

Aus dem Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen  
Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg  
der Universität Hamburg

In Zusammenarbeit mit  
dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchungen zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher  
Fragmente der neuralen Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM  
im Zentralen Nervensystem der Maus**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

( Dr. rer. physiol. )

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Ina Kalus**

aus Gießen

Marburg, 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg am 26.01.05

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereich

**Dekan:** Prof. Dr. B. Maisch

**Referent:** Prof. Dr. A. Meinhardt

**Korreferent:** PD Dr. M. Schrader

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Proteasen: „A frog that became a prince“	1
1.2	Prozessierung von Transmembranproteinen: „A cellular striptease act“	2
1.2.1	Die Superfamilie der Metzinkine	4
1.2.1.1	ADAMs: “Sheddases”	4
1.2.1.2	Matrixmetalloproteasen: „They´re not just for matrix anymore!“	6
1.2.2	Prohormonkonvertasen: Aktivierung von Proteinvorläufern	8
1.3	Bedeutung der regulierten Prozessierung von Proteinen für das Zentrale Nervensystem (ZNS)	10
1.4	Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)	13
1.4.1	Das Zelladhäsionsmolekül NCAM	14
1.4.1.1	NCAM: Ein mögliches Substrat für Proteasen?	15
1.4.2	Das Zelladhäsionsmolekül L1	17
1.4.3	Das Zelladhäsionsmolekül L1 und seine Spaltprodukte	19
1.5	Aufgabenstellung	22
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
2.1	Chemikalien	23
2.2	Zelllinien	23
2.3	Kultivierung und Langzeitlagerung von Zellen	24
2.3.1	Kultivierung	25
2.3.2	Langzeitlagerung	25
2.4	<i>E. coli</i> -Stämme	26
2.5	Stammhaltung und Kultivierung von <i>E. coli</i>	26
2.5.1	Stammhaltung	26
2.5.2	Kultivierung	27
2.6	Plasmide	27
2.7	Expressionskonstrukte	27
2.8	Antibiotika	30
2.9	Antikörper	30
2.9.1	Primärantikörper	30

2.9.2	Sekundärantikörper.....	31
2.10	Inhibitoren.....	32
2.11	Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	32
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.1	Biochemische Methoden.....	34
3.1.1	Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)...	34
3.1.2	Silberfärbung.....	36
3.1.3	Immunoblot-Analyse.....	37
3.1.3.1	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen.....	37
3.1.3.2	Immunreaktion.....	38
3.1.3.3	ECL-Färbung.....	39
3.1.4	Proteinfällung.....	40
3.1.4.1	Proteinfällung nach Wessel.....	40
3.1.4.2	Acetonfällung.....	40
3.1.5	Proteinbestimmung (BCA-Test).....	41
3.1.6	Zellfraktionierung.....	42
3.1.6.1	Herstellung eines Gehirnhomogenates aus Gesamtgehirn, Kleinhirn oder Hippocampus.....	42
3.1.6.2	Herstellung eines „17000 x g“-Überstandes und „17000 x g“-Sedimentes aus Gehirnhomogenat.....	43
3.1.6.3	Isolierung von Fraktionen angereichert mit Endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi-Apparat und glattem ER, sekretorischen Vesikeln und löslichen Proteinen.....	44
3.1.6.4	Trennung in membranständige und membranassoziierte Proteine.....	46
3.1.6.5	Isolierung von Fraktionen angereichert mit Synaptosomen bzw. Synaptosomen von Moosfasern, Mitochondrien und Zellkernen.....	47
3.1.6.6	Herstellung eines Zellkernextraktes.....	49
3.1.7	Kopplung eines Antikörpers an DYNA-Beads.....	50
3.1.8	Immunpräzipitation aus einem Zellkernextrakt.....	51
3.1.9	Dichtegradientenzentrifugation.....	52
3.1.10	<i>Proteolyseassay</i> an isolierten Membranen.....	53
3.1.11	Verdau mit Endo N (Neuraminidase).....	55
3.1.12	Verdau von rekombinant hergestellten L1-Fragmenten mit Gelatinase.....	56

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.13	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	57
3.2	Molekularbiologische Methoden .....	60
3.2.1	Restriktionsverdau .....	60
3.2.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS .....	61
3.2.3	Herstellung von kompetenten Bakterien ( <i>E. coli</i> -Stamm: DH5 $\alpha$ ) .....	62
3.2.4	Transformation von Bakterien .....	63
3.2.5	Maxipräparation von Plasmid-DNS aus einer Bakterienkultur .....	63
3.3	Zellbiologische Methoden .....	64
3.3.1	Aufarbeitung von Zellen und Zellkulturüberständen .....	64
3.3.2	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren .....	65
3.3.3	Transiente Transfektion von Neuro 2a- und CHO-Zellen .....	66
3.3.4	Immunhistochemie an Neuro 2a-Zellen .....	67
3.3.5	Primärzellkultur .....	69
3.3.5.1	Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin (PLL) .....	69
3.3.5.2	Kleinhirnexplantate .....	70
3.3.5.3	Neuritenwachstum von Kleinhirnexplantaten .....	72
3.3.5.4	Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen .....	73
3.3.5.5	Einzelzellkulturen von hippocampalen Neuronen .....	75
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>78</b>
4.1	Untersuchungen zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM für das Zentrale Nervensystem .....	78
4.1.1	Die Entstehung des löslichen Fragmentes NCAM110 .....	79
4.1.1.1	Die Freisetzung membranständiger NCAM-Isoformen durch regulierte Proteolyse .....	79
4.1.1.2	PSA-tragende lösliche Fragmente des Moleküls NCAM .....	81
4.1.1.3	Metalloproteasen als verantwortliche Enzyme? .....	84
4.1.1.4	Proteasen und Phospholipasen: zwei verschiedene Mechanismen? .....	85
4.1.1.5	Die Metalloprotease TACE ( <i>TNF <math>\alpha</math> converting enzyme</i> ) .....	87
4.1.2	Calmodulin und das Zelladhäsionsmolekül NCAM .....	90
4.1.2.1	Regulation der Prozessierung von NCAM durch Calmodulin .....	90
4.1.2.2	Calmodulin als Interaktionspartner .....	91
4.1.3	Das Zytoskelett und das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM .....	96
4.1.3.1	Regulation der Prozessierung von NCAM durch das Aktinzytoskelett .....	96

## Inhaltsverzeichnis

---

4.1.3.2	Bedeutung der Proteolyse von NCAM für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum .....	97
4.1.3.3	Bedeutung des Moleküls Calmodulin für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum .....	99
4.2	Untersuchung zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls L1 für das Zentrale Nervensystem .....	100
4.2.1	Die Entstehung des Fragmentes L1-140 .....	101
4.2.1.1	Prohormonkonvertasen als verantwortliche Enzyme? .....	101
4.2.1.2	Vorkommen des Fragmentes L1-140 in verschiedenen Gehirnregionen .....	104
4.2.1.3	Das Fragment L1-140 verbleibt membranassoziiert .....	105
4.2.2	Die Entstehung des Fragmentes L1-180 .....	106
4.2.2.1	Metalloproteasen als verantwortliche Enzyme? .....	106
4.2.2.2	Die „Dimerisierungshypothese“ .....	108
4.2.2.3	Die Regulation der Prozessierung von L1 durch Calmodulin .....	111
4.2.2.4	Die Bedeutung löslicher L1-Fragmente für das L1-abhängige Neuritenwachstum .....	112
4.2.3	Weitere Spaltprodukte des Zelladhäsionsmoleküls L1 .....	114
4.2.3.1	Beteiligung der Protease MMP9? .....	116
4.2.4	Die Spaltung von L1 in der Transmembrandomäne.....	120
4.2.4.1	Bedeutung für das L1-abhängige Neuritenwachstum .....	122
4.2.4.2	Kernlokalisierung der intrazellulären Domäne von L1 .....	123
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>127</b>
5.1	Die regulierte Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM..	127
5.2	Die regulierte Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 .....	140
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>156</b>
6.1	Schlüsselwörter.....	158
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>160</b>
7.1	Keywords .....	161
<b>8</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>162</b>

<b>9 ANHANG .....</b>	<b>181</b>
9.1 Plasmidkarten .....	181
9.1.1 pRc/CMV .....	181
9.1.2 pcDNA3.....	181
9.2 Verzeichnis der Tabellen .....	182
9.3 Verzeichnis der Abbildungen .....	183
9.4 Abkürzungen und Einheiten.....	188
9.5 Abkürzungen der Nukleotide und Aminosäuren.....	194



# 1 Einleitung

## 1.1 Proteasen: „A frog that became a prince“

Die Familie der Proteasen gehört zu der Enzymklasse der Hydrolasen. Sie sind in der Lage, Proteine durch die Addition eines Wassermoleküls an eine Peptidbindung in ihre Bausteine, die Aminosäuren bzw. in Peptidfragmente zu zerlegen. Dieser enzymatisch unterstützte Prozess wird als **Proteolyse** aber auch als **Prozessierung** bezeichnet.

