beschichtungen in Abhängigkeit vom transfizierten Cortactinkonstrukt dargestellt. Als Kontrolle wurde jeweils der leere EGFP-C1-Vektor verwendet, da die Expression von EGFP keinen Einfluss auf das Neuritenwachstum hat.

Auf PLL-Beschichtung beeinflussen weder EGFP-C $\Delta$ SH3 (Cortactin $\Delta$ SH3), noch EGFP-C12 oder EGFP-C6 (wt-Cortactin) das Neuritenwachstum. Die Gesamtlänge der Neuriten ist deutlich geringer als auf L1-Substrat. In der Laminin-Kontrolle wird ebenfalls (im Vergleich zur EGFP-Transfektion) kein Einfluss der Cortactinkonstrukte auf das Neuritenwachstum beobachtet. Die durchschnittliche Neuritenlänge ist jedoch im Vergleich zu der PLL-Negativkontrolle etwas erhöht. Das NCAM-abhängige Neuritenwachstum wird von Cortactin $\Delta$ SH3 im Vergleich zu EGFP-C12 und der EGFP-C1-Kontrolle signifikant reduziert. Auch wt-Cortactin übt möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf das Neuritenwachstum aus. Eine Wiederholung des Experimentes mit einer hohen Zahl an auswertbaren Zellen könnte möglicherweise eine statistische Signifikanz belegen. Auf der L1-Beschichtung ist das Neuritenwachstum im Vergleich zu der PLL-Kontrolle deutlich erhöht. Sowohl Cortactin $\Delta$ SH3 als auch EGFP-C12 üben im Vergleich zu wt-Cortactin und der EGFP-Kontrolle einen inhibierenden Effekt auf das L1-abhängige Neuritenwachstum aus. In diesem Experiment sind diese Unterschiede nicht signifikant, doch ist der Unterschied der Mittelwerte so deutlich, dass sich nach Durchführung zusätzlicher Experimente mit hoher Wahrscheinlichkeit signifikante Differenzen zeigen würden.



**Abb. 21: Der Einfluss von CortactinΔSH3, Cortactin-C12 und wt-Cortactin auf das L1- und NCAM-abhängige Neuritenwachstum.**

Die Balkendiagramme zeigen den Einfluss von EGFP-CortactinΔSH3 (CortactinΔSH3), EGFP-C12 (CortactinF421/466/482) und EGFP-wt-Cortactin (wt-Cortactin) im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Die Neuritenlängen wurden aus den Mittelwerten von 2-4 Wells ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Sterne symbolisieren eine statistische Signifikanz (Dunn's multiple comparison test,  $p < 0,05$ ). Aufgetragen ist für jeweils eine Beschichtung die Neuritenlänge (Gesamtlänge je Zelle) in Abhängigkeit vom Cortactinkonstrukt. Auf PLL und Laminin übt im Vergleich zu EGFP keines der Konstrukte einen Einfluss auf das Neuritenwachstum aus. Die Neuritenlängen auf Laminin sind gegenüber

denen auf PLL erhöht, liegen aber weit unter den Neuritenlängen auf L1-Beschichtung und auch unter den Neuritenlängen auf NCAM-Beschichtung. Auf der NCAM-Beschichtung übt Cortactin $\Delta$ SH3 im Vergleich zu EGFP-C12 und EGFP einen signifikant inhibierenden Effekt auf das Neuritenwachstum aus. Auf der L1-Beschichtung konnten keine signifikant inhibierenden Effekte im Vergleich zu EGFP und wt-Cortactin ermittelt werden. Dennoch sind die mittleren Neuritenlängen von Cortactin $\Delta$ SH3 und EGFP-C12 im Vergleich zur wt-Cortactin und der EGFP-Kontrolle deutlich reduziert.

### **5.4.3 Neuritogenese und Zahl der Neuriten von EGFP-C6-, EGFP-C12- und EGFP-C $\Delta$ SH3-transfizierten Hippocampusneuronen**

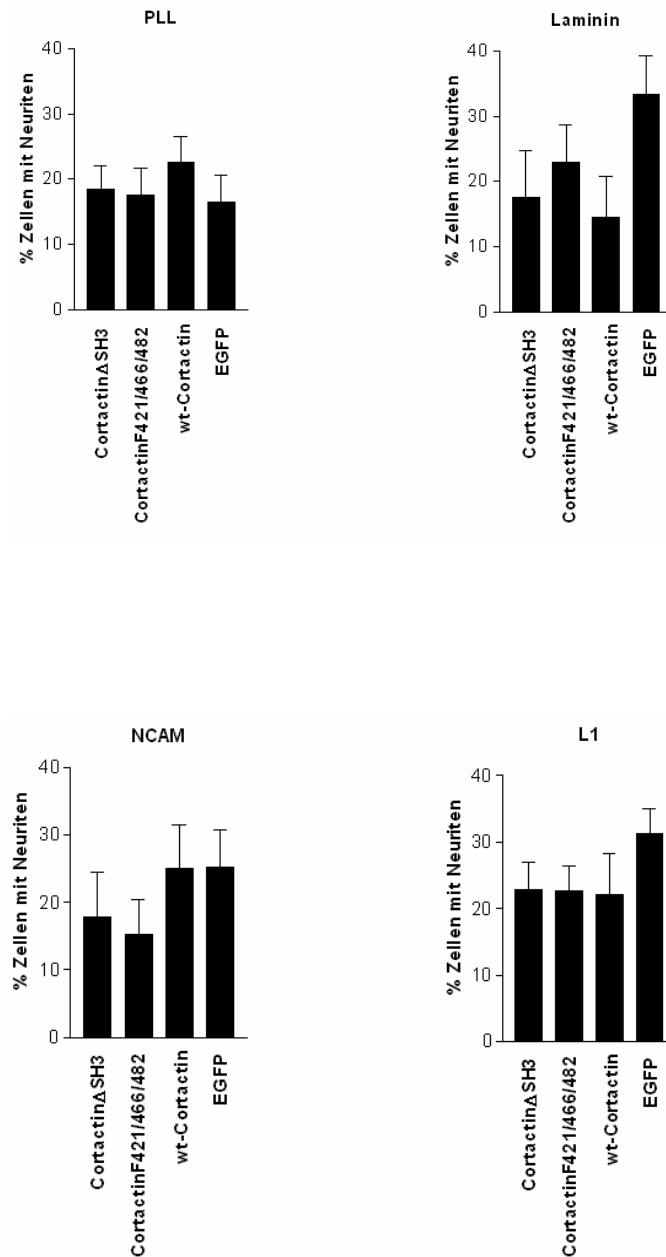
Für die Auswertung der L1- oder NCAM-abhängigen Neuritogenese und die Auswertung der Neuritenzahl wurden alle transfizierten Zellen vermessen und gezählt, auch Zellen, deren Neuriten Kontakt zu anderen Zellen gebildet hatten. Nicht ausgewertet wurden Zellen, wenn die Neuritenlänge des kontaktbildenden Neuriten den Zelldurchmesser überschritt. Durch diese Auswahlkriterien konnte zusätzlich zu dem Experiment, das für die Auswertung des Neuritenwachstums verwendet worden war, ein weiteres unabhängiges Experiment ausgewertet werden, dessen Transfektionseffizienz bei ca. 5-10 % lag. Pro Beschichtung konnten zwischen 20 und 200 Zellen ausgewertet werden, wobei sich die niedrige Zahl auswertbarer Zellen in einer großen Streuung der Messwerte widerspiegelte und einen großen Standardfehler verursachte. Durch diese experimentelle Schwierigkeit konnte kein signifikanter Effekt eines Konstruktes auf die Neuritogenese erfasst werden. Dennoch zeigten beide unabhängigen Experimente vergleichbare Tendenzen bei dem Einfluss der Cortactinkonstrukte auf die Neuritogenese. Der Vergleich der Mittelwerte lässt vermuten, dass eine Wiederholung des Experimentes mit einer großen Zahl auswertbarer Zellen signifikante Effekte deutlich machen würde (Abb. 22).

Auf PLL-Beschichtung hatte keines der Cortactinkonstrukte einen Einfluss auf die Neuritogenese. Die Zahl der Zellen, die Neuriten gebildet hatten, wichen nicht von den Werten der EGFP-Kontrolle ab. Interessanterweise hatte die Überexpression von wt-Cortactin im Vergleich zur EGFP-Kontrolle möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf die lamininabhängige Neuritogenese. Diese Tendenz zeigte sich in beiden ausgewerteten Experimenten bestätigt. Die NCAM-abhängige Neuritogenese wurde durch die Expression von EGFP-C12 beeinflusst. Auch dieser Effekt war in beiden

## 5. ERGEBNISSE

---

ausgewerteten Experimenten im Vergleich zu wt-Cortactin und der EGFP-Kontrolle beobachtbar. Die L1-abhängige Neuritogenese wurde von keinem der Cortactinkonstrukte beeinflusst. Der Vergleich der einzeln ausgewerteten Experimente bestätigte dieses Ergebnis.

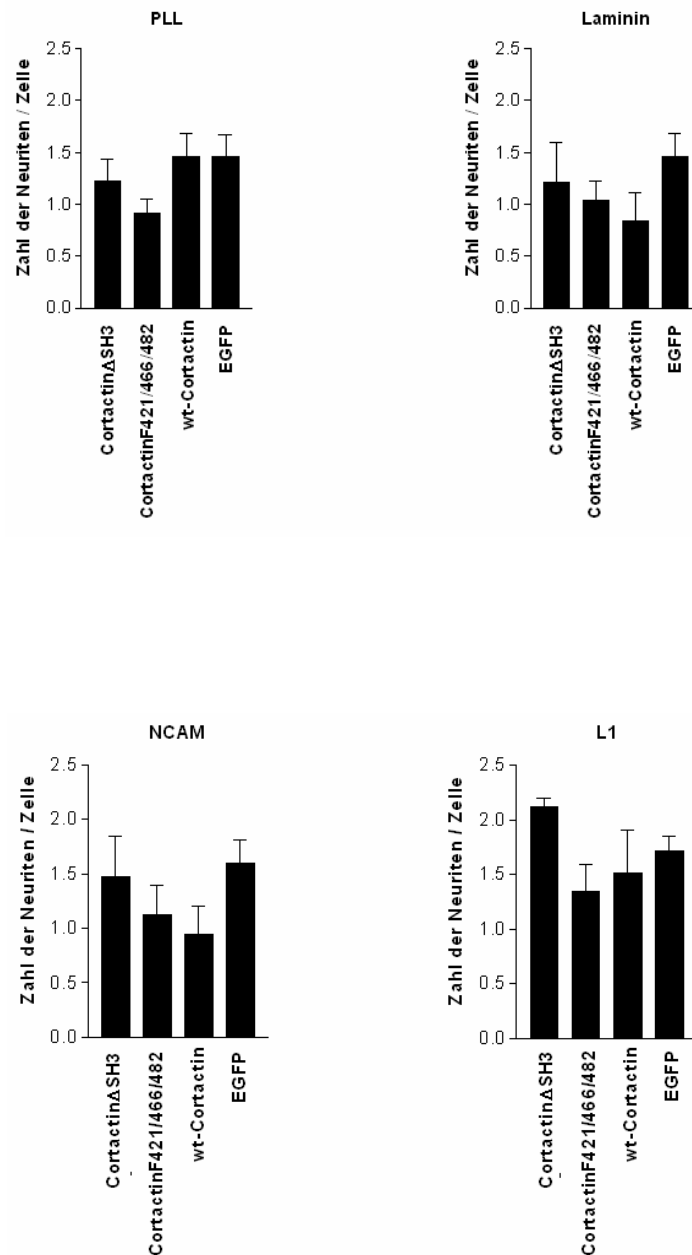


**Abb. 22: Der Einfluss von CortactinΔSH3, EGFP-C12 und wt-Cortactin auf die L1- und NCAM-abhängige Neuritogenese.**

Die Balkendiagramme zeigen den Einfluss von EGFP-CΔSH3 (CortactinΔSH3), EGFP-C12 (CortactinF421/466/482) und EGFP-wt-Cortactin (wt-Cortactin) auf die Neuritogenese im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Die Prozentzahl von Zellen mit Neuriten wurde aus den Mittelwerten von 7-8 Wells ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Ein signifikanter Effekt konnte nicht errechnet werden. Aufgetragen ist für jeweils eine Beschichtung die Prozentzahl an Zellen, die Neuriten gebildet haben (% Zellen mit Neuriten) in Abhängigkeit vom untersuchten Cortactinkonstrukt. Während auf PLL- und L1-Beschichtungen kein Einfluss von Cortactin auf die Neuritogenese festgestellt wurde, verursacht die

Überexpression von wt-Cortactin auf Lamininbeschichtung im Vergleich zur EGFP-Kontrolle eine Inhibition der Neuritogenese. Die NCAM-abhängige Neuritogenese wird durch EGFP-C12 im Vergleich zu wt-Cortactin und der EGFP-Kontrolle reduziert.

Zusätzlich wurde in beiden durchgeführten Experimenten die Zahl der Neuriten mit einer Länge, die die Länge des Zelldurchmessers überstieg, gezählt (Abb. 23). Für die Auswertung der Neuritenzahl wurden die gleichen Kriterien wie für die Neuritogenese verwendet. In beiden Experimenten konnte kein signifikanter Einfluss eines Cortactin-konstruktes auf die Neuritenzahl ermittelt werden. Ferner stimmen beide Experimente darin überein, dass die Neuritenzahl auf PLL, Laminin und NCAM um einen Mittelwert von 1,2 Neuriten pro Zelle schwankt. Dieser Mittelwert ist auf L1-Beschichtung im Vergleich zu den anderen Beschichtungen auf 1,7 erhöht.