Proteasen werden basierend auf der in ihrem katalytischen Zentrum lokalisierten Aminosäure, die für die von ihnen katalysierte enzymatische Reaktion essentiell ist, in **Serin-, Cystein- und Aspartylproteasen** unterteilt. Für die von den **Metalloproteasen** katalysierte enzymatische Reaktion ist ein, in dem Zentrum der Enzyme koordiniertes, katalytisch relevantes Zinkion von großer Bedeutung, das in seiner Eigenschaft als Metallion zur Namensgebung dieser Enzymgruppe beigetragen hat (Bode *et al.*, 1999).

Die Enzymfamilie der Proteasen hat im Laufe der vergangenen Jahre zunehmend an Bedeutung gewonnen. Zunächst wurde Vertretern dieser Familie lediglich eine Beteiligung an der Qualitätskontrolle von Proteinen, genauer gesagt eine Funktion bei der Erkennung und der Eliminierung von fehlgefalteten Proteinen oder falsch assemblierten Komplexen zugesprochen. Darüber hinaus sind sie auch an der Beseitigung und dem Abbau von funktionellen Proteinen in den Lysosomen und dem Proteasom beteiligt. Der Nachweis der Aktivierung von biologisch-inaktiven Vorläufermolekülen durch die regulierte Spaltung der Proteine, wie in dem Fall von Pro-Insulin (Steiner und James, 1992) oder Pro-Opiomelanocortin (POMC) gezeigt werden konnte (Chretien *et al.*, 1979), rückte die Enzymfamilie der Proteasen zunehmend in das Interesse der Forscher. Zu den Substraten der Proteasen zählen nicht nur Proteinvorläufermoleküle. Die **regulierte Prozessierung** von Proteinen ist ein allgemeiner Mechanismus über die bereits bekannten posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungen,

Sulfatierungen oder Glykosylierungen hinaus, um die Aktivität eines Proteins, seine Lebensspanne aber auch seine Lokalisation zu verändern. Nicht nur auf genetischer Ebene durch homologe Rekombination oder Variationen in den Allelen, auf RNA-Ebene durch „Alternatives Spleißen“ oder „RNA-Editing“, sondern auch nach dem Verlassen des sekretorischen Weges, nach der Reifung eines Proteins ist eine Zelle durch dieses kurzfristig einsetzbare und jederzeit verfügbare Werkzeug in der Lage, die Diversität von Proteinen zu erhöhen (Seidah und Chretien, 1997).

Um ein gigantisches Kontrollsystem für die von Proteasen regulierten Zellfunktionen zu kompensieren und das Überleben eines biologischen Systems zu sichern, ist die Existenz von zahlreichen Proteasen mit verschiedenen (**Diversität**) aber auch überlappenden Funktionen (**Redundanz**) notwendig (Seidah und Chretien, 1999; Bauvois, 2001).

Die Aktivität von Proteasen kann sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf Proteinebene durch die Aktivierung von inaktiven Vorläufermolekülen reguliert werden. Endogene Inhibitoren kontrollieren die Aktivität einer Protease. Die irreversible Inaktivierung von Enzymen durch den Abbau funktioneller Proteasen zählt ebenfalls zu den komplexen Regulationsmechanismen zwischen Enzym und Substrat (Werb und Yan, 1998). Die Überwachung der Aktivität einer Protease ist notwendig, um eine vorzeitige und unkontrollierte Aktivierung zu verhindern, die zu pathologischen Prozessen wie der Neurodegeneration und der Onkogenese führen kann. Für das Verständnis der Pathogenese verschiedener Krankheiten ist daher die Untersuchung der beteiligten Proteasen und ihre Regulation essentiell. Proteasen stellen mögliche Angriffsstellen für Therapeutika beim Kampf gegen Krankheiten dar (Hooper *et al.*, 1997; Blobel, 2000).

## **1.2 Prozessierung von Transmembranproteinen: „A cellular striptease act“**

Während der Lebensspanne einer Zelle kommt es zu einer ständigen Veränderung und Modulation der Proteinzusammensetzung auf der Zelloberfläche. In Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums und des

Aktivitätsstatus einer Zelle werden Proteine von der Oberfläche einer Zelle entfernt, erneut präsentiert, aber auch strukturell verändert. Müsste eine Zelle auf diese Modulationen verzichten, wäre sie nicht in der Lage, sich zu bewegen und mit ihrer Umgebung in Kontakt zu treten. So stellt sich die Frage: Wie wird diese oftmals sehr schnell ablaufende Veränderung der Proteinzusammensetzung auf der Zelloberfläche moduliert? Welcher Mechanismus liegt diesen strukturellen Veränderungen von Zelloberflächenproteinen zugrunde? Die Zelle bedient sich für die Modulation ihrer Proteine an der Zelloberfläche dem jederzeit verfügbaren posttranslationalen Mechanismus der **regulierten Proteolyse** (Werb und Yan, 1998; Blobel, 2000). Für zahlreiche *single-pass* Transmembranproteine (Black *et al.*, 1997; Buxbaum *et al.*, 1998; Peschon *et al.*, 1998), zu denen unter anderem

**Tab. 1.1: Beispiele von Transmembranproteinen, die durch proteolytische Spaltung von der Membran gelöst werden (Schlondorff und Blobel, 1999).**

➤ Cytokine, Wachstumsfaktoren  
TGF $\alpha$ , EGF, HB-EGF, TNF $\alpha$ , CSF-1, Fas-L

➤ Rezeptoren  
TNFR1, TNFR2, p75 NGFR, TSHR

➤ Zelladhäsionsmoleküle und andere Proteine  
L-Selectin, APP, ACE, Delta

**Tab. 1.2: Zellfunktionen, die durch Proteolyse beeinflusst und reguliert werden.**

➤ Lösliche Mediatoren zwischen Zellen eines Zellverbandes (parakriner  $\Rightarrow$  endokriner Mechanismus)

➤ Regulation der Adhäsion von Zellen durch die Spaltung von Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen

➤ Regulation der Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren:

- Desensibilisierung einer Zelle durch die Spaltung von membrangebundenen Rezeptoren
- Freisetzung von membrangebundenen Liganden: Funktion als Agonisten oder Antagonisten

➤ Etablierung von attraktiven und repulsiven Proteingradienten für die Wegfindung migrierender Zellen

➤ Auslösung von Signaltransduktionsprozessen, die den Zelltod und das Zellüberleben regulieren

Membranrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle, Cytokine und Wachstumsfaktoren zählen [Tabelle (Tab.) 1.1], konnten bereits lösliche Formen nachgewiesen werden. Der konservierte und fundamentale Vorgang, bei dem Transmembranproteine durch Prozessierung in einen löslichen und einen weiterhin

membrangebundenen Teil gespalten werden, wird als ***Ectodomain Shedding*** (*to shed* = verlieren, abwerfen) definiert und führte zu der alternativen Bezeichnung der beteiligten und verantwortlichen Proteasen als **Secretases** oder **Sheddases**. (Schlondorff und Blobel, 1999; Seidah und Chretien, 1999; Blobel, 2000).