**Abb. 23: Cortactin $\Delta$ SH3, EGFP-C12 und wt-Cortactin üben keinen Einfluss auf die Neuritenzahl einer Zelle aus.**

Die Balkendiagramme zeigen den Einfluss von EGFP-C $\Delta$ SH3 (Cortactin $\Delta$ SH3), EGFP-C12 (CortactinF421/466/482) und EGFP-wt-Cortactin (wt-Cortactin) auf die Zahl der Neuriten einer Zelle im Vergleich zur EGFP-Kontrolle. Die Zahl der Neuriten/Zelle wurde aus den Mittelwerten von 7-8 Wells ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an. Es konnte kein signifikanter Effekt ermittelt werden. Aufgetragen ist für jeweils eine Beschichtung die Zahl der Neuriten, die eine Zelle gebildet hatte (Zahl der Neuriten/Zelle) in Abhängigkeit vom untersuchten Cortactinkonstrukt. Die verschiedenen Konstrukte haben keinen Einfluss auf die Neuritenzahl. Im Vergleich unterscheiden sich die Mittelwerte der

## 5. ERGEBNISSE

---

Neuritenzahlen auf PLL-, Laminin- und NCAM Beschichtung nicht und schwanken um einen Mittelwert von 1,2 Neuriten pro Zelle. Auf L1-Beschichtung ist der durchschnittliche Mittelwert auf 1,7 Neuriten pro Zelle erhöht.



## **6 Diskussion**

Eine SAGE-Analyse der Hippocampi Morris-Water-Maze-getesteter Mäuse hatte ergeben, dass die Cortactinexpression in der GFAP-L1-Maus im Vergleich zur wt-Kontrolle im Verhältnis 1:6 verringert war. Diese Veränderung der Genexpression deutete auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen L1 und Cortactin hin. Sowohl L1 als auch Cortactin sind an vergleichbaren physiologischen Prozessen beteiligt, die durch gemeinsame Schlüsselproteine der Signaltransduktion verknüpft sein könnten. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob L1 und Cortactin direkt oder indirekt miteinander interagieren.

## **6.1 Untersuchungen der Kollokalisierung und Expressionsprofile von Cortactin und L1 in Primärkulturen von Hippocampusneuronen sowie im Hippocampus der Maus**

Um zu untersuchen, ob L1 und Cortactin möglicherweise direkt interagieren, wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit L1 und Cortactin an 2 Tage kultivierten Hippocampusneuronen durchgeführt (Abb. 6). L1 und Cortactin werden beide in Hippocampusneuronen exprimiert und sind über die gesamte Zelle verteilt. Im Zellkörper ist Cortactin zytoplasmatisch lokalisiert, und L1 wurde an der Zelloberfläche nachgewiesen. In der Doppelimmunfluoreszenzfärbung zeigten etwa 70 % der L1-Cluster eine Überlagerung mit cortactinhaltigen Bereichen (Abb. 6, E, Abb.9). Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob diese Kollokalisierung von L1 und Cortactin eine Folge der L1-Clusterbildung war, da Cortactin auch ohne L1-Capping in clusterähnlicher Verteilung entlang der Neuriten verteilt war (Abb. 6, A). Auch in einem Kontrollexperiment, in dem anstelle von Cortactin  $\beta$ -Catenin nachgewiesen wurde (Abb. 8), lag  $\beta$ -Catenin bereits ohne L1-Capping in clusterähnlicher Verteilung vor (Abb. 8, A). Da  $\beta$ -Catenin Cadherine an das Actinzytoskelett koppelt (Huber et al., 1996), ist eine Interaktion zwischen Cortactin und  $\beta$ -Catenin über das Actinzytoskelett nicht auszuschließen. Interessanterweise zeigt eine neuere Publikation (Gavert et al., 2005), dass die Expression von L1 in kolorektalen Tumorzellen durch das Zusammenwirken von  $\beta$ -Catenin mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren stimuliert wird. L1 ist also ein „Zielgen“ von  $\beta$ -Catenin.

Die Anteile von L1-Clustern, die mit cortactinhaltigen Regionen überlagerten, unterschieden sich nicht von den Anteilen an L1, die eine Überlagerung mit  $\beta$ -cateninhaltigen Regionen aufwiesen (Abb. 9). Daher stand keine geeignete Negativkontrolle zur Verfügung. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Kollokalisierung von L1 mit Cortactin oder  $\beta$ -Catenin eine zufällige Überlagerung der eng beieinander liegenden L1- und Cortactin- oder  $\beta$ -Catenin-immunopositiven Bereiche war, oder ob das L1-Capping zu dieser Kollokalisierung von L1 und Cortactin oder L1 und  $\beta$ -Catenin entlang der Neuriten führte.

Auch in den Wachstumskegeln der Hippocampusneuronen war Cortactin angereichert (Abb. 7, A). Obwohl die Lokalisation von L1 in Wachstumskegeln bereits gezeigt wurde (Kamiguchi et al., 1998 und 2000), konnte L1 bei der in dieser Arbeit verwendeten Koimmunfluoreszenzfärbung nicht in Wachstumskegeln nachgewiesen werden. Durch die L1-Antikörperinkubation an lebenden Hippocampusneuronen wurde L1 möglicherweise aus den Wachstumskegeln heraus in den „Nacken“ des Wachstumskegels umverteilt. Für diese Vermutung spricht die sehr starke Anreicherung von L1 unterhalb des Wachstumskegels, wo es mit Cortactin in dicken Clustern kolokalisiert (Abb. 7, A). Da die Kolokalisation von Cortactin und L1 in den Neuriten keinen Beweis, aber eine wichtige Grundvoraussetzung für eine direkte Interaktion beider Proteine darstellt, wurde eine direkte Bindung beider Proteine durch zusätzliche Experimente überprüft.

Primärkulturen stellen auf der einen Seite ein Modell dar, das dem *in vivo*-Zustand des Hippocampus recht nahe kommt, andererseits repräsentieren kultivierte Neuronen eine *in vitro*-Situation. Dies kann von Vorteil bezüglich der Untersuchung L1-abhängiger Prozesse sein, da Neuronen in Kultur L1-vermittelte Prozesse wie Neuritenwachstum, Zellwanderung und Neuritogenese ausführen. Die Neuritogenese unterscheidet sich jedoch *in vitro* und *in vivo* und die Neuriten 2 Tage kultivierter Hippocampusneuronen sind meist nicht in Axone oder Dendriten differenziert (Da Silva und Dotti, 2002). Axone und Dendriten unterscheiden sich jedoch in ihrer biologischen Funktion und in der Expression von Proteinen, was sich auch am Beispiel von L1 und Cortactin zeigen lässt. L1 wird im ZNS auf Axonen exprimiert (Bartsch et al., 1989), obwohl es auch Hinweise auf eine dendritische Lokalisation von L1 gibt (Demyanenko et al., 1999). Darüber hinaus ist L1 in Wachstumskegeln angereichert (Kamiguchi et al., 1998 und 2000) und im Cerebellum der Maus präsynaptisch lokalisiert (Persohn und Schachner, 1989). Persohn und Schachner (1990) konnten L1 im Hippocampus 1, 8 oder 21 Tage alter Mäuse ausschließlich in sich bündelnden Axonen nachweisen. Eine prä- oder postsynaptische Lokalisation von L1 konnten sie nicht beobachten. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Schuster et al. (2001), die in Synapsen des Gyrus dentatus und der CA3-Region adulter Ratten keine L1-Immunreaktivität detektieren konnten. Dagegen gelang es Matsumoto-Miyai et al. (2003) L1 in präsynaptischen Endigungen der CA1-Region nachzuweisen.

Im Unterschied zu L1 ist Cortactin dagegen im adulten Gehirn der Ratte in Regionen mit einer hohen Dichte an Dendriten angereichert. Im Hippocampus ist Cortactin in den dendritischen Dornen konzentriert und lässt sich in postsynaptischen Strukturen nachweisen (Racz und Weinberg, 2004). Ferner wurde bereits gezeigt, dass Cortactin auch in den Wachstumskegeln von kultivierten Ratten-Hippocampusneuronen lokalisiert ist (Du et al., 1998). Zusammenfassend kann man also feststellen, dass L1 überwiegend axonal und präsynaptisch lokalisiert ist, während Cortactin vorwiegend dendritisch und postsynaptisch vorliegt.

Die in dieser Arbeit beobachtete Kolo-kalisation von L1 mit Cortactin in Neuriten und die Anreicherung von Cortactin in den Wachstumskegeln der kultivierten Hippocampusneuronen entspricht nicht der bekannten axonalen Lokalisation von L1 und der überwiegend dendritischen Lokalisation von Cortactin im adulten Gehirn. Aus diesem Grund wurde eine mögliche entwicklungsabhängige Änderung der Proteinlokalisierung von L1 und/oder Cortactin untersucht, indem die Expressionsprofile von L1 und Cortactin in einem 5 Tage alten Hippocampus und einem adulten Hippocampus verglichen wurden (Abb. 10). Die Expressionprofile von L1 und Cortactin im adulten Gehirn stimmen mit den Literaturdaten überein. Während L1 überwiegend in axonreichen Regionen lokalisiert ist (corpus callosum, fimbria hippocampi, alveus), wird Cortactin meist in L1-armen Bereichen nachgewiesen (Molekularschicht des Gyrus dentatus, stratum lucidum von CA3, stratum oriens und stratum radiatum). Interessanterweise ist das stratum lucidum der CA3-Region, in dem die Axone (Moosfasern) der Körnerzellen verlaufen, deutlich Cortactin-positiv, während L1 schwach exprimiert wird (Abb. 10, E, G). Im Hippocampus der 5 Tage alten Maus zeigt sich ein umgekehrtes Bild: Das stratum lucidum ist L1-positiv und von dem anschließenden stratum oriens durch eine dünne cortactinreiche Schicht abgetrennt (Abb. 10, H). In der CA1-Region sind die molekularen Schichten noch nicht entwickelt. Auffällig ist jedoch die deutliche Abtrennung von cortactin- und L1-haltigen Regionen (Abb. 10, F).

Die Expressionsprofile von L1 und Cortactin ändern sich im Hippocampus vom früh postnatalen Stadium (P 5) bis zum adulten Zustand. Diese Änderung entspricht vermutlich vorwiegend der zunehmenden Differenzierung (und Myelinisierung) der neuronalen Zellen, der Entwicklung der molekularen Zellschichten und der Abnahme von Migration,

Neuritogenese und Neuritenwachstum im adulten Hippocampus. Für eine genaue Untersuchung der Cortactinlokalisation müssten, zusätzlich zu einer Wiederholung der beschriebenen Experimente, immunzytochemische Färbungen mit Markern für die dendritischen Plasmamembran oder postsynaptische Strukturen durchgeführt werden. Zusätzlich sollten elektronenmikroskopische Analysen durchgeführt werden. Die in dieser Arbeit angefertigten lichtmikroskopischen Aufnahmen geben jedoch einen Hinweis auf eine entwicklungsabhängige Änderung der Expression von Cortactin. Möglicherweise übt Cortactin, abhängig vom Entwicklungszustand des Hippocampus, verschiedene Funktionen aus. Interessanterweise wurde in Lysaten aus Rattengehirn eine kontinuierliche Abnahme der Cortactinexpression von E 13 (embryonaler Tag 13) bis zum erwachsenen Alter nachgewiesen (Du et al., 1998). Eine entwicklungsabhängige Reduktion der L1- oder Cortactinexpression ließ sich in den immunhistochemischen Doppelfärbungen jedoch nicht feststellen. Auch eine auffällige Kolo-kalisation von L1 oder Cortactin konnte weder im 5 Tage alten noch im adulten Hippocampus gezeigt werden. Lediglich im stratum oriens zeigte sich eine teilweise Überlagerung der jeweiligen Immunreaktivitäten. Inwieweit diese signifikant ist, lässt sich wahrscheinlich nur durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung klären. Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens von Lichtmikroskopen können in Schichten wie stratum oriens oder stratum radiatum, die axon- und dendritenreich sind, nah beieinander liegende Axone und Dendriten nicht durch Immunfluoreszenz unterschieden werden.

Welche Funktionen könnte Cortactin im sich entwickelnden Hippocampus und im adulten Hippocampus ausüben, und welche Rolle könnte L1 dabei spielen? Möglicherweise ist Cortactin während der Entwicklung des ZNS in den Wachstumskegeln auswachsender Axone angereichert, um die schnelle Reorganisation des Actinzytoskeletts zu regulieren (Du et al., 1998). In Homogenaten der Retina aus Huhn wurde eine direkte Interaktion des EphA4-Rezeptors mit Cortactin nachgewiesen (Knöll und Drescher, 2004). Die Autoren schlagen vor, dass eine lokale EphA4- und Src-Kinaseaktivität zu einer Tyrosinphosphorylierung von Cortactin führt, wodurch die Actinpolymerisationsaktivität des Arp2/3-Komplexes reduziert wird. Als Folge würde die Fortbewegung des Wachstumskegels gehemmt. Eine vergleichbare Funktion könnte axonales Cortactin auch im Hippocampus ausüben. Für diese Vermutung spricht, dass Cortactin im stratum

lucidum des adulten Gehirns angereichert ist. In dieser Schicht projizieren die Axone der Körnerzellen des Gyrus dentatus auf Neuronen der CA3-Region. Auch hier könnte der Phosphorylierungszustand von Cortactin die Actinpolymerisation steuern und dadurch das Axonwachstum regulieren. Während der Entwicklung würde L1 durch seine neuritenwachstumfördernde Eigenschaft und die Bündelung von Axonen (Walsh und Doherty, 1997, Burden-Gulley et al., 1997) das Auswachsen der Axone begünstigen, während im adulten Zustand möglicherweise ein cortactinabhängiger Mechanismus das Axonwachstum hemmt.

Verschiedene Publikationen zeigen die Lokalisation von Cortactin in Dendriten (Hering und Sheng, 2003, Racz und Weinberg, 2004). Cortactin könnte in dendritischen Dornen, wiederum durch die Regulation der Actinpolymerisation, eine schnelle Änderung der Morphologie ermöglichen. Es ist bekannt, dass die morphologische Änderung dendritischer Dornen während der Entwicklung des ZNS eine Rolle spielt (Maletic-Savatic et al., 1999). Eine morphologische Anpassung der dendritischen Dornen findet auch infolge der Aktivierung von Glutamat- insbesondere von NMDA-Rezeptoren statt. Dieses Phänomen wird mit synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht (Yuste und Bonhoeffer, 2001, Trachtenberg et al., 2002).

Deshalb könnte der Phosphorylierungszustand von Cortactin einen Einfluss auf die synaptischen Plastizität haben: je nachdem, ob die Actinpolymerisation aktiviert oder inhibiert wird, könnte die Neubildung synaptischer Kontakte gefördert werden oder die mit einer Langzeitpotenzierung einhergehende Stabilisierung synaptischer Kontakte unterstützt werden. Denkbar wäre weiterhin, dass Cortactin die Morphologie dendritischer Dornen als Folge präsynaptischer Aktivität beeinflusst. Bedenkt man, dass die Langzeitpotenzierung in der CA1-Region durch L1-Antikörper reduziert werden konnte (Lüthi et al., 1994), erscheint eine Beteiligung von L1 an der Entstehung und Stabilisierung von Synapsen ebenfalls plausibel. So könnten präsynaptisch lokalisiertes L1 und postsynaptisch lokalisiertes Cortactin, z. B. nach NMDA-Rezeptor-Aktivierung, gemeinsam zur Plastizität hippocampaler Synapsen beitragen.