Die von dem Mechanismus des *Ectodomain Sheddings* beeinflussten und regulierten biologischen Prozesse sind sehr vielfältig (**Tab. 1.2**) (Schlondorff und Blobel, 1999; Seidah und Chretien, 1999; Blobel, 2000).

Als an der regulierten Proteolyse von Transmembranproteinen beteiligte Proteasen konnten neben den der Metalloproteasefamilie zugehörigen Mitgliedern der **ADAM-Familie** [ADAM = *a disintegrin and a metalloprotease*, (s. 1.2.1.1)] und der **Matrixmetalloproteasen** [MMP = *matrix metalloprotease*, (s. 1.2.1.2)] unter anderem auch Serinproteasen der Familie der **Prohormonkonvertasen** [PC = *prohormone convertase*, (s. 1.2.1)] identifiziert werden (Werb und Yan, 1998). Die Eigenschaften und Charakteristika der Proteasefamilien werden in den folgenden Unterkapiteln vorgestellt.

### 1.2.1 Die Superfamilie der Metzinkine

Die Familie der ADAMs und der MMPs werden mit den auch als Astazinen bezeichneten, erstmals im Flusskrebs *Astacus astacus* beschriebenen, Mitgliedern der Meprin-Familie und den sogenannten Serralysinen, die der Gruppe der bakteriellen Proteasen zugeordnet werden, zu der Superfamilie der **Metzinkine** zusammengefasst. Metzinkine sind zinkabhängige Metalloproteasen, die durch eine Konsensussequenz in der katalytischen Domäne (**HEXXHXXGXXHZ**) charakterisiert werden (Schlondorff und Blobel, 1999; Blobel, 2000). Im katalytischen Zentrum der Enzyme sind drei Histidinreste und ein Wassermolekül an der Koordination des katalytisch relevanten Zinkions beteiligt (Bode *et al.*, 1999).

#### 1.2.1.1 ADAMs: "Sheddases"

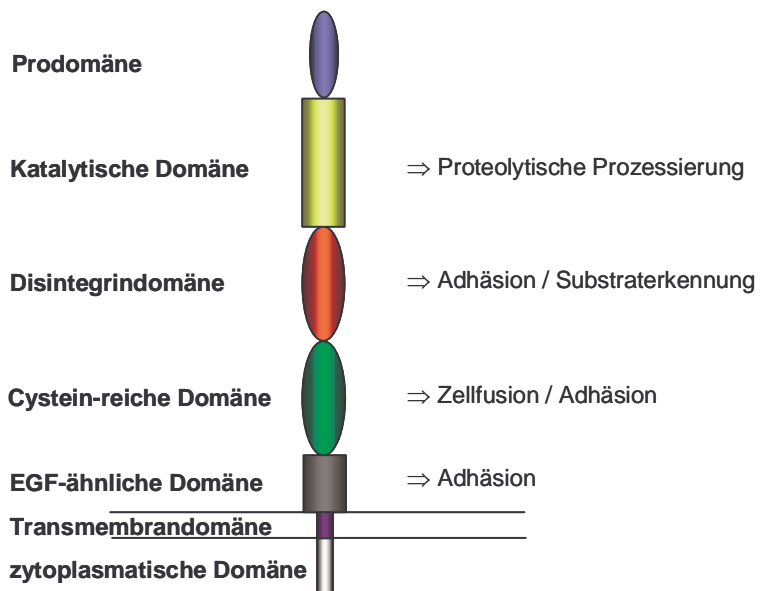
Die Familie der **ADAMs** umfasst eine Gruppe membranständiger Glykoproteine, die sowohl in physiologische (Fertilisation, Neurogenese, Adipogenese) als auch in pathologische Prozesse (Arteriosklerose, Morbus Alzheimer, Onkogenese, Diabetes mellitus, Asthma bronchiale) involviert sind (Blobel, 1997). Sie werden basierend auf ihrer Domänenstruktur auch als **MDCs**

**(Metalloprotease- / Disintegrin- / Cystein-reiche Proteine)** bezeichnet (Black und White, 1998). In vielen Fällen handelt es sich bei den Substraten der bereits mehr als dreißig Mitglieder umfassenden ADAM-Familie um mit der Zelloberfläche assoziierte oder membrangebundene Proteine. Einen Einblick über bereits identifizierte Substrate der ADAMs gibt **Tab 1.3**. Die Vertreter dieser Proteasefamilie spalten nicht nur Membranproteine, sondern zu ihren Substraten zählen auch Bestandteile der EZM wie Fibronectin und Kollagen (Primakoff und Myles, 2000; White, 2003).

	Enzym	membrangebundene Substrate
ADAM9	MDC 9	pro-HB-EGF
ADAM10	Kuzbanian	pro-HB-EGF, pro-TNF $\alpha$ , Notch, Ephrin-A2, APP, cellular prion precursor, Delta
ADAM12	Meltrin $\alpha$	pro-HB-EGF, insulin like growth factor binding proteins 3/5
ADAM17	TACE	pro-TNF $\alpha$ , pro-TGF $\alpha$ , pro-HB-EGF, Notch, Fas-L, L-Selektin, TNFR I, TNFR II, Trk A, APP, cellular prion precursor
ADAM19		pro-neuregulin $\beta$ 1 und $\beta$ 4

Im allgemeinen weisen ADAMs eine konservierte Domänenstruktur auf [Abbildung (Abb.) 1.1] (Blobel, 1997; Black und White, 1998; Schlondorff und Blobel, 1999). Sie werden zunächst als inaktive Vorläufer synthetisiert (Loechel *et al.*, 1998; Lum *et al.*,

1998; Roghani *et al.*, 1999). In vielen Fällen sind Mitglieder der Prohormonkonvertasefamilie (s. 1.2.2) an der Spaltung der Prodomäne und somit der Aktivierung des Moleküls beteiligt. Die **Prodomäne** scheint neben ihrer inhibitorischen Funktion auf die katalytische



**Abb. 1.1: Schematische Übersicht der Domänenstruktur der Familie der ADAMs (Moss und Lambert, 2002)**

Aktivität des Enzyms auch an der Reifung und dem intrazellulären Transport des Proteins beteiligt zu sein (Loechel *et al.*, 1998; Roghani *et al.*, 1999). Die

**Disintegrindomäne** (= *disruption of integrin binding*) der ADAMs ist in der Lage, die Funktion von Integrinen zu inhibieren (Gupta *et al.*, 2000). Die adhäsiven Domänen, die Disintegrin-, die **Cystein-reiche** und die **epidermal growth factor (EGF)-ähnliche Domäne** vermitteln Wechselwirkungen mit membrangebundenen, aber auch mit Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM), die ADAMs an ihren physiologischen Wirkungsort führen und darüber hinaus durch Bindung eines potentiellen Substrates die Effektivität der Protease regulieren können (Blobel und White, 1992; Iba *et al.*, 2000; Gaultier *et al.*, 2002).

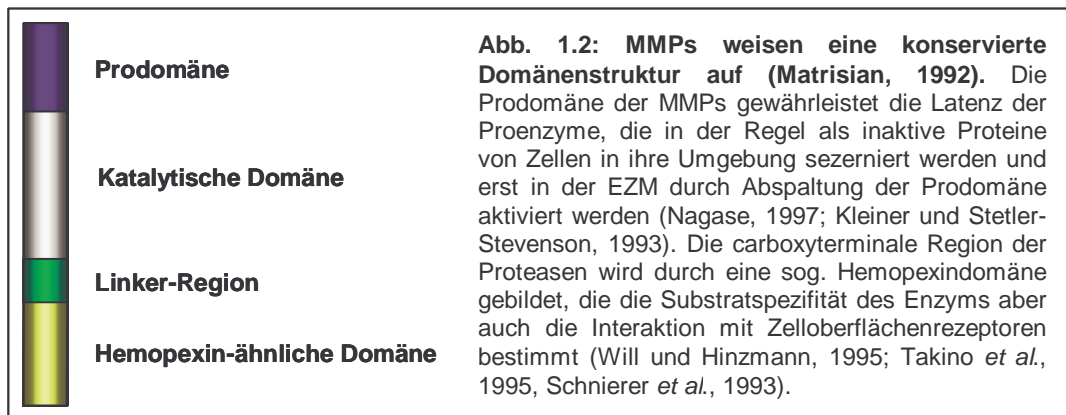
Die **intrazelluläre Domäne** der ADAMs ist an Signaltransduktionsprozessen (Yagami-Hiromasa *et al.*, 1995; Black *et al.*, 1997; Inoue *et al.*, 1998; Schlondorff und Blobel, 1999) beteiligt. Die Modulation des zytoplasmatischen Anteils kann zusätzlich zu einer Veränderung der intrazellulären Prozessierung, dem Transport, der subzellulären Lokalisation und der Oberflächenexpression des Enzyms auch die Aktivität des Enzyms beeinflussen (Seals und Courtneidge, 2003).