## 6.2 Die subzelluläre Lokalisation von L1 und Cortactin in L1-stimulierten L929-L1-Fibroblasten und N2A-Zellen

Ein physiologischer Zusammenhang zwischen L1 und Cortactin muss nicht über eine direkte Interaktion beider Proteine vermittelt werden. Auch geringe, räumlich begrenzte Subfraktionen beider Proteine könnten, möglicherweise in Abhängigkeit von einer L1-Aktivierung, miteinander interagieren. Um eine indirekte Interaktion von L1 und Cortactin zu untersuchen, wurden Experimente zur L1-abhängigen Umverteilung von Cortactin (aus dem Zytoplasma heraus an die Zellperipherie) durchgeführt. Die Experimente zu einer L1-induzierten subzellulären Umverteilung von Cortactin wurden an L929-L1-Fibroblasten oder N2A-Zellen durchgeführt. Es konnte jedoch keine Umverteilung von Cortactin aus dem Zytosol heraus an die Zellmembran nachgewiesen werden (Abb. 12 und 13). Die Färbung von intrazellulärem L1 in L929-L1-Zellen war nach 10 min Stimulationszeit sehr viel schwächer als nach 1 h (Abb. 12, A, B). Diese Zunahme kann die Akkumulation von intrazellulärem L1 widerspiegeln, wird aber vermutlich durch die verbesserte Antikörperbindung hervorgerufen.

Nach 1 h Stimulation mit L1-Antikörpern konnte die Endozytose von L1 in L929-L1-Fibroblasten aktiviert werden (Abb. 12, B). Auch die Aktivierung der Endozytose hatte keinen Einfluss auf die Umverteilung von Cortactin aus dem Zytoplasma an die Zellperipherie. Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, da die Endozytose von L1 zum einen mit einer Reorganisation des kortikalen Actinzytoskeletts verbunden ist, und zum anderen eine Beteiligung von Cortactin an der rezeptorvermittelten Endozytose bereits nachgewiesen wurde (Cao et al., 2003 und Lynch et al., 2003).

Eine denkbare Erklärung ist, dass die (mit der endozytischen neuronalen Isoform von L1 transfizierten) Fibroblasten möglicherweise nicht über die für die L1-vermittelte Signaltransduktion erforderlichen Moleküle verfügen, die in Neuroblastomzellen untersucht wurden (Schmid et al., 2000). Weiterhin induziert die L1-Aktivierung möglicherweise keine Umverteilung von L1 aus dem Zytosol an die Zellperipherie, sondern die Verlagerung einer membranständigen L1-Subfraktion in so genannte *lipid rafts* (cholesterinreiche Bereiche der Zellmembran), die in den lichtmikroskopischen Aufnahmen nicht sichtbar wurde. Allerdings ist auch die Kollokalisierung von L1 und

Cortactin in den immunzytochemischen Doppelfärbungen nur in kleinen Bereichen der Zellmembran von L929-L1-Zellen zu sehen (Abb. 12, B, C, E, F). Diese Kolokalisation ist jedoch kein Beweis für eine direkte Interaktion beider Proteine. Die Überlagerung von L1- und Cortactinsignalen könnte eine Folge des begrenzten Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops sein, insbesondere in Bereichen intensiver Färbung. Darüber hinaus kolokalisieren Cortactin und L1 nicht in den L1-haltigen Endosomen im Zellinneren (Abb. 12, E, F). Möglicherweise übt Cortactin einen regulatorischen Einfluss auf die clathrinabhängige Endozytose aus, die direkt an der Zellmembran stattfindet. Zu dieser Theorie passen licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen, die eine Lokalisation von Cortactin in clathrin- und dynaminhaltigen Strukturen an der Zellmembran gezeigt hatten (Cao et al., 2003). Ferner wurde auch die direkte Beteiligung von Cortactin an der clathrinabhängigen und der clathrinunabhängigen Endozytose nachgewiesen (Sauvonnet et al., 2005).

Eine mögliche L1-abhängige Cortactin(um)verteilung wurde auch an Neuroblastom2A-Zellen unter den gleichen Versuchsbedingungen untersucht. In den N2A-Zellen waren Cortactin und L1 deutlich an der Zellmembran kolokalisiert, aber weder die L1-abhängige Endozytose von L1 noch eine subzelluläre Umverteilung von Cortactin konnte induziert werden (13, A, B, E).

Möglicherweise stellen weder die L929-Fibroblasten noch die N2A-Zellen ein geeignetes Modell für die Untersuchung L1-abhängiger Prozesse dar.



### **6.3 Untersuchung einer direkten Interaktion von L1 und Cortactin durch Koimmunpräzipitationen**

L1 und Cortactin waren in Hippocampusneuronen (Abb. 6, E) und an der Zellmembran von N2A-Zellen (Abb. 13, A, B, E) kolokalisiert. In den immunhistochemischen Doppelfärbungen war eine starke Überlagerung beider Proteine im Thalamus zu sehen (Abb. 10, E und F). Deshalb wurde eine direkte Interaktion beider Proteine durch Koimmunpräzipitationen untersucht. Weiterhin lassen Literaturdaten vermuten, dass auch L1 mit Cortactin direkt interagieren könnte. Aus den Lysaten humaner Epithelzellen wurden das Ig-verwandte Transmembranmolekül ICAM und Cortactin nach einer Stimulation von ICAM kopräzipitiert (Tilghman und Hoover, 2002a), und die direkte Bindung von EphA4 (eine Rezeptortyrosinkinase der Ig-Superfamilie) und Cortactin wurde in Triton X-löslichen Homogenaten aus embryonalen Retinaexplantaten nachgewiesen (Knöll und Drescher, 2004).

Für die Koimmunpräzipitationen wurde aus mehreren Gründen das Gesamthirn einer 6 Tage alten Maus verwendet. In diesem frühen Entwicklungsstadium des ZNS finden viele L1-abhängige Prozesse wie Zellwanderung, Neuritenwachstum, Neuritogenese oder Axonbündelung statt, und sowohl L1 als auch Cortactin werden im ZNS stark exprimiert.

Aus verschiedenen Gründen wurde eine direkte Interaktion der intrazellulären Domäne von L1 mit zytoplasmatischem Cortactin an der Zellmembran vermutet. Zum einen ist Cortactin Bestandteil des Actinzytoskeletts, das den Zellkortex unterhalb der Zellmembran bildet. Zum anderen ist L1 vorwiegend in der Zellmembran verankert. Die immunzytochemischen Färbungen hatten keine Überlagerung von Cortactin mit endozytiertem L1 zeigen können (Abb. 12, B, E, F), und in der Literatur ist beschrieben, dass Cortactin in clathrin- und dynaminhaltigen Strukturen zu einem frühen Zeitpunkt der Endozytose an der Zellmembran lokalisiert ist. Um die Membranbestandteile anzureichern, wurde die Triton X-lösliche 100000 x g-Fraktion des Gesamhirns isoliert, die neben den detergendlöslichen Bestandteilen verschiedener zellulärer Membranen auch assoziierte Proteine enthält. Weiterhin wurde auch die Triton X-lösliche 1000 x g-Fraktion präpariert (in der ebenfalls Membranproteine und assoziierte Proteine angereichert sind), da L1 auch in dieser Fraktion nachgewiesen wurde (unveröffentlichte Ergebnisse von G. Loers).

Sowohl in der 100000 x g-Fraktion als auch in der 1000 x g-Fraktion konnten L1 und Cortactin im Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 14 und 15). Zusätzlich wurde eine NCAM-Präzipitation durchgeführt, da NCAM und Cortactin aus den Triton X-löslichen Bestandteilen von  $\beta$ -Tumorzellen des Pankreas kopräzipitiert worden waren (Cavallaro et al., 2001).

Cortactin wurde in der zytosolischen Fraktion (Überstand der 100000 x g Fraktion) nachgewiesen (nicht dargestellt). Darüber hinaus konnte es in der 1000 x g- und der 100000 x g-Fraktion detektiert werden (Abb. 14, B und 15, B). Während NCAM in der 1000 x g-Fraktion nur in geringer Menge enthalten war, war L1 stark angereichert (Abb. 14, A), in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von G. Loers. Da entsprechend wenig NCAM aus der 1000 x g-Fraktion präzipitiert wurde, ist nicht auszuschließen, dass eine mögliche Kopräzipitation mit Cortactin unterhalb der Nachweisgrenze lag. In der 100000 x g-Fraktion war sowohl L1 als auch NCAM angereichert. Eine Kopräzipitation von L1 oder NCAM mit Cortactin konnte weder in der Triton X-löslichen 1000 x g- noch in der Triton X-löslichen 100000 x g-Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 14, B und 15, B).

L1 oder NCAM interagieren in den Triton X-löslichen Membranfraktionen aus dem Gesamthirn der 6 Tage alten Maus nicht direkt mit Cortactin. Dieses Ergebnis schließt nicht aus, dass eine indirekte Interaktion (etwa durch gemeinsame Schlüsselproteine der Signaltransduktion) stattfindet. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass eine direkte Interaktion von Cortactin mit L1 oder NCAM innerhalb eines Multiproteinkomplexes stattfindet, der nicht in intakter Form präzipitiert werden konnte.

Darüber hinaus könnte der Phosphorylierungszustand von Cortactin oder der intrazellulären Domäne von L1 entscheidend für eine direkte Bindung sein. Cortactin wird z. B. als Folge einer Stimulation von ICAM phosphoryliert. ICAM ist ein Ig-verwandtes Transmembranmolekül, das aus fünf Domänen besteht, die eine Homologie zu NCAM aufweisen, wobei die höchste Übereinstimmung in den Domänen 2 und 3 von ICAM vorliegt (Simmons et al., 1988). Nach ICAM-Stimulation präzipitierte ICAM mit Src und phosphoryliertem Cortactin (Durieu-Trautmann et al., 1994, Tilghman und Hoover, 2002a). Die Kopräzipitation von Cortactin mit ICAM war abhängig von der ICAM-Stimulation (Tilghman und Hoover, 2002a). Eine Inhibition der Src-Kinase verhinderte die Phosphorylierung von Cortactin, unterdrückte jedoch nicht die direkte Interaktion

(Tilghman und Hoover, 2002a). Weiterhin kopräzipitierten EphA-Rezeptoren nach Antikörperstimulation aus Lysaten von HEK-Zellen oder aus Retinahomogenaten mit Kinasen der Src-Familie (Knöll und Drescher, 2004). Der Phosphorylierungszustand von Cortactin wurde in diesen Experimenten nicht überprüft. Da Cortactin jedoch ein Src-Substrat ist, ist eine Phosphorylierung in dem Proteinkomplex EphA4/Src/Cortactin sehr wahrscheinlich, analog zu den Ergebnissen der ICAM-Stimulation. Möglicherweise stellt die Rekrutierung von Cortactin an die zytoplasmatische Domäne eines Transmembranmoleküls einen Mechanismus dar, über den Cortactin mit Src interagiert und als Folge durch eine Arp2/3-Inaktivierung das Actinzytoskelett lokal beeinflusst. Da L1 bisher nicht mit Src präzipitiert werden konnte und die intrazelluläre Domäne von L1 keine bekannte Kinase-Aktivität aufweist, ist ein Mechanismus denkbar, in dem Cortactin an der Zellmembran zwar mit Src, jedoch nicht mit L1 interagiert.

Eine weitere Erklärung dafür, dass keine direkte Interaktion nachgewiesen wurde, wäre eine Umverteilung von L1 in detergensunlösliche Bestandteile der Zellmembran (*lipid rafts*) als Folge einer L1-Aktivierung bzw. während eines bestimmten Entwicklungsstadiums. In der Zellmembran sind Proteine und Lipide nicht einheitlich verteilt und bilden räumlich begrenzte Mikrodomänen. Diese Heterogenität wird durch die Anreicherung von Cholesterin und Sphingolipiden in „Flößen“ (*rafts*) verursacht. Auf beiden Seiten der Lipid-Doppelschicht dieser „Flösse“ können spezifische Proteine binden (Simons und Toomre, 2000). *Rafts* sind in kalten nicht-ionischen Detergentien unlöslich und können von den detergenslöslichen Bestandteilen der Zellmembran isoliert werden (Brown und Rose, 1992). Diese detergensresistenten Membranbestandteile (DRM) sind mit GPI-verankerten Molekülen und intrazellulären Signalmolekülen, wie etwa Kinasen der Src-Familie, angereichert (Lisanti et al., 1994). DRM existieren in verschiedenen Zellen und Zellkompartimenten, wie z. B. Wachstumskegeln (He und Meiri, 2002). In diesen Plattformen werden Proteine der Signaltransduktion und andere Komponenten angereichert und sind an der Vermittlung neuronaler Prozesse beteiligt, wie Differenzierung und Überleben (Tansey et al., 2000), Neuritenwachstum (Niethammer et al., 2002), synaptische Transmission (Bruses et al., 2001) oder der Wanderung von Wachstumskegeln (Nakai und Kamiguchi, 2002). Sowohl L1 als auch NCAM, ICAM und Cortactin wurden in DRM nachgewiesen. In den Kleinhirnen von Mäusen wurde eine

entwicklungsabhängige Lokalisation von L1 in DRM untersucht. Während L1 hauptsächlich in den detergenslöslichen Fraktionen angereichert war, konnte in den DRM-Fraktionen 3 - 28 Tage alter Kleinhirne auch eine vergleichsweise geringe Menge von L1 nachgewiesen werden (Nakai und Kamiguchi, 2002). Von NCAM wurden alle drei Isoformen in den DRM in den Vorderhirnen 2 Tage alter Mäuse nachgewiesen, während in der detergenslöslichen Fraktion überwiegend die 140 kDa- und 180 kDa-Isoformen enthalten waren. Die vier Palmitoylierungsstellen von NCAM 140 spielen eine entscheidende Rolle bei der Lokalisation in *rafts* und dem Fyn-vermittelten Neuritenwachstum. Interessanterweise ist auch ICAM in Zell-Lysaten aus humanen Endothelzellen sowohl in der detergenslöslichen Fraktion als auch in DRM enthalten. Eine Antikörperstimulation induziert die Akkumulation von ICAM in der DRM-Fraktion (Tilghman und Hoover, 2002b). In Thrombopoietin-stimulierten Blutplättchen assoziiert Cortactin mit Src- und Src-Kinasen und löst auch hier die Translokation von Cortactin aus der detergenslöslichen in die detergensunlösliche Fraktion aus. In beiden Fraktionen wurde Cortactin als phosphoryliertes Protein nachgewiesen, obwohl der Hauptteil des Gesamtcortactins in der löslichen Fraktion angereichert war. Der Phosphorylierungszustand von Cortactin hatte in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die Umverteilung (Lopez et al., 2001).

Da sowohl L1, NCAM, ICAM als auch Cortactin in den DRM verschiedener Gewebe- oder Zelltypen nachgewiesen wurden, und die Umverteilung von Cortactin von einer extrazellulären Stimulation abhängen könnte, ist eine direkte Interaktion von L1 mit Cortactin in *lipid rafts* nicht auszuschließen. Deshalb müsste eine direkte Bindung in Triton X-unlöslichen Fraktionen aus mehreren Gesamthirnen 6 Tage alter Mäuse mit einer Koimmunpräzipitation überprüft werden.

Auch die Zell-Lysate von L1- oder NCAM-stimulierten N2A-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit einer Koimmunpräzipitation auf eine Interaktion von NCAM oder L1 mit Cortactin untersucht. Für die Experimente wurden die detergenslöslichen Zellbestandteile verwendet, nachdem Kerne und Zelltrümmer entfernt worden waren. Zur Untersuchung der DRM-Fraktion müsste eine sehr viel größere Zellzahl mit Antikörper stimuliert werden. Interessanterweise wurde Cortactin, unabhängig von der Stimulation, in einem Experiment mit NCAM präzipitiert. Da dieses Ergebnis mit der bereits bekannten

Kopräzipitation von NCAM und Cortactin aus  $\beta$ -Tumorzellen übereinstimmte, wurde der Versuch sechsmal wiederholt, doch die direkte Interaktion von NCAM und Cortactin konnte nicht reproduziert werden. In keinem dieser Experimente konnte jedoch eine direkte Interaktion von L1 mit Cortactin nachgewiesen werden.

Für beide Experimente zur Untersuchung der direkten Interaktion von L1 mit Cortactin oder von NCAM mit Cortactin gelten die gleichen Einschränkungen: eine direkte Interaktion kann zum einen gewebe- oder zelltypabhängig sein und findet zum anderen nur nach einem definierten Stimulationszeitraum oder während eines bestimmten Entwicklungszustandes, möglicherweise vermittelt durch die Anreicherung der Proteine in DRM, statt. Die Cortactinbindung ist vielleicht sehr schwach, falls beide Proteine über einen Multiproteinkomplex gekoppelt sind. Da eine Src-Bindung an L1 oder NCAM bisher nicht nachgewiesen wurde, könnte eine direkte Interaktion ausgeschlossen werden, wenn für die Kopplung von Cortactin an L1 oder NCAM zusätzlich eine Src-Bindung notwendig wäre. Da es einige Hinweise auf die Lokalisation von L1 und Cortactin in *lipid rafts* gibt, könnte der Vergleich der Proteinverteilung von L1 und Cortactin in einzelnen Fraktionen von Gehirnhomogenaten verschiedener Entwicklungsstadien Aufschluss über eine Kollokalisierung von L1 und Cortactin geben.

## **6.4 Untersuchungen zum Einfluss der L1-Stimulation auf die Cortactin-Tyrosin-Phosphorylierung an L929-L1-Fibroblasten**

Obwohl in dieser Arbeit keine direkte Interaktion von L1 und Cortactin durch Koimmunpräzipitationen nachgewiesen wurde (siehe 5.2), konnte eine indirekte Interaktion zwischen beiden Proteinen nicht ausgeschlossen werden. Da der L1-vermittelte Signaltransduktionsweg in Neuroblastomzellen von Src abhängig ist (Schmid et al., 2000) und die Cortactin-Tyrosinreste Y421/466/482 von Src phosphoryliert werden (Huang et al., 1998), könnte die L1-Aktivierung die Tyrosinphosphorylierung von Cortactin beeinflussen. Darüber hinaus haben auch ERK und Rac1, zwei weitere Intermediate der L1-Signaltransduktion, einen Einfluss auf die Aktivität von Cortactin. Zum einen wurde ein Mechanismus für die Interaktion von Cortactin und N-WASP vorgeschlagen, der durch die intrazelluläre Bindung der Cortactin-SH3-Domäne an die helikale/prolinreiche Domäne inhibiert wird. Die Serinphosphorylierung von Cortactin durch ERK einerseits und die Phosphorylierung von Cortactin Y421/466/482 durch Src andererseits könnten diesen Prozess regulieren (Martinez-Quiles et al., 2004). Zum anderen wurde eine Beteiligung der GTPase Rac1 an der Src-abhängigen Phosphorylierung der Tyrosinreste Y421 und Y466 von Cortactin nachgewiesen (Head et al., 2003).

Um einen Einfluss von L1 auf die Tyrosinphosphorylierung von Cortactin zu untersuchen, wurden L929-L1-Fibroblasten mit L1-Antikörper stimuliert und die Gesamtzell-Lysate im Immunoblot untersucht. Die Verwendung eines Antikörpers gegen Gesamtphosphotyrosin war für eine reproduzierbare quantitative Analyse des Verhältnisses von Tyrosinphosphoryliertem Cortactin (80/85 kDa) zu Gesamtcortactin nicht geeignet. Der Antikörper verursachte einen starken unspezifischen Hintergrund. Daher konnte die Analyse von Phosphotyrosin Signalintensitäten schwacher und starker Signale nebeneinander mit dem Programm TINA 2.0 (Raytest) nicht zuverlässig durchgeführt werden. Weiterhin konnte das Programm nicht optimal verwendet werden, da 80/85 kDa-Phosphocortactin und phosphorylierte Proteine mit geringfügig abweichenden Molekulargewichten durch die Gelelektrophorese nicht ausreichend getrennt wurden, um die Signalintensitäten zuverlässig zu erfassen.

Um diese methodischen Schwierigkeiten zu überwinden, wurde zum einen ein Antikörper verwendet, der spezifisch gegen den phosphorylierten Tyrosinrest Y421 von Cortactin gerichtet war (Head et al., 2003). Zum anderen wurde Cortactin durch eine Immunpräzipitation von Proteinen ähnlichen Molekulargewichtes abgetrennt. In einem ersten Experiment wurde Cortactin aus dem Gesamtzell-Lysat L1-stimulierter Zellen präzipitiert und sowohl das am Tyrosinrest 421 phosphorylierte Cortactin (Cortactin-P-Y421) als auch Gesamtcortactin mittels Immunoblot detektiert (Abb.17, A und B). Die Signalintensitäten wurden analysiert und das prozentuale Verhältnis von Cortactin-P-Y421 und Gesamtcortactin ermittelt (Abb. 17, C). Eine Zunahme der Cortactin-Y421-Phosphorylierung infolge der L1-Stimulation von L929-L1-Fibroblasten konnte im Vergleich zu nicht stimulierten L929-L1-Fibroblasten und stimulierten wt-Zellen nicht nachgewiesen werden. Da der prozentuale Anteil von Cortactin-P-Y421 in L1-stimulierten L929-L1-Zellen geringer als die Werte der verwendeten Kontrollen war, kann ein inhibitorischer Effekt nicht ausgeschlossen werden. Eine Reduktion der Cortactin-Y421-Phosphorylierung infolge der L1-Stimulation könnte im Zusammenhang mit dem von Martinez-Quiles (2004) vorgeschlagenen ERK- und Src-abhängigen Regulationsmechanismus erklärt werden (siehe 1.3). Die ERK-Aktivierung ist ein Bestandteil der L1-stimulierten Signaltransduktion (Schmid et al., 2000) und könnte einen inhibitorischen Effekt auf die Src-abhängige CortactinY421-Phosphorylierung ausüben.

Das Ergebnis dieses Experimentes konnte nicht reproduziert werden, da mit dem Cortactin-P-Y421-Antikörper in weiteren Experimenten kein Signal mehr detektiert werden konnte. Der Antikörper verursachte einen starken unspezifischen Hintergrund, so dass geringe Mengen an Cortactin-P-Y421 möglicherweise nicht nachgewiesen werden konnten. Da die Versuchsbedingungen nicht geändert worden waren, hatte der (von Scott Weed zur Verfügung gestellte) Antikörper vermutlich trotz sachgemäßer Lagerung innerhalb eines kurzen Zeitraumes einen deutlichen Qualitätsverlust erlitten. Die Experimente zur Cortactinphosphorylierung wurden daraufhin eingestellt.

## **6.5 Der Einfluss von Cortactin auf das L1- oder NCAM-abhängige Neuritenwachstum, die Neuritogenese oder die Neuritenzahl**

Da sowohl L1 als auch Cortactin an Prozessen beteiligt sind, die das Neuritenwachstum beeinflussen, wurden für die Untersuchung des L1-abhängigen Neuritenwachstums verschiedene EGFP-Cortactinkonstrukte kloniert, mit denen der Einfluss der Cortactindomänen auf das Neuritenwachstum untersucht wurde. Da auch eine direkte Interaktion von NCAM und Cortactin nachgewiesen werden konnte (Cavallaro et al., 2001), wurde zusätzlich das NCAM-abhängige Neuritenwachstum untersucht. Die verwendeten Vektoren kodieren für N-terminal EGFP-fusioniertes Cortactin oder Cortactinmutanten, da das EGFP-Protein für die Identifikation transient transfizierter Hippocampusneuronen unter dem Lichtmikroskop benötigt wurde. Die N-terminale Kopplung soll einen sterischen Einfluss von EGFP auf die C-terminalen Domänen von Cortactin ausschließen. Da die Cortactintyrosinreste Y421/466/482 von Src phosphoryliert werden und einen regulatorischen Einfluss auf die Zellmobilität ausüben (Huang et al., 1998, Liu et al., 1999), wurde Cortactin mit Mutationen in den Src-Bindungsstellen (CortactinF421/466/482) für die Untersuchung des L1-abhängigen Neuritenwachstums eingesetzt. Die SH3-Domäne von Cortactin besitzt Bindungsstellen für PDZ-Proteine und Dynamin. Dynamin spielt eine wichtige Rolle bei der Endozytose (Schafer et al., 2004), interagiert mit Proteinen der postsynaptischen Dichte (Okamoto et al., 2001), beeinflusst die Bildung von Lamellipodia (Schlunck et al., 2004) oder die cortactinvermittelte Regulation der Zellform (McNiven et al., 2000). Das cortactinbindende Protein (CortBP1) und Cortactin interagieren über die SH3-Domäne und sind in den Wachstumskegeln kultivierter Neuronen lokalisiert (Du et al., 1998). Um zu überprüfen, ob die Cortactin über die SH3-Domäne einen Einfluss auf das Neuritenwachstum ausübt, wurde ein Cortactin-konstrukt mit deletierter SH3-Domäne für die Experimente kloniert. Für die Untersuchung des Neuritenwachstums wurde zusätzlich als Kontrolle und zur Überprüfung des Effektes der Cortactinüberexpression (die z. B. einen verstärkenden Effekt auf die Zellmobilität ausübt) mit wildtypischem Cortactin transfiziert.



Für die Substratbeschichtungen wurden die löslichen Proteine L1-Fc, NCAM-Fc oder Laminin verwendet, die über verschiedene Mechanismen das Neuritenwachstum fördern, und als Kontrolle das nichtphysiologische Substrat PLL, auf dem es lediglich zu einem geringen Neuritenwachstum kommt (Lahrtz et al., 1987, Sanes, 1989, Webb et al., 2001).

Da für die Auswertung des Neuritenwachstums eine hohe Transfektionseffizienz benötigt wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ein Experiment mit einer ausreichenden Zahl transfizierter Zellen ausgewertet werden (Abb. 21). Da jedoch signifikante Unterschiede des Neuritenwachstums auf NCAM-Beschichtung gemessen wurden, und die PLL-Kontrolle keinerlei wachstumsfördernden Effekt ausübte, aber die L1-Beschichtung das Neuritenwachstum am stärksten förderte, ist eine Reproduktion des Ergebnisses mit einer hohen Zahl auswertbarer Zellen sehr wahrscheinlich. Das NCAM-abhängige Neuritenwachstum wird von Cortactin $\Delta$ SH3 im Vergleich zu CortactinF421/466/482 und der EGFP-Kontrolle signifikant inhibiert ( $p < 0,05$ ). Ob auch CortactinF421/466/482 das NCAM-abhängige Neuritenwachstum reduziert, muss in zusätzlichen Experimenten überprüft werden.

Eine Beteiligung von Cortactin am NCAM-abhängigen Neuritenwachstum könnte ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion in *lipid rafts* sein, da für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum eine Lokalisation von NCAM 140 in DRM notwendig ist (Niethammer et al., 2002). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung von NCAM eine neuritenwachstumsvermittelnde Umverteilung eines NCAM- $\beta$ 1Spektrin-PKC $\beta$ <sub>2</sub>-Komplexes in *lipid rafts* verursachte (Leshchyn'ska et al., 2003). Die Theorie einer ausschließlichen Interaktion von NCAM und Cortactin in DRM deckt sich mit dem Ergebnis, dass Cortactin und NCAM in detergenslöslichen Membranbestandteilen keine direkte Bindung eingehen. Da Spektrin ein Bestandteil des Actinzytoskeletts ist, könnte der NCAM- $\beta$ 1Spektrin-PKC $\beta$ <sub>2</sub>-Komplex das Bindeglied zwischen extrazellulärer Aktivierung und der cortactinvermittelten Reorganisation des Actinzytoskeletts darstellen. Dieser Effekt wird möglicherweise durch die Phosphorylierung von Cortactin reguliert und könnte eine Beteiligung der Src-Bindungsstelle am NCAM-abhängigen Neuritenwachstum erklären.