Für Vertreter der ADAM-Familie konnte bisher keine übereinstimmende Erkennungs- und Spaltsequenz identifiziert werden. Die Substratspezifität einer jeden Protease scheint durch etwa 8 - 10 ungefaltete Aminosäuren um die zu spaltende Peptidbindung, sowie durch den Abstand der Spaltstelle zu der Membran determiniert zu werden (Schlondorff und Blobel, 1999).

#### 1.2.1.2 Matrixmetalloproteasen: „They´re not just for matrix anymore!“

**Matrixmetalloproteasen**, auch als Matrixine bezeichnet, sind verantwortlich für die Degradation verschiedener Komponenten der EZM und der Basalmembranen (Khasigov *et al.*, 2001). Sie spielen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des Organismus (Khasigov *et al.*, 2001). Im adulten Organismus ist die Aktivität der MMPs dagegen sehr niedrig. Sie kann jedoch durch physiologische Vorgänge stimuliert werden, die durch die Umstrukturierung von Bindegewebsstrukturen wie z.B. dem Menstruationszyklus und der Resorption der Plazenta nach der Schwangerschaft charakterisiert werden (Johnson *et al.*, 1998).

Bisher wurden bereits 20 Mitglieder dieser Familie identifiziert und charakterisiert. Basierend auf der ihnen eigenen konservierten Domänenstruktur (**Abb. 1.2**), der



Substratspezifität und der zellulären Lokalisation der Enzyme können sie in vier verschiedene Unterklassen eingeteilt werden: die **Kollagenasen**, die **Gelatinasen**, die **Stromelysine** und die membrangebundenen **MT** (*membrane type*) - **MMPs**, die an ihrem carboxyterminalen Ende eine zusätzliche membranspannende Domäne aufweisen (Sato und Seiki, 1996; Seiki, 1999; Ellerbroek und Stack, 1999).

**Tab. 1.4: Proteasen der MMP-Familie und ihre nicht-traditionellen Substrate (Johnson et al., 1998 ; Khasigov et al., 2001)**

Enzym	Nicht-traditionelles Substrat
<u>Kollagenasen</u>	
MMP-1 Interstitielle Kollagenase	pro-MMP2, pro-MMP9, pro-TNF $\alpha$ , Perlecan
MMP-8 Neutrophile Kollagenase	pro-MMP8
MMP-13 Kollagenase-3	pro-MMP9,13
<u>Gelatinasen</u>	
MMP-2 Gelatinase A	pro-MMP1, 2, 9, 13, APP, pro-TNF $\alpha$
MMP-9 Gelatinase B	pro-TNF $\alpha$
<u>Stromelysine</u>	
MMP-3 Stromelysin-1	pro-MMP1, 3, 7, 8, 9 und 13, pro-TNF $\alpha$ , Perlecan, Plasminogen, E-Cadherin
MMP-10 Stromelysin-2	pro-MMP1, 8, 10
<u>Membrangebundene MMPs (MT-MMPs)</u>	
MMP-14 MT-MMP 1	pro-MMP2, 13, CD 44
MMP-15 MT-MMP 2	pro-MMP2
MMP-16 MT-MMP 3	pro-MMP2
MMP-17 MT-MMP 4	pro-MMP2
MMP-24 MT-MMP 24	pro-MMP2
MMP-25 MT-MMP 25	pro-MMP2

Zu den Substraten der MMPs zählen zahlreiche Proteine der EZM, sowie der Basalmembran: Kollagen, Gelatin, Elastin, Fibronectin, Vitronectin, Aggrecan,

Laminin und Tenascin C (Nagase und Woessner, Jr., 1999; Murphy und Gavrilovic, 1999; Khasigov *et al.*, 2001). Darüber hinaus sind Vertreter dieser Familie auch an der regulierten Proteolyse von Membranproteinen beteiligt sind. Die **Tab. 1.4** gibt einen Überblick über bereits identifizierte nicht der EZM zugehörige Substrate der Matrixmetalloproteasen (Brinckerhoff und Matrisian, 2002).

Die Regulation und Aktivierung der MMPs ist ein komplexer Prozess, der unter anderem von endogenen Inhibitoren beeinflusst wird (Murphy *et al.*, 1993; O'Connell *et al.*, 1994). Zu den endogenen Inhibitoren der MMPs, die auch die Aktivität von einigen Mitgliedern der ADAM-Familie regulieren können, zählen neben  $\alpha 2$ -macroglobulin die von zahlreichen Zellen exprimierten TIMPs 1 - 4 (*tissue inhibitors of metalloproteases*) (Nagase und Woessner, Jr., 1999; Murphy und Gavrilovic, 1999; Curran und Murray, 1999).

Ist die Expression oder Aktivierung der MMPs disreguliert, die Balance zwischen endogenen Inhibitoren und Protease aus dem Gleichgewicht geraten, führt dies zu der Entstehung von Erkrankungen wie der Onkogenese, Arthritis, Periodontitis und Arteriosklerose (Johnson *et al.*, 1998).

### 1.2.2 Prohormonkonvertasen: Aktivierung von Proteinvorläufern

Eine Gruppe sekretorischer Proteine, zu denen unter anderem endokrine und neurale Peptidhormone, Enzyme, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren zählen (**Tab. 1.5**), werden als langlebige inaktive Proteinvorläufer synthetisiert, sogenannte **Proproteine**. Für die Aktivierung dieser Proteine ist eine Abspaltung des Propeptids durch regulierte Prozessierung notwendig. Proteinvorläufern ist eine Sequenz gemeinsam, die durch einzelne oder Paare von basischen Aminosäuren charakterisiert wird. Das Sequenzmotiv (Rehemtulla und Kaufman, 1992; Van de Ven *et al.*, 1993; Seidah *et al.*, 1994; Rouille *et al.*, 1995), das die Prodomäne mit der funktionellen Proteinsequenz eines Proteins verbindet, lässt sich zu der allgemeinen Formel  $(R/K)-X_n-(R/K)\downarrow$  [ $n = 0, 2, 4$  oder  $6$ ] zusammenfassen. Die Spaltung des Vorläufermoleküls zwischen Prodomäne und aktivem Protein erfolgt aminoterminal des Sequenzmotivs.