Der Vergleich der mittleren Neuritenlängen auf L1-Beschichtung zeigt, dass Cortactin $\Delta$ SH3 und CortactinF421/466/482 wahrscheinlich auch das L1-abhängige

Neuritenwachstum inhibieren. Diese Beobachtung bedarf aber noch der Bestätigung durch weitere Experimente. Möglicherweise ist eine indirekte Interaktion von L1 und Cortactin regulatorischer Natur und beeinflusst während der Entwicklung in bestimmten Bereichen des Gehirns das Neuritenwachstum.

Für die Auswertung der Neuritenzahlen und der Neuritogenese gelten weniger einschränkende Bedingungen als für das Neuritenwachstum. Deshalb konnte zusätzlich ein zweites Experiment mit deutlich niedrigerer Transfektionseffizienz als beim ersten Experiment ausgewertet werden. In den Experimenten wurde kein signifikanter Einfluss von Cortactin auf die Neuritogenese festgestellt (Abb. 22). Da beide durchgeführten Experimente jedoch in den Tendenzen übereinstimmten, dass eine Cortactin-überexpression die lamininabhängige Neuritogenese inhibiert und Cortactin $\Delta$ SH3 oder CortactinF421/466/482 die Neubildung von Neuriten auf NCAM reduziert, könnten kleine signifikante Unterschiede durch weitere Experimente mit einer hohen Zahl auswertbarer Zellen besser erfasst werden. Weil auch die cortactinabhängige Neuritogenese auf NCAM über einen *lipid raft*-vermittelten Mechanismus verlaufen könnte, ist ein signifikanter Einfluss von Cortactin $\Delta$ SH3 oder auch Cortactin-F421/466/421 auf die Neuritogenese vorstellbar.

Cortactin beeinflusst, in Kooperation mit Fyn, integrinvermittelte Prozesse (Huang et al., 2003). Somit könnte auch ein inhibitorischer Effekt der Cortactinüberexpression auf Laminin, das das Neuritenwachstum über einen integrinabhängigen Mechanismus fördert, für weitere Untersuchungen von Interesse sein.

In beiden ausgewerteten Experimenten wurde kein Einfluss von Cortactin auf die Neuritenzahl pro Zelle festgestellt. Da sowohl die Neuritenzahlen auf L1-Beschichtung (Abb. 23) erhöht waren, als auch die Neuritenlängen auf L1-Beschichtung deutlich größer waren als auf den Vergleichsbeschichtungen (Abb. 21), könnte ein Zusammenhang zwischen der Länge auswachsender Neuriten und der Zahl von Neuriten bestehen.

## 7 Zusammenfassung

GFAP-L1-Mäuse exprimieren das neurale Zellerkennungsmolekül L1 ektopisch in Astrozyten. Eine semiquantitative Analyse der Genexpression in Hippocampi dieser transgenen Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren hatte gezeigt, dass diese deutlich geringere Mengen des Proteins Cortactin exprimieren. Cortactin ist mit Actinfilamenten assoziiert und an Prozessen beteiligt, die eine Reorganisation des Actinzytoskeletts erfordern.

Um den physiologischen Zusammenhang zwischen L1 und Cortactin zu untersuchen, wurde die Lokalisation beider Proteine in Primärkulturen von Hippocampusneuronen untersucht und in Gewebeschnitten 5 Tage alter und adulter Hippocampi der Maus verglichen. In Primärkulturen von Hippocampusneuronen sind Cortactin und L1 entlang der Neuriten kolokalisiert, und Cortactin ist in den Wachstumskegeln angereichert. Betrachtet man die Expression von Cortactin im Hippocampus, so zeigen sich entwicklungsabhängige Veränderungen: im adulten Tier wurde neben der Lokalisation in dendritischen Bereichen auch eine Lokalisation im stratum lucidum der CA3-Region, einer axonreichen Schicht, gezeigt. In dieser Schicht wurde im 5 Tage alten Hippocampus kein Cortactin exprimiert. Möglicherweise übt Cortactin in den Axonen oder Dendriten des Hippocampus verschiedene Funktionen aus, die von L1 reguliert werden.

Frühere Studien zeigen, dass extrazelluläre Stimuli eine Umverteilung von Cortactin an die Zellperipherie auslösen können. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob auch die Antikörperstimulation von L1 eine solche Umverteilung verursacht. Zwar führte die Stimulation, wie erwartet, zur Endozytose von L1. Eine Umverteilung von Cortactin in den Zellcortex oder eine Kolokalisation von Cortactin mit endozytiertem L1 konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Ferner schien aufgrund der beobachteten Kolokalisation von L1 und Cortactin in hippocampalen Neuronen eine direkte Interaktion beider Proteine möglich. Um dies zu überprüfen, wurden L1-Immünpräzipitationen aus den detergenslöslichen Membranfraktionen aus dem Gehirnhomogenat einer 6 Tage alten Maus durchgeführt.

Eine Kopräzipitation von Cortactin war jedoch nicht zu beobachten. In einer früheren Untersuchung wurde gezeigt, dass die Interaktion von Cortactin mit dem Adhäsionsmolekül ICAM erst durch ICAM-Stimulation ausgelöst wird. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob es in L1-stimulierten N2A-Zellen zu einer Interaktion von L1 und Cortactin kommt. Aus den entsprechenden Zell-Lysaten ließen sich L1 und Cortactin jedoch nicht kopräzipitieren.

Eine Beteiligung von Cortactin an L1-vermittelten Vorgängen setzt nicht unbedingt eine direkte Interaktion der beiden Proteine voraus. Auch eine Interaktion von Cortactin mit Komponenten des L1-stimulierten intrazellulären Signalwegs ist möglich. Die Förderung von Neuritenwachstum und Neuritogenese zählt zu den am besten etablierten biologischen Funktionen von L1. Daher wurde, um die Beteiligung von Cortactin an L1-abhängigen biologischen Prozessen zu klären, das Neuritenwachstum sowie die Neuritogenese hippocampaler Neuronen bei Überexpression wildtypischen und mutierten Cortactins untersucht. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten deuten auf eine Beeinflussung des L1-vermittelten Neuritenwachstums durch Cortactin hin. Auch das Neuritenwachstum und die Neuritogenese von NCAM werden möglicherweise durch Cortactin beeinflusst.

Diese Arbeit liefert keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion zwischen L1 und Cortactin. Dagegen deuten die Ergebnisse der funktionalen Experimente darauf hin, dass Cortactin am L1- und NCAM-abhängigen Neuritenwachstum sowie der Neuritogenese beteiligt sein könnte. Sowohl die Entstehung als auch das Wachstum von Neuriten erfordern eine Reorganisation des Actinzytoskeletts, so dass die Beteiligung von Cortactin an diesen Prozessen plausibel erscheint.

## 7 Summary

GFAP-L1 mice express the neural cell adhesion molecule L1 ectopically in astrocytes. A semiquantitative analysis of gene expression in the hippocampus of these transgenic mice revealed a significantly lower expression of the protein cortactin when compared to wild type mice. Cortactin is associated with actin filaments and involved in processes which require reorganization of the actin cytoskeleton.

To investigate the potential physiologic interactions between L1 and cortactin, the localization of these proteins was analyzed in primary cultures of hippocampal neurons and tissue sections of the hippocampus of 5-day-old and adult mice.

In primary cultures of hippocampal neurons, cortactin and L1 colocalize along neurites, and cortactin is enriched in growth cones. When looking at cortactin expression in hippocampus, developmental changes could be observed: in adult animals, apart from the localization in dendrites, localization could be shown in the stratum lucidum of the CA3 field, an axon-rich layer, while no expression of cortactin was seen in the respective layer of 5 day old mice. Possibly, cortactin mediates different functions in axons and dendrites of the hippocampus, which might be regulated by L1.

Previous studies had shown that extracellular stimuli can trigger a redistribution of cortactin to the cell periphery. For this reason, within the scope of this thesis, it was investigated whether stimulation by L1 antibodies leads to a similar redistribution. As expected, antibody triggering caused L1 endocytosis. However, neither a redistribution of cortactin to the cell cortex nor a colocalization of cortactin with endocytosed L1 could be observed.

Moreover, due to the colocalization of L1 and cortactin in hippocampal neurons, a direct interaction of the two proteins was hypothesized. In order to investigate this point, L1 was immunoprecipitated from detergent-soluble membrane fractions of brain homogenate of 6-day-old mice. No coprecipitation of cortactin could be observed under these conditions. In a previous study, it had been demonstrated that the interaction of cortactin with the adhesion molecule ICAM required ICAM stimulation. Therefore, in this thesis, N2A cells

were stimulated with L1 antibodies, and cell lysates were submitted to L1 immunoprecipitation. Even in this case, cortactin could not be detected in the precipitate.

A participation of cortactin in L1-mediated processes does not require a direct interaction of the two proteins. Cortactin might also interact with components of the L1-stimulated intracellular signalling cascade. Promotion of both neurite outgrowth and neuritogenesis are among the best-established biological functions of L1. Thus, in order to elucidate the function of cortactin in L1-mediated biological processes, neurite outgrowth and neuritogenesis were analyzed in hippocampal neurons overexpressing wild-type and mutated cortactin. The data acquired in this thesis point at an influence of cortactin on L1-mediated neurite outgrowth. Furthermore, the effects of NCAM on neurite outgrowth and neuritogenesis might be influenced by cortactin.

This thesis does not provide an indication of a direct interaction between L1 and cortactin. However, based on the results of the functional experiments, a participation of cortactin in L1-mediated and NCAM-mediated neurite outgrowth and neuritogenesis seems possible. Both neurite formation and neurite growth require a reorganization of the actin cytoskeleton: thus, an involvement of cortactin in these processes would be in line with its established biological functions.

## 8 Literaturverzeichnis

Appel F., Holm J., Conscience F. J., Schachner M. (1993). Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in neurite outgrowth and cell body adhesion. *J Neurosci* 13, 4764-4775.

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

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

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, 2667-2675.

Bennett V., Chen L. (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 13, 61-67.

Bieber A. J., Snow P. M., Hortsch M., Patel N. H., Jacobs J. R., Traquina Z. R., Schilling J., Goodman C. S. (1989). Drosophila neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* 59, 447-460.

Birukov K. G., Birukova A. A., Dudek S. M., Verin A. D., Crow M. T., Zhan X., DePaola N., Garcia J. G. (2002). Shear stress-mediated cytoskeletal remodeling and cortactin translocation in pulmonary endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 453-464.

Bormann U. (2001). *Yeast two-hybrid Systeme zur Identifikation zytoplasmatischer Interaktionspartner der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle MAG, P0 und NCAM*, Dissertation (Universität Hamburg).

Bowden E. T., Barth M., Thomas D., Glaser R. I., Mueller S. C. (1999). An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC $\mu$  associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene* 18, 4440-4449.

- Brewer G. J., Toricelli J. R., Evege E. R., Price P. J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free combination. *J Neurosci Res* 35, 567-576.
- Brittis P. A., Silver J., Walsh F. S., Doherty P. (1996). Fibroblast growth factor receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina. *Mol Cell Neurosci* 8, 120-128.
- Brown D. A., Rose J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Brümmendorf T., Hubert M., Treubert U., Leuschner R., Tarnok A., Rathjen F.G. (1993). The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10, 711-727.
- Brümmendorf T., Kenwrick S., Rathjen F. G. (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr Opin Neurobiol* 8, 87-97.
- Brümmendorf T., Rathjen F. G. (1993). Axonal glycoproteins with immunoglobulin- and fibronectin type III- related domains in vertebrates: structural features, binding activities, and signal transduction. *J Neurochem* 61, 1207-1219.
- Brümmendorf T., Rathjen F. G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr Opin Neurobiol* 6, 584-593.
- Bruses J. L., Chauvet N., Rutishauser U. (2001). Membrane lipid rafts are necessary for the maintenance of the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor in somatic spines of ciliary neurons. *J Neurosci* 21, 504–512.
- Burden-Gulley S. M., Pendergast M., Lemmon V. (1997). The role of cell adhesion molecule L1 in axonal extension, growth cone motility, and signal transduction. *Cell Tissue Res* 290, 415-422.
- Cantarelli V. V., Takahashi A., Akeda Y., Nagayama K., Honda T. (2000). Interaction of enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia Coli* with HeLa cells results in translocation of cortactin to the bacterial adherence site. *Infect Immun* 68, 382-386.



- Cao H., Orth J. D., Chen J., Weller S. G., Heuser J. E., McNiven M. A. (2003). Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* 23, 2162-2170.
- Cavallaro U., Niedermeyer J., Fuxa M., Christophori G. (2001). N-CAM modulates tumor-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nature Cell Biol* 3, 650-657.
- Cunningham B. A., Hemperly J. J., Murray B. A., Prediger E. A., Brackenbury R., Edelman G. M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 15, 799-806.
- Da Silva J. S., Dotti C. G. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis (2002). *Nat Rev Neurosci* 3, 694-704.
- Dahlin-Huppe K., Berglund E. O., Ranscht B., Stallcup W. B. (1997). Mutational analysis of the L1 neuronal cell adhesion molecule identifies membrane-proximal amino acids of the cytoplasmic domain that are required for cytoskeletal anchorage. *Mol Cell Neurosci* 9, 144-156.
- Davis J. Q., Bennett V. (1993). Ankyrin-binding activity of nervous system cell adhesion molecules expressed in adult brain. *J Cell Sci Suppl* 17, 109-117.
- Davis J. Q., Bennett V. (1994). Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J Biol Chem* 269, 27163-27166.
- DeBernardo A. P., Chang S. (1996). Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J Cell Biol* 133, 657-666.
- Demyanenko G. P., Tsai A. Y., Maness P. F. (1999). Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development, and the ventricular system of L1 knockout mice. *J Neurosci* 19, 4907-4920.
- Di Ciano C., Nie Z., Szaszi K, Lewis A., Uruno T., Zhan X., Rotstein O. D., Mak A., Kapus A. (2002). Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C850-C865.

Dickson T. C., Mintz C. D., Benson D. L., Salton S. R. J. (2002). Functional binding interaction identified between the axonal CAM L1 and members of the ERM family. *J Cell Biol* 157, 1105-1112.

Doherty P., Smith P., Walsh F. S. (1996). Shared cell adhesion molecule (CAM) homology domains point to CAMs signalling via FGF receptors. *Perspect Dev Neurobiol* 4, 157-168.

Doherty P., Walsh F. S. (1996). CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 8, 99-111.

Du Y., Weed S. A., Xiong W. C., Marshall T. D., Parsons J. T. (1998). Identification of a novel Cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol* 18, 5838-5851.

Durieu-Trautmann O., Chaverot M., Cazaubon S., Strosberg A. D., Courad P.-O. (1994). Intercellular Adhesion Molecule 1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem* 269, 12536-12540.

Edelman G., (1986). Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 54, 135-169.

Fischer G., Künemund V., Schachner M. (1986). Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J Neurosci* 6, 605-612.

Fransen E., Lemmon V., Van Camp G., Vits L., Coucke P., Willems P. J. (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.

Friedlander D. R., Milev P., Karthikeyan L., Margolis R. K., Margolis R. U., 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.

Garner C. G., Zhai R. G., Gundelfinger E. D., Ziv E. D. (2002). Molecular mechanism of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 25, 243-251.

- Garver T. D., 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.
- 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.
- Gil O. D., Sakurai T., Bradley A. E., Fink M. Y., Casella M. R., Kuo J. A., Felsenfeld D. P. (2003). Ankyrin binding mediates L1CAM interactions by static components of the cytoskeleton and inhibits retrograde movement of L1CAM on the cell surface. *J Cell Biol* 162, 719-730.
- Goodman C. S., Shatz C. J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell Suppl* 72, 77-98.
- Gordon-Weeks P. R., Fischer I. (2000). MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc Res Tech* 48, 63-74.
- Gould E., Gross C. G. (2002). Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* 22, 619-623.
- Grumet M., Friedlander D. R., Edelman G. M. (1993). Evidence for the binding of Ng-CAM to laminin. *Cell Adhes Commun* 1, 177-190.
- Grumet M., Mauro V., Burgoon M. P., Edelman G. M., Cunningham B. A. (1991). Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J Cell Biol* 113, 1399-1412.
- Grumet M., Sakurai T. (1996). Heterophilic interactions of the neural cell adhesion molecules Ng-CAM and Nr-CAM with neural receptors and extracellular matrix proteins. *Seminars Neurosci* 8, 379-389.
- 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.

- He Q., Meiri K. F. (2002). Isolation and characterization of detergent-resistant microdomains responsive to NCAM-mediated signaling from growth cones. *Mol Cell Neurosci* *19*, 18–31.
- Head J. A., Jiang D., Li M., Zorn L. J., Schaefer E. M., Parsons J. T., Weed S. A. (2003). Cortactin tyrosine phosphorylation requires Rac1 activity and association with the cortical actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* *14*, 3216-3229.
- Hering H., Sheng M. (2003). Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* *23*, 11759-11769.
- Higgs H. N., Pollard T. D. (2001). Regulation of actin filament network formation through ARP2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* *70*, 649-676.
- Holm J., Hillenbrand R., Steuber V., Bartsch U., Moos M., Lübbert 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.
- Horstkorte R., Schachner M., Magyar J. P., Vorherr T., Schmitz B. (1993). The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J Cell Biol* *121*, 1409-1421.
- 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.
- Hortsch M., Homer D., Malhotra J. D., Chang S., Frankel J., Jefford G., Dubreuil R. R. (1998). Structural requirements for outside-in and inside-out signaling by *Drosophila* neuroglian, a member of the L1 family of cell adhesion molecules. *J Cell Biol* *142*, 251-261.

- Huang C., Ni Y., Wang T., Haudenschild C. C., Zhan X. (1997). Down-regulation of the filamentous actin crosslinking-activity by src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 13911-13915.
- Huang J., Asawa T., Takato T., Sakai R. (2003). Cooperative roles of fyn and cortactin in cell migration and metastatic murine melanoma. *J Biol Chem* 278, 48367-48376.
- Huang Y., Jellies J., Johansen K. M., Johansen J. (1997). Differential glycosylation of tractin and LeechCAM, two novel Ig superfamily members, regulates neurite extension and fascicle formation. *J Cell Biol* 138, 143-157.
- Huang Y., Liu J., Haudenschild C. C., Zhan X. (1998). The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells. *J Biol Chem* 273, 25770-25776.
- Huber O., Bierkamp C., Kemler R. (1996). Cadherins and catenins in development. *Curr Opin Cell Biol* 8, 685-691.
- Hynes R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 6, 11-25.
- Ignelzi M. A., Jr., Miller D. R., Soriano P., Maness P. F. (1994) Impaired neurite outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12, 873-884.
- Itoh K., Ozaki M., Stevens B., Fields R. D. (1997). Activity-dependent regulation of N-cadherin in DRG neurons: differential regulation of N-cadherin, NCAM, and L1 by distinct patterns of action potentials. *J Neurobiol* 20, 735-748.
- Itoh K., Stevens B., Schachner M., Fields R. D. (1995) Regulated expression of the neural cell adhesion molecule L1 by specific patterns of neural impulses. *Science* 24, 1369-1372.
- Jucker M., D'Amanto G., Mondadori C., Mohajeri H., Magyar J., Bartsch U. (1996). Expression of the neural cell adhesion molecule L1 in the deaffected dentate gyrus. *Neuroscience* 75, 703-715.
- Kadmon G., Kowitz A., Altevogt P., Schachner M. (1990). The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 110, 193-208.

Kadmon G., von Bohlen und Hallbach F., Horstkorte R., Eckert M., Altevogt P., Schachner M. (1995). Evidence for cis interaction and cooperative signalling by the heat-stable antigen nectadrin (murine CD24) and the cell adhesion molecule L1 in neurons. *Eur J Neurosci* 7, 993-1004.

Kaksonen M., Peng H. B., Rauvala H. (2000). Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J Cell Sci* 113, 4421-4426.

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., Lemmon V. (2000a). IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Curr Opin Cell Biol* 12, 598-605.

Kamiguchi H., Lemmon V. (2000b). Recycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *J Neurosci* 20, 3676-3686.

Kamiguchi H., Long K. E., Pendergast M., Schaefer A. W., 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.

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.

Kater S. B., Rehder V. (1995). The sensory-motor role of growth cone filopodia. *Curr Opin Neurobiol* 5, 68-74.

Kemler R., Ozawa M. (1989). Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a  $Ca^{2+}$ -dependent cell adhesion molecule. *Bioessays* 11, 88-91.

Kenwrick S., Watkins A., Angelis E. D. (2000). Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum Mol Genet* 9, 879-886.

Kim B. J., Jung Y. K. (2002). Calpeptin suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced death and accumulation of p53 in L929 mouse sarcoma cells. *Apoptosis* 7, 313-319.

- Kinnunen T., Kaksonen M., Saarinen J., Kalkkinen N., Peng H. B., Rauvala H. (1998). Cortactin-src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. *J Biol Chem* 273, 10702-10708.
- Klann E., Dever T. E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 931-42.
- Knöll B., Drescher U. (2004). Src family kinases are involved in EphA receptor-mediated retinal axon guidance. *J Neurosci* 24, 6248–6257.
- Kolkova K., Novitskaya V., Pedersen N., Berezin V., Bock E. (2000). Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 20, 2238-2246.
- Kristiansen L. V., Marques F. A., Soroka V., Rønn L. C., Kiselyov V., Pedersen N., Berezin V., Bock E. (1999). Homophilic NCAM interactions interfere with L1 stimulated neurite outgrowth. *FEBS Lett* 464, 30-34.
- Kuhn T. B., Stoeckli E. T., Condrau M. A., Rathjen F. G., Sonderegger P. (1991). Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1 (G4). *J Cell Biol* 115, 1113-1126.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagarkowa M. A., Boitchenko V. E., Mescheryakov A. A., Kashkarova U. A., Nedospasov S. A. (2000). Human cortactin as putative cancer antigen. *Oncogene* 19, 5204-5207.
- Lahrtz F., Horstkorte R., Cremer H., Schachner M., Montag D. (1997). VASE-encoded peptide modifies NCAM- and L1-mediated neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 50, 62-68.
- Leshchyn'ska I., Sytnyk V., Morrow J. S., Schachner M. (2003). Neural cell adhesion molecule (NCAM) association with PKC $\beta_2$  via  $\beta$ I spectrin is implicated in NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 3, 625-629.
- Letourneau P. C., Shattuck T. A. (1989). Distribution and possible interactions of actin-associated proteins and cell adhesion molecules of nerve growth cones. *Development* 105, 505-519.

- Li Y., Liu J., Zhan X. (2000). Tyrosine phosphorylation of cortactin is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated injury of human endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 37187-37193.
- Li Y., Tondravi M., Liu J., Smith E., Haudenschild C. C., Kaczmarek M., Zhan X. (2001). Cortactin promotes bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 61, 6906-6911.
- Lindner J., Rathjen F. G., Schachner M. (1983). L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305, 427-430.
- Lisanti M. P., Scherer P. E., Vidugiriene J., Tang Z., Hermanowski-Vosatka A., Tu Y. H., Cook R. F., Sargiacomo M. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* 126, 111-126.
- Liu J., Huang C., Zhan X. (1999). Src is required for cell migration and shape changes induced by fibroblast growth factor 1. *Oncogene* 18, 6700-6706.
- Lochter A., Vaughan L., Kaplony A., Prochiantz A., Schachner M., Faissner A. (1991). J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J Cell Biol* 113, 1159-1171.
- Lom B., Hopker V., McFarlane S., Bixby J. L., Holt C. E. (1998). Fibroblast growth factor receptor signaling in *Xenopus* retinal axon extension. *J Neurobiol* 37, 633-641.
- Long K. E., Asou H., Snider M. D., Lemmon V. (2001). The role of endocytosis in regulating L1-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 276, 1285-1290.
- Lopez I. Duprez V., Melle J., Dreyfus F., Levy-Toledano S., Fontenay-Roupie M. (2001). Thrombopoietin stimulates cortactin translocation to the cytoskeleton independently of tyrosine phosphorylation. *Biochem J* 356, 875-881.
- Lüthi A. Mohajeri H., Schachner M., Laurent J. P. (1996). Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *J Neurosci Res* 46, 1-6.
- Lüthi A., Laurent J. P., Figurov A., Müller D., Schachner M. (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372, 777-779.



Lynch D. K., Winata S. C., Lyons R. J., Hughes W. E., Lehrbach G. M., Wasinger V., Cothals G., Cordwell S., Daly R. J. (2003). A cortactin-CDC2-associated Protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278, 21805-21813.

Maletic-Savatic M., Malinow R., Svoboda K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923-1927.

Malhotra J. D., Tsiotra P., Karagogeos D., Hortsch M. (1998). Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. *J Biol Chem* 273, 33354-33359.

Martinez M. C., Ochiishi T., Majewski M., Kosik K. S. (2003). Dual regulation of neuronal morphogenesis by a  $\delta$ -catenin-cortactin complex and Rho. *J Cell Biol* 162, 99-111.

Martinez-Quiles N., Ho H.-Y. H., Kirschner M. W., Ramesh N., Geha R. S. (2004). Erk/Src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate N-WASP. *Mol Cell Biol* 24, 5269-5280.

Martini R. und Schachner M. (1988). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, NCAM, and myelin associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106, 1735-1746.

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.

McNiven M. A., Kim L., Krueger E. W., Orth J. D., Cao H., Wong T.W. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol* 151, 187-198.

Mechtersheimer S., Gutwein P., Agmon-Levin N., Stoeck A., Oleszewski M., Riedle S., 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, 661-674.

Meiri K. F., Saffell J. L., Walsh F. S., Doherty P. (1998). Neurite outgrowth stimulated by neural cell adhesion molecules requires growth-associated protein-43 (GAP-43) function

and is associated with GAP-43 phosphorylation in growth cones. *J Neurosci* 18, 10429-10437.

Migliarese M. R., Mannion-Henderson J., Wu H., Parsons J. T., Bender T. P. (1994). The protein tyrosine kinase substrate cortactin is differentially expressed in murine B lymphoid tumors. *Oncogene* 7, 1989-1997.

Mizutani K., Miki H., He H., Maruta H., Takenawa T. (2002). Essential role of neural Wiscott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res* 62, 669-674.

Mohajeri M. H., Bartsch U., Van der Putten H., Sansig G., Mucke L., Schachner M. (1996). Neurite outgrowth on non-permissive substrates is enhanced by ectopic expression of the neural adhesion molecule L1 by mouse astrocytes. *Eur J Neurosci* 8, 1085-1097.

Montgomery A. M., Becker J. C., Siu C. H., Lemmon V. P., Cheresch D. A., Pancook J. D., Zhao X., Reisfeld R.A. (1996). Human neural cell adhesion molecule L1 and rat homologue NILE are ligands for integrin alpha v beta 3. *J Cell Biol* 132, 475-485.

Moos M., Tacke R., Scherer H., Teplow D., Früh 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.

Murase S., Schuman E. M. (1999). The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* 11, 549-553.

Nakai Y., Kamiguchi H. (2002). Migration of nerve growth cones requires detergent-resistant membranes in a spatially defined and substrate-dependent manner. *J Cell Biol* 159, 1097-1108.

Nayeem N., Silletti S., Yang X., Lemmon V. P., Reisfeld R. A., Stallcup W. B., Montgomery A. M. (1999). A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J Cell Sci* 112, 4739-4749.

Needham L. K., Thelen K., Maness P. (2001). Cytoplasmic domain mutations of the L1 cell adhesion molecule reduce L1-Ankyrin interactions. *J Neurosci* 21, 1490-1500.

- Niethammer P., Delling M., Sytnyk V., Dityatev A., Fukami K., Schachner M. (2002). Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J Cell Biol* 157, 521–532.
- Ohoka Y., Takai Y. (1998). Isolation and characterization of cortactin Isoforms and a novel cortactin-binding protein, CBP90. *Genes to Cells* 3, 603-612.
- Okamoto P. M., Gamby C., Wells D., Fallon J., Vallee R. B. (2001). Dynamin isoform-specific interaction with the shank/ProSAP scaffolding proteins of the postsynaptic density and actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 276, 48458-48465.
- Ozawa K., Kashiwada K., Takahashi M., Sobue K. (1995). Translocation of cortactin (p80/85) to the actin-based cytoskeleton during thrombin receptor-mediated platelet activation. *Exp Cell Res* 221, 197-204.
- Persohn E., Schachner M. (1987). Immunoelectron microscopic localization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal development of the mouse cerebellum. *J Cell Biol* 105, 569-76.
- Persohn E., Schachner M. (1990). Immunohistological localization of the neural adhesion molecules L1 and N-CAM in the developing hippocampus of the mouse. *J Neurocytol* 19, 807-819.
- Prince J. T., Alberti L., Healy P. A., Nauman S. J., Stallcup W. B. (1991). Molecular cloning of NILE glycoprotein and evidence for its continued expression in mature rat CNS. *J Neurosci Res* 30, 567-581.
- Purves D., Lichtman J. W. (1983). Specific connections between nerve cells. *Annu Rev Physiol* 45, 553-565.
- Racz B., Weinberg R. J. (2004). The subcellular organization of cortactin in hippocampus. *J Neurosci* 24, 10310-10317.
- Rathjen F. G., 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.
- Rathjen F. G., Wolff F. M., Frank R., Bonhoeffer F., Rutishauser U. (1987). Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation. *J Cell Biol* 104, 343-353.