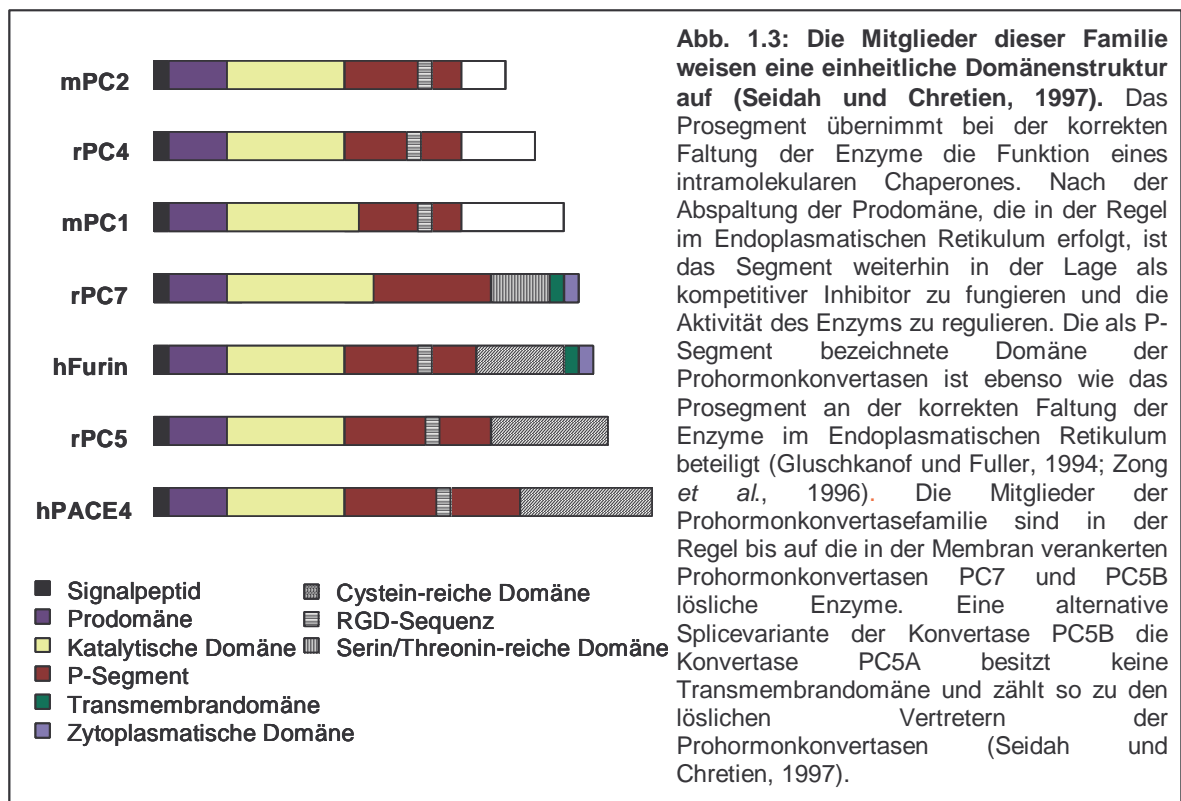
Die den Serinproteasen zugehörigen kalziumabhängigen

**Prohormonkonvertasen (PCs)** sind verantwortlich für die regulierte Prozessierung von inaktiven Vorläufermolekülen (Rehemtulla und Kaufman, 1992; Van de Ven *et al.*, 1993; Seidah *et al.*, 1994; Rouille *et al.*, 1995; Seidah und Chretien, 1999). Die Familie der

**Tab. 1.5: Proteinvorläufer, die durch regulierte Prozessierung von Mitgliedern der Familie der Prohormonkonvertasen aktiviert werden können (Seidah und Chretien, 1997).**

➤ <u>Furin</u>	
Wachstumsfaktoren:	pro-TGFβ
Neurotrophine:	pro-NGF, pro-BDNF, pro-NT3
Hormone:	pro-PTH
Integrine (α-Ketten):	α3, α6
Rezeptoren:	Insulin-Rezeptor
Metalloendopeptidasen:	Stromelysin 3
➤ <u>PC1</u>	
Prohormone:	POMC, Proinsulin, pro-TRH, Proglucagon, Prorenin
➤ <u>PC2</u>	
Prohormone:	POMC, Proinsulin, Proglucagon, pro-LHRH
➤ <u>PC5-A</u>	
Prohormone:	pro-MIS
Rezeptoren:	pro-Rezeptor Tyrosinkinase μ

Prohormonkonvertasen, deren Mitglieder eine konservierte Domänenstruktur



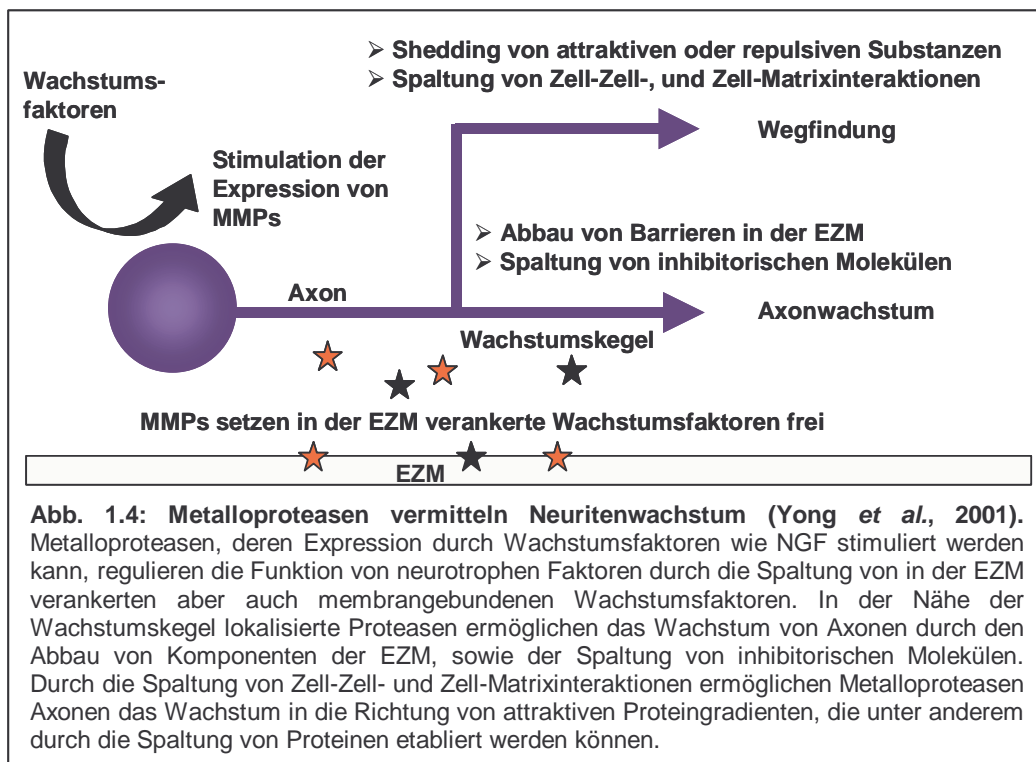
aufweisen (**Abb. 1.3**), umfasst sieben Mitglieder: PC1 / PC3, PC2, PC4, Furin / PACE, PACE4, PC5 / PC6 und PC7 / SPC7 / LPC / PC8 (Marcinkiewicz *et al.*, 1996; Seidah und Chretien, 1999).

Die Bedeutung der Proteasefamilie wurde durch die Analyse von Prohormonkonvertase-defizienten Mäusen bekräftigt: Furin- und PC-1 defiziente Mäuse sterben im frühen Embryonalalter. Männliche Mäuse, die das Protein PC4 nicht exprimieren, sind unfruchtbar (Seidah und Chretien, 1999).

### 1.3 Bedeutung der regulierten Prozessierung von Proteinen für das Zentrale Nervensystem (ZNS)

Proteasen sind Mitspieler in zahlreichen physiologischen und pathologischen Vorgängen des Zentralen Nervensystems.

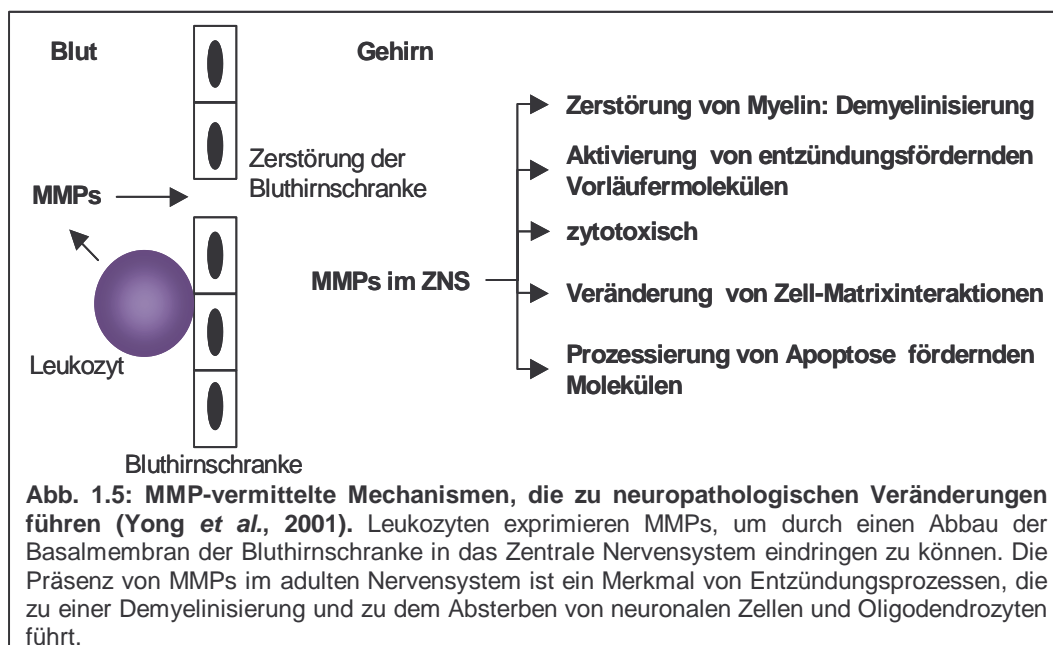
Metalloproteasen, zu denen Vertreter der ADAM-Familie (s. 1.2.1.1) und die MMPs (s. 1.2.1.2) zählen, greifen in zahlreiche Prozesse des Zentralen Nervensystems, wie der Migration von neuronalen Vorläuferzellen, dem Neuritenwachstum und der Kommunikation von Zellen untereinander ein (Black



und White, 1998; Schlondorff und Blobel, 1999; Primakoff und Myles, 2000). Sie regulieren den Zelltod und das Zellüberleben, greifen in Prozesse wie die Angiogenese und die Zellproliferation ein und sind neben ihrer Beteiligung an Heilungsprozessen auch an der Myelinisierung von Axonen beteiligt (Werb und

Yan, 1998; Oh *et al.*, 1999). Die **Abb. 1.4** vermittelt einen Einblick in die von Metalloproteasen regulierten Vorgänge bei der Ausbildung und dem gerichteten Wachstum von Axonen.

Auch Serinproteasen sind an Prozessen des Zentralen Nervensystems beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der synaptischen Plastizität, die mit aktivitätsabhängigen strukturellen Veränderungen von Synapsen gekoppelt ist. Im Zentralen Nervensystem gehört der Hippocampus zu den Orten synaptischer Veränderungen. Proteine des synaptischen Spaltes wie Cadherine, Laminin, Integrin und Proteine der EZM sind in den durch synaptische Plastizität charakterisierten Prozess der *Langzeitpotenzierung* (LTP) involviert. Proteolytische Modifikationen dieser Makromoleküle sind ein Bestandteil des Regulationssystems der synaptischen Plastizität. Neben Calpainen und Neuropsin konnte dem „Plasmin-Plasminogen“-System und Thrombin eine Beteiligung an der Regulation der synaptischen Plastizität nachgewiesen werden (Yoshida und Shiosaka, 1999; Tomimatsu *et al.*, 2002). Darüber hinaus kontrollieren Mitglieder der Prohormonkonvertasefamilie (s. 1.2.2), die Neuropeptidkonvertasen PC1 und PC2 die Entstehung von Neuropeptiden und

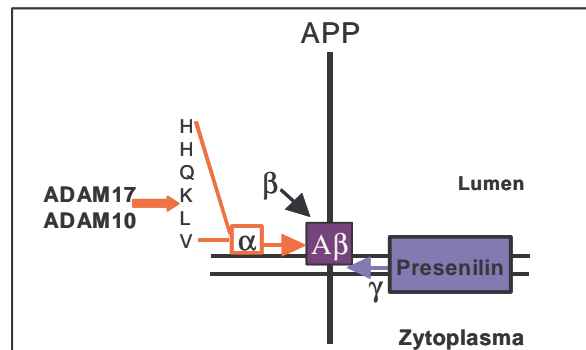


Neurohormonen durch die Spaltung von inaktiven Vorläufermolekülen (Marcinkiewicz *et al.*, 1996).

Unter physiologischen Bedingungen werden Proteasen streng reguliert. Ist das Gleichgewicht zwischen Inhibitoren und Proteasen gestört, kommt es zu der

Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Multipler Sklerose und malignen Gliomen (Yong *et al.*, 2001). Unter pathologischen Bedingungen kehren sich positive Eigenschaften der Proteasen in negative Effekte um. Disregulierte Proteasen stellen somit eine große Gefahr für das Nervensystem dar. Tumorzellen sind mit Hilfe von Proteasen in der Lage, zu migrieren, durch die Zerstörung der Bluthirnschranke in den Blutkreislauf einzudringen und zu metastasieren. Die Freisetzung von Angiogenesefördernden Substanzen garantiert die Versorgung der Tumore. Das Krankheitsbild der Multiplen Sklerose

(MS) wird durch Entzündungsprozesse im Zentralen Nervensystem charakterisiert. Wie in **Abb. 1.5** dargestellt, kommt es bei dem Krankheitsbild der MS zu der Auslösung einer Immunantwort, die fatale Folgen für die Integrität des Nervensystems hat. Die Proteolyse des *amyloid precursor proteins* (APP) ist eines der am intensivsten untersuchten Beispiele eines reguliert gespaltenen Membranproteins, dessen fehlgesteuerte Prozessierung zu der Entstehung der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Alzheimer führt. Die Beteiligung verschiedener Proteasenfamilien an der Prozessierung eines einzigen Membranproteins, des Proteins APP, ist in der **Abb. 1.6** dargestellt.



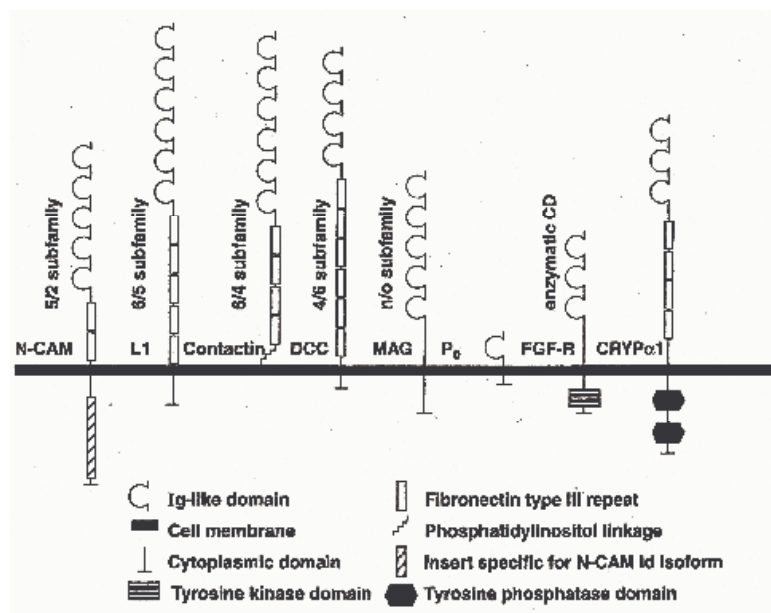
**Abb. 1.6:** Das Protein APP wird an drei Stellen durch die als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen bezeichneten Enzyme gespalten (Blöbel, 2000). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase spalten APP in der extrazellulären Domäne, wohingegen die  $\gamma$ -Sekretase APP in der Transmembrandomäne spaltet. Das Zusammenspiel der verschiedenen Proteasen führt zu der Entstehung unterschiedlicher Bruchstücke. Die Spaltung von APP durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen resultiert in A $\beta$ -Bruchstücken, die als Hauptkomponente der im Gehirn von Alzheimer-Patienten vorkommenden amyloiden Plaques nachgewiesen werden konnten (Selkoe und Kopan, 2003). Die  $\alpha$ -Sekretase verhindert die Entstehung des pathogenen Bruchstückes A $\beta$ , in dem sie innerhalb der Sequenz A $\beta$  schneidet (Caporaso *et al.*, 1992). Sowohl ADAM17 als auch ADAM10 sind in der Lage APP an der Schnittstelle  $\alpha$  zu spalten (Buxbaum *et al.*, 1998).