Reichardt L. F., Tomaselli K. J. (1991) Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu Rev Neurosci* 14, 531-570.

Rønn L. C., Doherty P., Holm A., Berezin V., Bock E. (2000). Neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule requires fibroblast growth factor receptor activation. *J Neurochem* 75, 665-671.

Rose S. P. (1995). Glycoproteins and memory formation. *Behav Brain Res* 66, 73-78.

Saffell J. L., Williams E. J., Mason I. J., Walsh F. S., Doherty P. (1997). Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18, 231-242.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sammar M., Gulbins E., Hilbert K., Lang F., Altevogt P. (1997). Mouse CD24 as a signaling molecule for integrin-mediated cell binding: functional and physical association with src-kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 234, 330-334.

Sanes J. R. (1989) Extracellular matrix molecules that influence neural development. *Annu Rev Neurosci* 12, 491-516.

Sauvonnet N., Dujeancourt A., Dautry-Varsat A. (2005). Cortactin and dynamin are required for the clathrin independent endocytosis of  $\gamma$ c cytokine receptor. *J Cell Biol* 168, 155-163.

Schachner M., Taylor J., Bartsch U., Pesheva P. (1994). The perplexing multifunctionality of janusin, a tenascin-related molecule. *Perspect Dev Neurobiol* 2, 33-41.

Schaefer A. W., Kamei Y., Kamiguchi H., Wong E. V., Rapoport I., Kirchhausen T., Beach C. M., Landreth G., Lemmon S. K., 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.

Schaefer A. W., Kamiguchi H., Wong E. V., Beach C. M., 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.

Schafer D. (2002). Coupling actin dynamics and membrane dynamics during endocytosis. *Curr Opin Cell Biol* 14, 76-81.

Schafer D. A. (2004). Regulating actin dynamics at membranes: a focus on dynamin. *Traffic* 5, 463-469.

Schlunck G., Damke H., Kiosses W. B., Rusk N., Symons M. H., Waterman-Storer C. M., Schmid S. L., Schwartz M. A. (2004). Modulation of Rac localization and function by dynamin. *Mol Biol Cell* 15, 256-267.

Schmid R. S., Pruitt W. M., Maness P. F. (2000). A MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires src-dependent endocytosis. *J Neurosci* 20, 4177-4188.

Scholey A. B., Mileusnic R., Schachner M., Rose S. P. (1995). A role for a chicken homolog of the neural cell adhesion molecule L1 in consolidation of memory for a passive avoidance task in the chick. *Learn Mem* 2, 17-25.

Schuster T., Krug M., Stalder M., Hackel N., Gerardy-Schahn R., Schachner M. (2001). Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J Neurobiol* 49, 142-158.

Schuuring E., Vernoeven E., Litvinov S., Michalides R. J. (1993). The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol Cell Biol* 13, 2891-2898.

Schwab M. E., Kapfhammer J. P., Bandtlow C. E. (1993). Inhibitors of neurite growth. *Annu Rev Neurosci* 16, 565-595.

Scotland P., Zhou D., Benveniste H., Bennett V. (1998). Nervous system defects of AnkyrinB (-/-) mice suggest functional overlap between the cell adhesion molecule L1 and 440-kDa. AnkyrinB in premyelinated axons. *J Cell Biol* 143, 1305-1315.

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.

- Silletti S., Yebra M., Perez B., Cirulli V., McMahon M., Montgomery A. M. (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.
- Simmons D., Makgoba M. W., Seed B. (1988). ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 331, 624-627.
- Simons K., Toomre D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Takeichi M. (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251, 1451-1455.
- Tansey M.G., Baloh R. H., Milbrandt J., Johnson Jr., E. M. (2000). GFR $\alpha$  mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25, 611-623.
- Thor G., Probstmeier R., Schachner M. (1987). Characterization of the cell adhesion molecules L1, N-CAM and J1 in the mouse intestine. *EMBO J* 6, 2581-2586.
- Tilghman R. W., Hoover R. L. (2002a). The src-cortactin pathway is required for clustering of E-selectin and ICAM-1 in endothelial cells. *J FASEB* 16, 1257-1259.
- Tilghman R. W., Hoover R. L. (2002b). E-selectin and ICAM-1 are incorporated into detergent-insoluble membrane domains following clustering in endothelial cells *FEBS Lett* 525, 83-87.
- Tongiorgi E., Bernhardt R. R., Schachner M. (1995). Zebrafish neurons express two L1-related molecules during early axonogenesis. *J Neurosci Res* 42, 547-561.
- Towbin H., Staehelin T., and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 76, 4350-4354.
- Trachtenberg J. T., Chen B. E., Knott G. W., Feng G., Sanes J. R., Welker E., Svoboda K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* 420, 788-794.

- Uruno T., Liu J., Zhang P., Fan Yx., Egile C., Li R., Mueller S. C., Zhan X. (2001). Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol* 3, 259-266.
- Van Camp G., Fransen E., Vits L., Raes G., Willems P. J. (1996). A locus-specific mutation database for the neural cell adhesion Molecule L1CAM (Xq28). *Hum Mutat* 8, 391.
- Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* 20, 484-487.
- Vidal C., Geny B., Melle J., Jandrort-Perrus M., Fontenay-Roupie M. (2002). Cdc42/Rac-1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood* 100, 4462-4469.
- Volkmer H., Hassel B., Wolff J. M., Frank R., Rathjen F. G. (1992). Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and its relationship to a neural subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J Cell Biol* 118, 149-161.
- Vuori K., Ruoslati E. (1995). Tyrosine Phosphorylation of p130<sup>Cas</sup> and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* 270, 22259-22262.
- Walsh F. S., 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.
- Webb K., Budko E., Neuberger T. J., Chen S., Schachner M., Tresco P. A. (2001). Substrate-bound human recombinant L1 selectively promotes neuronal attachment and outgrowth in the presence of astrocytes and fibroblasts. *Biomaterials* 22, 1017-1028.
- Weed S. A., Du Y., Parsons J. T. (1998). Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci* 111, 2433-2443.
- Weed S. A., Karginov A. V., Schafer D. A., Weaver A. M., Kinley A. W., Cooper J. A., Parsons J. T. (2000). Cortactin localization to sites of actin assembly in lamellipodia requires interactions with F-actin and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 151, 29-40.

Willems P. J., Bouwer O. F., Dijkstra I., Wilmink J. (1987). X-linked hydrocephalus. *Am J Genet* 27, 921-928.

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

Williams E. J., Doherty P., Turner G., Reid R. A., Hemperly J. J., Walsh F. S. (1992) Calcium influx into neurons can solely account for cell contact-dependent neurite outgrowth stimulated by transfected L1. *J Cell Biol* 119, 883-892.

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

Williams E. J., Walsh F. S., Doherty P. (1994a) Tyrosine kinase inhibitors can differentially inhibit integrin- dependent and CAM-stimulated neurite outgrowth. *J Cell Biol* 124, 1029-1037.

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

Wong E. V., Schaefer A. W., Landreth G., Lemmon V. (1996) Casein kinase II phosphorylates the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurochem* 66, 779-786.

Wu H., Parsons J. T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* 120, 1417-1426.

Wu H., Reynolds A. B., Kanner S. B., Vines R. R., Parsons J. T. (1991). Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol* 11, 5113-5124.

Yundru D., Weed S. A., Xiong W.-C., Marshall T. D. (1998). Identification of a novel Cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol* 18, 5838-5851.

Yuste R., Bonhoeffer T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.



Zhan X., Davis J. Q., Carpenter S., Bennett V. (1998). Structural requirements for association of neurofascin with ankyrin. *J Biol Chem* 273, 30785-30794.

Zhan X., Hampton B., Burgess H. W., Friesel R., Maciag T. (1993). Murine cortactin is phosphorylated in response to fibroblast growth factor-1 on tyrosine residues late in the G1 phase of the BALB/c 3T3 cell cycle. *J Biol Chem* 268, 24427-24431.

Zisch A. H., Stallcup W. B., Chong L. D., Dahlin-Huppe K., Voshol J., Schachner M., Pasquale E. B. (1997). Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cck5. *J Neurosci Res* 47, 655-665.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserum albumin
CAM	Zelladhäsionsmolekül
L1	Neurales Zelladhäsionsmolekül L1
cDNA	komplementäre DNA
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonucleotid-5'-triphosphat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF	fibroblast growth factor
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde

HBSS	Hank's Basal Salt Solution
HRP	Meerrettich Peroxidase
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
IP	Immunpräzipitation
IHC	Immunhistochemie
IZC	Immunzytochemie
Kan.	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LTP	Langzeitpotenzierung
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
min	Minuten
mRNS	messenger RNS
N2A	Neuroblastom2A
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
Neo.	Neomycin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NZS	normales Ziegenserum
ORF	offener Leserahmen
P	postnatal
P0	Myelin Protein Zero
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PNS	Peripheres Nervensystem
PSA	Polysialinsäure
RIPA	Radioimmunopräzipitation
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
V	Volt
ZNS	Zentralnervensystem

## 9.2 Oligonukleotide

<b>Nr.</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
1	CdelSH3fw	AAG CTT CGA ATT CTGCAG TCG ACT GGA AAG CCT CTG CAG GCC ATG
2	CdelSH3rev	CAT GGC CTG CAG AGG CTT TCC AGT CGA CTG CAG AAT TCG AAG CTT
3	EGFP-C-rev1	TTG GTT GAG GAC TAG GGG ATG CA
4	EGFP-C-rev2	CTT GGC CAA TCT CTC CTT GTA ATC
5	EGFP-C-rev3	GTC AGC TTG CAC ACC GTA TTT GC
6	EGFP-C-rev4	TTA GCA CCC CAT CTC TGC TCC TT
7	myc-cort	TCA GCG GAT GGC CAA AGA AAG A

### 9.3 Accession numbers (Zuordnungsnummern)

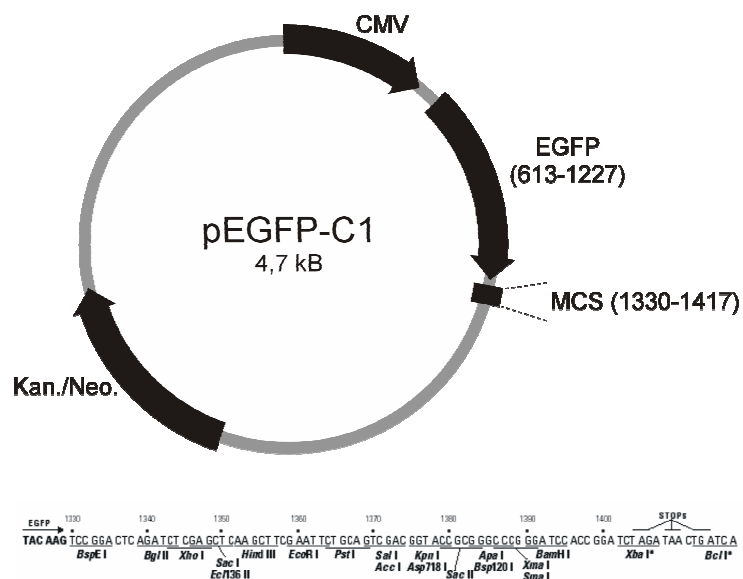
<b>DNA</b>	<b>Organismus</b>	<b>accession number</b>
Cortactin (Cttn)	Maus	007803
Klonierungsvector pEGFP-C1	künstliche Sequenz	U55763

## 9.4 Plasmide

Alle Plasmide wurden durch geeignete Kontrollverdaue untersucht und von der Sequenzierungseinrichtung des ZMNH mit den Oligonukleotiden 3-7 überprüft.

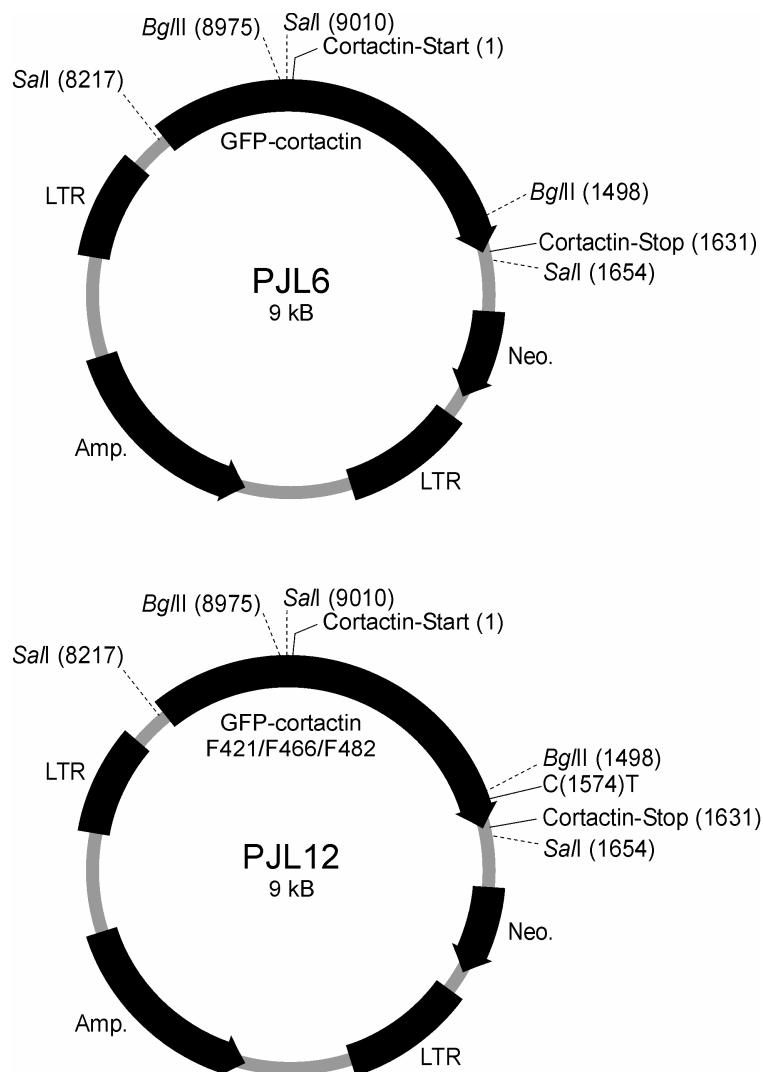
### 9.4.1 EGFP-C1

Der Vector pEGFP-C1 wurde von der Fa. BD, Clontech gekauft. Das Plasmid kodiert das *enhanced green fluorescence protein* (EGFP), gefolgt von einer *multiple cloning site* (MCS). Als Selektionsmarker kodiert der Vektor die Kan./Neo.-Resistenz. Die MCS enthält eine Auswahl von Einzelschnittstellen zur Klonierung von cDNA-Fragmenten. N-terminal-EGFP-fusionierte Proteine werden unter Kontrolle des CMV-Promoters exprimiert.



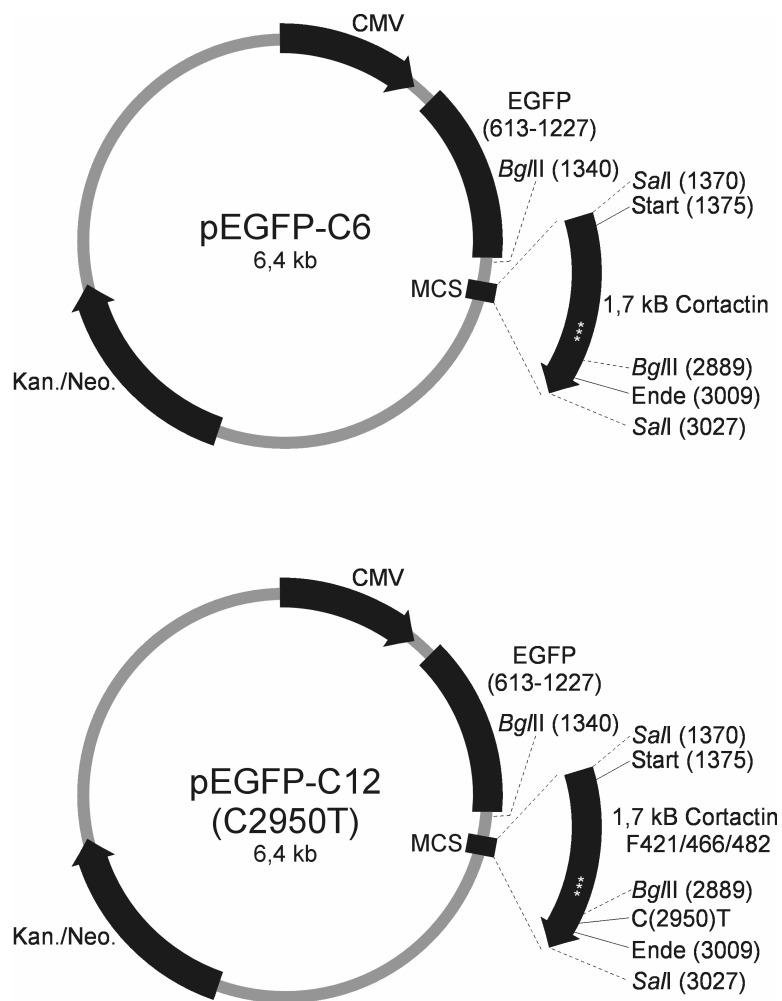
### 9.4.2 Klonierung von pEGFP-C6 und pEGFP-C12

Die cDNA von *full length* wt-Cortactin (PJL6) und *full length* Cortactin F421/466/482 (PJL12) wurden für die Herstellung N-terminal EGFP-fusionierten Proteins in den *murine stem cell viral long-term repeat* (MSCV-LTR) enthaltenden (retroviralen) MGIN-Vektor kloniert (Huang et al., 1998, Zhan et al., 1993, Li et al., 2000). Beide Plasmide wurden in dem Labor von Xi Zhan, Rockville, hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Vektor PJL12 enthält in der Cortactin-SH3-Domäne eine Punktmutation (C1574T).



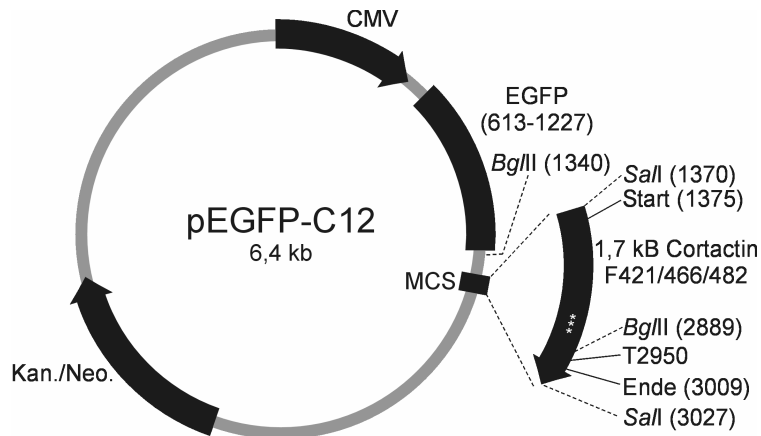


Beide Vektoren wurden mit *SalI* verdaut und das ca. 1,6 kB große *full-length* Fragment von Cortactin isoliert. EGFP-C1 wurde mit *SalI* linearisiert. Anschließend wurde die Cortactin-cDNA in die *SalI*-Schnittstellen des linearisierten Vektors ligiert. Die resultierenden Vektoren pEGFP-C6 und pEGFP-C12 (C2950T) wurden durch Kontrollrestriktionsverdau auf die korrekte Orientierung von Cortactin in pEGFP-C1 untersucht.



Anschließend wurden die Nukleotidsequenz beider Vektoren analysiert. Die Punktmutation in pEGFP-C12 (C2950T) wurde durch Restriktionsverdau des Vektors und Religation in pEGFP-C6 entfernt. Dafür wurde pEGFP-C12 (C2950T) und pEGFP-C6 mit

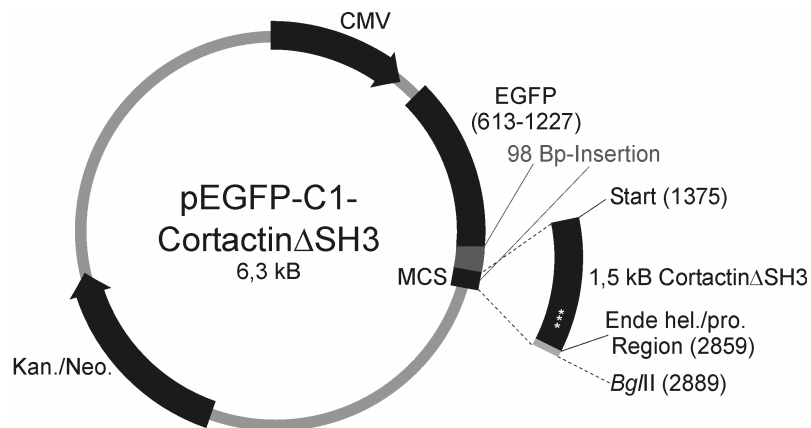
*Bgl*II geschnitten und das 1,5 kB Fragment aus pEGFP-C12 (C2950T) in den 3,1 kB-Vektor pEGFP-C6 ligiert.



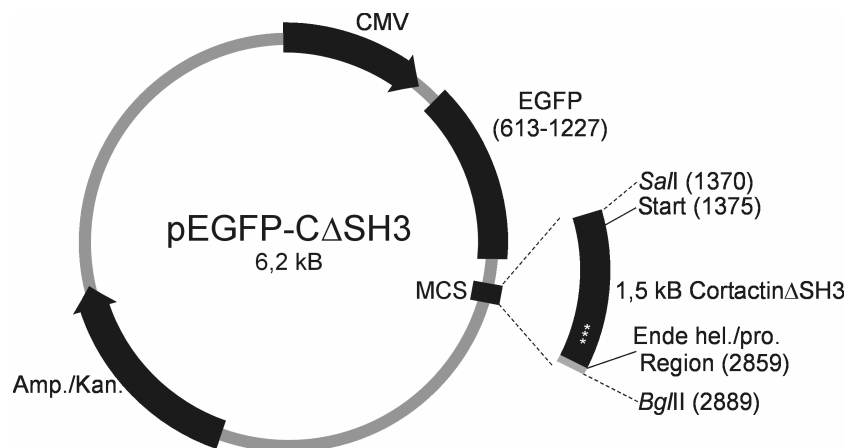
Die korrekte Orientierung des Cortactinfragmentes im Vektor pEGFP-C12 wurde durch einen Kontrollverdau kontrolliert.

### 9.4.3 Klonierung von pEGFP-CΔSH3

Der Vektor pEGFP-C1-CortactinΔSH3 kodiert für N-terminal EGFP-fusioniertes Cortactin, dessen 150 Basenpaar große SH3 Domäne bis zur *Bgl*II-Schnittstelle deletiert ist. Der Vektor wurde im Labor von H. Rauvala, Helsinki, hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält zwischen dem Ende der EGFP-kodierenden Sequenz und Cortactin 98 Basenpaare, die eine Leserahmenverschiebung und zwei Stop-Codons zwischen beiden Sequenzen verursachen.



Um beide Sequenzen wieder einem Leserahmen zuzuordnen und die Stop-Codons zu entfernen, wurde eine ortsspezifische Mutagenese durchgeführt. Als Vorlage für die Oligonukleotid-Primer wurde eine Sequenz von pEGFP-C6 verwendet, die etwa 20 Basen links und rechts des zu ersetzenden Bereiches entsprach. Die PCR wurde mit pEGFP-C1-Cortactin $\Delta$ SH3 als Vorlage und den Oligonukleotiden 1 und 2 (CdelSH3 fw und CdelSH3 rev) als Primern unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen (4.1.1.4) durchgeführt.



## 9.5 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Anja Behrendt
Geburtstag	24.12.1970
Geburtsort	Karlsruhe

### Schulausbildung

1981-1992	Gymnasium (Hebbelschule in Kiel; Internatsgymnasium Schloss Plön; Ernst-Barlach-Gymnasium in Kiel)
Mai 1992	Allgemeine Hochschulreife (2,4)

### Studium

1992-1996	Grundstudium der Chemie an der Christian Albrechts-Universität in Kiel, Vordiplom (gut)
1996-1999	Hauptstudium an der technischen Universität in Karlsruhe, Diplomprüfung (gut)
1999	Diplomarbeit im Fachbereich physikalische Chemie mit dem Titel „Photodissoziationsspektroskopie an Kupfer-, Silber- und Goldclustern“ (1,7)
Januar 2000	Abschluss als Diplom Chemikerin (Gesamtnote gut)

### Praktikum

Juli 1995	2-wöchiges Praktikum am Institut für angewandte Ökologie in Neu Brodersdorf
-----------	---

### **Berufserfahrung und Promotion**

Januar-Juni 2000	Beschäftigung als wissenschaftliche Angestellte am Institut für die physikalische Chemie mikroskopischer Systeme in Karlsruhe
Juli 2000	Beginn der praktischen Arbeit für die Promotion am Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg bei Professor Dr. Melitta Schachner
	im Rahmen dieser Forschungstätigkeit:
Juli 2000-März 2002	Beschäftigung als wissenschaftliche Angestellte bei der Fa. LION Bioscience im Bereich Genomics, Heidelberg
Juli 2000-Dezember 2003	Doktorandenstipendien der Universität Hamburg u. a. für die Forschungsarbeiten zu den „Funktionen von CAMs und Signaltransduktion“
April 2002-Dezember 2004	Beschäftigung als wissenschaftliche Angestellte am Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
Mai 2005	Abschluss der Promotion

### **Publikation**

Friedrich J., Gilb S., Ehrler O. T., Behrendt A., Kappes M. M. (2002). Electronic photodissociation spectroscopy of isolated  $\text{IrX}_6^{2-}$  (X = Cl, Br), *J Chem Phys* *117*, 2635-2644

---

Die hier vorliegende Doktorarbeit wurde am Institut für die Biosynthese neuraler Strukturen des Zentrums für molekulare Neurobiologie der Universität Hamburg (ZMNH) im Zeitraum von Juli 2000 bis Dezember 2004 bei Prof. Dr. Melitta Schachner angefertigt.

---

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Prof. Melitta Schachner, die mir die Durchführung der praktischen Arbeiten an ihrem Institut ermöglicht hat und mich während der Arbeit durch ihr Interesse und die stete Diskussionsbereitschaft gefördert und unterstützt hat.

Besonderer Dank gilt auch Prof. Marquardt für die Betreuung der externen Promotion und die bereichernden und auch unterhaltsamen Seminare, die in seinem Institut stattfanden.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Dr. Thomas Tilling, der mich während dieser Arbeit am Institut betreut hat und mich durch sein Interesse, seine Hilfsbereitschaft und seine fachliche Kompetenz immer unterstützt hat.

Auch Dr. Gaby Loers, Dr. Carsten Schmidt, PD Catharina Becker, Dr. Thomas Becker und Dr. Nuray Akyüz danke ich ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und das rege fachliche Interesse, die sie mir und meiner Arbeit zukommen ließen.

Dr. Andrey Irintchev und Emanuela Szpotowicz danke ich für die Hilfestellung bei der Herstellung und Auswertung der immunhistochemischen Schnitte.

Galina Dityateva und Dr. Alexander Dityatev danke ich für die Präparation und Transfektion von Hippocampusneuronen.

Natürlich bedanke ich mich bei meinen Laborkollegen, die mir unvergessliche Momente bescherten: Christian, Peggy, Achim, Anna, Sandra und Mounir.

Darüber hinaus gilt mein ganz besonderer Dank meinem Freund, meiner Tante Friderike und natürlich Bianca, die mich während dieser Arbeit immer wieder unterstützt, motiviert und gefördert haben.

---

**Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Fremde Hilfe ist, sofern sie in Anspruch genommen wurde, vermerkt.

Die Arbeit wurde zuvor keiner Prüfungsbehörde in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegt.

Hamburg, den 1. April 2005

Anja Behrendt