## 1.4 Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)

Sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Nervensystem vermitteln neurale Mitglieder der **Immunglobulin-Superfamilie (IgSF)** kalziumunabhängige homo- und heterophile Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen (Williams und Barclay, 1988; Brummendorf und Rathjen, 1995; Crossin und Krushel, 2000). Sie werden mit den Integrinen (Reichardt und Tomaselli, 1991; Hynes, 1992), den kalziumabhängigen Cadherinen (Kemler *et al.*, 1989; Takeichi, 1991) und Molekülen der extrazellulären Matrix (Sanes, 1989; Reichardt und Tomaselli, 1991) zu der Gruppe der **neurale Zelladhäsionsmoleküle** zusammengefasst.

Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie, die größte bisher identifizierte Proteinfamilie mit mehr als 100 Mitgliedern (Williams und Barclay, 1988), werden durch ein gemeinsames Strukturmotiv, der Immunglobulindomäne (Ig-Domäne) charakterisiert

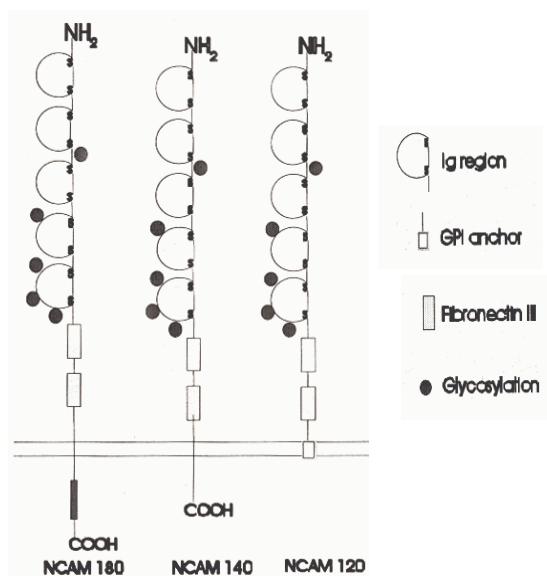
(Abb. 1.7). Ein zweites Strukturmotiv, das in den meisten, obgleich nicht allen IgSF-Mitgliedern gefunden wurde, ist die Fibronektindomäne (Fn-Domäne) (Crossin und Krushel, 2000).



**Abb. 1.7: Schematische Übersicht über die Subfamilien der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie (Crossin und Krushel, 2000).** Die Superfamilie wird anhand der Anzahl ihrer Ig- und Fn-Domänen, sowie der Verankerung des Moleküls in der Membran und der Eigenschaft der zytoplasmatischen Domäne, eine enzymatische Reaktion durchführen zu können, in verschiedene Untergruppen eingeteilt.

### 1.4.1 Das Zelladhäsionsmolekül NCAM

Das *neural cell adhesion molecule* NCAM zählt zu den ersten identifizierten Mitgliedern der IgSF (Cunningham *et al.*, 1987). Es ist durch seine Eigenschaft Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen vermitteln zu können, in zahlreiche Prozesse des Nervensystems, wie die Zellmigration, die Proliferation, das Neuritenwachstum, die Axonfaszikulierung und die synaptische Plastizität involviert (Doherty *et al.*, 1990; Schachner, 1991; Doherty und Walsh, 1992; Itoh



**Abb. 1.8:** Die NCAM-Isoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180 entstehen durch Alternatives Spleißen. NCAM180 und NCAM140 gehören zu der Klasse der Membranproteine des Typs Nr. 1. Das Molekül NCAM180 unterscheidet sich von dem Molekül NCAM140 einzig durch eine in der intrazellulären Domäne lokalisierten Aminosäureabfolge, die von dem Exon 18 codiert wird. NCAM120 hingegen ist mit Hilfe eines Glycosylphosphatidylinositol (GPI) - Ankers in der Membran inseriert (Cunningham *et al.*, 1987).

*et al.*, 1995; Jorgensen, 1995; Sporns *et al.*, 1995; Fields und Itoh, 1996; Cremer *et al.*, 1997).

Das Molekül NCAM besteht aus 5 Ig-Domänen, gefolgt von 2 Fn-Domänen (Cunningham *et al.*, 1987). Die drei Hauptisoformen des Moleküls entstehen durch „Alternatives Spleißen“ der Exons 15 und 18, die die Art der Verankerung in der Membran und die Größe der zytoplasmatischen Domäne determinieren: NCAM180, NCAM140 und NCAM120 (Owens *et al.*, 1987) (**Abb. 1.8**). NCAM120 wird ausschließlich von Oligodendrozyten,

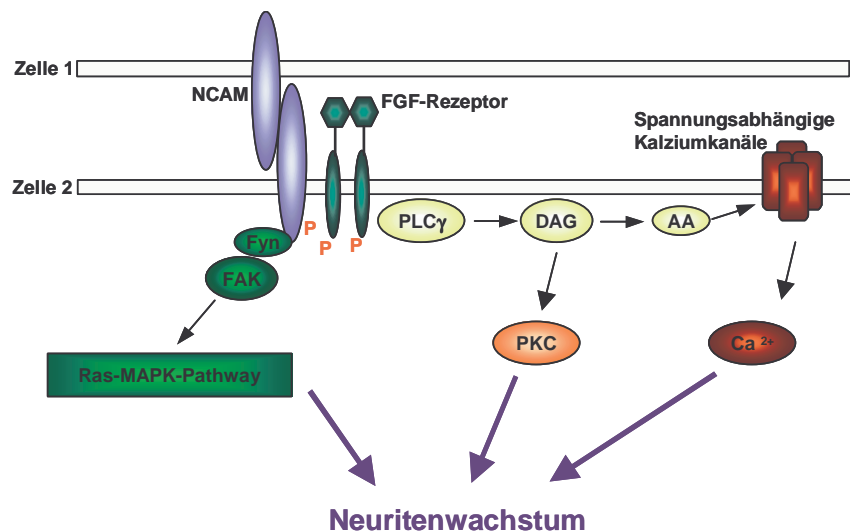
sowie von Astrozyten exprimiert (Bhat und Silberberg, 1988), wohingegen NCAM140 und NCAM180 vorwiegend auf der Zelloberfläche von Neuronen zu finden sind (Nybroe *et al.*, 1985).

NCAM wird wie alle anderen Mitglieder der Ig-Superfamilie im sekretorischen Weg posttranslationalen Modifikationen unterzogen. Das Molekül ist jedoch einzigartig darin, dass es eine große Menge eines negativ geladenen Zuckers, der Polysialinsäure (PSA) trägt (Hoffman *et al.*, 1982).

Wie alle Mitglieder der IgSF kann NCAM sowohl homophile als auch heterophile Wechselwirkungen eingehen (**Abb. 1.9**). Die Gruppe der heterophilen Liganden des Zelladhäsionsmoleküls NCAM umfasst neben Kollagen (Probstmeier *et al.*, 1989), Heparansulfatproteoglykane, wie Agrin und Chondroitinsulfatproteoglykane, zu denen Neurocan zählt.

NCAM-defiziente Mäuse zeigen einen unerwartet milden Phänotyp (Cremer *et al.*, 1994; Cremer *et al.*, 1997). Den stärksten Defekt findet man in dem olfaktorischen System der Mäuse.

Der olfaktorische Bulbus ist im Vergleich zu dem der Wildtypiere stark verkleinert. Die Beteiligung von NCAM an synaptischer Plastizität wurde durch eine verminderte LTP in NCAM-defizienten Mäusen bestätigt.



**Abb. 1.9: Zusätzlich zu seiner Funktion als Ligand nimmt das Molekül NCAM die Rolle eines Vermittlers in Signaltransduktionsprozessen ein (Williams *et al.*, 1994).** Die Interaktion von NCAM mit dem FGF-Rezeptor führt zu dessen Aktivierung, die in einer Rekrutierung und Aktivierung der Phospholipase C resultiert. Für NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum ist nicht nur der Signaltransduktionsweg des FGF-Rezeptors, sondern auch die Aktivierung der Protein Kinase C und des *ras*-MAPK-Pathways erforderlich (Schmid *et al.*, 2000; Kolkova *et al.*, 2000).

Zusätzlich zu Defiziten im räumlichen Lernen zeigen männliche NCAM-defiziente Tiere eine verstärkte Aggressivität und eine leicht verminderte Explorationsaktivität (Cremer *et al.*, 1994; Stork *et al.*, 1997).

#### 1.4.1.1 NCAM: Ein mögliches Substrat für Proteasen?

NCAM existiert nicht nur als membrangebundenes Protein, sondern bereits 1975 konnten Jorgensen und Bock ein lösliches NCAM-Fragment aus humaner Zerebrospinalflüssigkeit isolieren (Bock und Jorgensen, 1975). Weitere Studien folgten, in denen lösliche NCAM-Fragmente mit Molekulargewichten von 110 kDa - 190 kDa auch in Körperflüssigkeiten wie Fruchtwasser und Serum

(Jorgensen und Norgaard-Pedersen, 1981; Ibsen *et al.*, 1983), in Zellkulturüberständen (Rutishauser *et al.*, 1976) und in membranfreien Überständen von Gehirnhomogenaten nachgewiesen werden konnten (Gennarini *et al.*, 1984; Nybroe *et al.*, 1989). Den größten Anteil der löslichen NCAM-Formen nimmt ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 110 kDa ein (Nybroe *et al.*, 1989).

Der Ursprung der löslichen NCAM-Fragmente und die für ihre Bildung verantwortlichen Proteasen sind bisher nur partiell aufgeklärt. Das lösliche 110 kDa-Fragment NCAM110 kann *in vitro* durch die Behandlung mit der *phosphatidylinositol-specific Phospholipase C (PI-PLC)* (He *et al.*, 1986; Sadoul *et al.*, 1986) oder durch die Inkubation von Membranfraktionen bei 37 °C generiert werden. Endo *et al.* konnten in *in vitro*-Studien zeigen, dass die membranverankerten Isoformen NCAM140 und NCAM180 von der Serinprotease Plasmin gespalten werden können (Endo *et al.*, 1998; Endo *et al.*, 1999). Allerdings weisen die entstandenen Spaltprodukte ein Molekulargewicht von 60 kDa und 90 kDa auf. Neben der Vermutung, dass die GPI-verankerte NCAM-Isoform NCAM 120 durch die Spaltung des GPI-Membranankers unter Beteiligung von Phospholipasen von der Membran gelöst wird, scheinen darüber hinaus auch Proteasen in die Entstehung löslicher NCAM-Formen involviert zu sein.

Lösliche NCAM Formen sind an der Modulation der EZM beteiligt (Probstmeier *et al.*, 1989; Probstmeier *et al.*, 1992). Substrat-gebundenes NCAM vermittelt Zelladhäsion, die durch lösliche NCAM-Formen gestört werden kann (Sadoul *et al.*, 1986; Olsen *et al.*, 1993). Lösliche Formen des Moleküls NCAM unterstützen die Migration von Schwannschen Zellen (Thomaidou *et al.*, 2001a). Darüber hinaus scheinen sie bei der von NCAM regulierten synaptischen Plastizität eine Rolle zu spielen. Nach der Stimulation von LTP in Maus-Hippocampi konnten lösliche NCAM Fragmente nachgewiesen werden (Fazeli *et al.*, 1994; Hoffman *et al.*, 1998; Hoffman, 1998).

Nicht nur in physiologischen Situationen spielen lösliche NCAM-Formen eine Rolle, sie scheinen auch in die Pathogenese von zahlreichen Erkrankungen involviert zu sein. Eine lösliche Form des NCAMs ist im Serum von Lungenkrebs-Patienten nachweisbar (Jaques *et al.*, 1993; Takamatsu *et al.*, 1994). Erhöhte

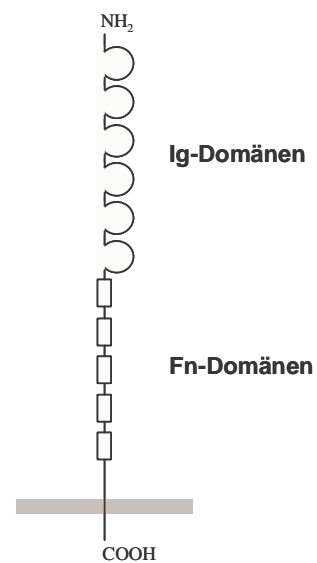
Mengen von löslichen NCAM-Fragmenten sind darüber hinaus in der Zerebrospinalflüssigkeit von Schizophrenie-Patienten und Patienten mit altersbedingter Demenz gefunden worden (Poltorak *et al.*, 1995).

#### 1.4.2 Das Zelladhäsionsmolekül L1

Das Zelladhäsionsmolekül L1, ein transmembranes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 200 kDa wurde zu Beginn der 80er Jahre im Nervensystem entdeckt (Salton *et al.*, 1983; Lindner *et al.*, 1983; Grumet und Edelman, 1984; Rathjen und Schachner, 1984) und ist Begründer einer Untergruppe der Ig-Superfamilie, der L1-Familie, die aus vier Mitgliedern besteht: L1, NrCAM (*neuron-glia cell adhesion molecule related cell adhesion molecule*), Neurofascin, CHL1 (*close homologue of L1*) und Neuroglian (**Abb. 1.10**).

Das Molekül L1 wurde im Zentralen Nervensystem auf einer Gruppe von sich entwickelnden Neuronen, aber auch auf Axonen zahlreicher Nervenzellen des adulten Nervensystems nachgewiesen. Im peripheren Nervensystem wird L1 darüber hinaus von Schwannschen Zellen exprimiert (Seilheimer und Schachner, 1988; Martini *et al.*, 1994).

Mutationen in dem für das Molekül L1 kodierenden Gen führen zu einer x-chromosomal rezessiv vererbaren neurologischen Erkrankung, dem **CRASH-Syndrom**. Die Abkürzung CRASH steht für *c*orpus *c*allosum *h*ypoplasia, *m*ental *r*etardation, *a*dducted *t*humbs, *s*pasticity *p*araplegia and *h*ydrocephalus und fasst die für diese Erbkrankheit charakteristischen Symptome zusammen (Fransen *et al.*, 1995). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden mehr als 100 verschiedene pathogene Mutationen in dem L1-Gen identifiziert. Von der Krankheit betroffene



**Abb. 1.10: Schematische Darstellung des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls L1.** Mitglieder der L1-Familie besitzen sechs Ig-artige Domänen und mindestens vier Fibronketindomänen, verbunden mit einer Transmembrandomäne und gefolgt von einer phylogenetisch stark konservierten zytoplasmatischen Domäne.

Patienten zeigen ein sehr komplexes Krankheitsbild, neben dem oftmals auftretenden Hydrocephalus und geistiger Unterentwicklung können als weitere Symptome eine Paraplegie der unteren Extremitäten, möglicherweise als Folge einer Hypoplasie des kortikospinalen Traktes, eine Hypoplasie des Corpus Callosum und / oder angewinkelte Daumen angeführt werden. Charakteristisch für das Krankheitsbild des CRASH-Syndroms ist ein sehr variabler Phänotyp, so kann selbst auch in betroffenen Familien die Schwere der Krankheit variieren. Eine Genotyp-Phänotyp-Relation scheint zu fehlen. Um ein Tiermodell für das CRASH-Syndrom zu etablieren, wurden Maus-Mutanten mit einer Mutation in dem L1-Gen hergestellt. L1-defiziente Mäuse zeigen ähnliche Defekte, die auch bei Patienten festgestellt wurden, die von der Erkrankung des CRASH-Syndroms betroffen sind (**Tab. 1.6**).

**Tab. 1.6: Die L1-defiziente Maus - Ein Tiermodell für das CRASH-Syndrom**

Phänotyp der L1-defizienten Maus (Dahme *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1998):

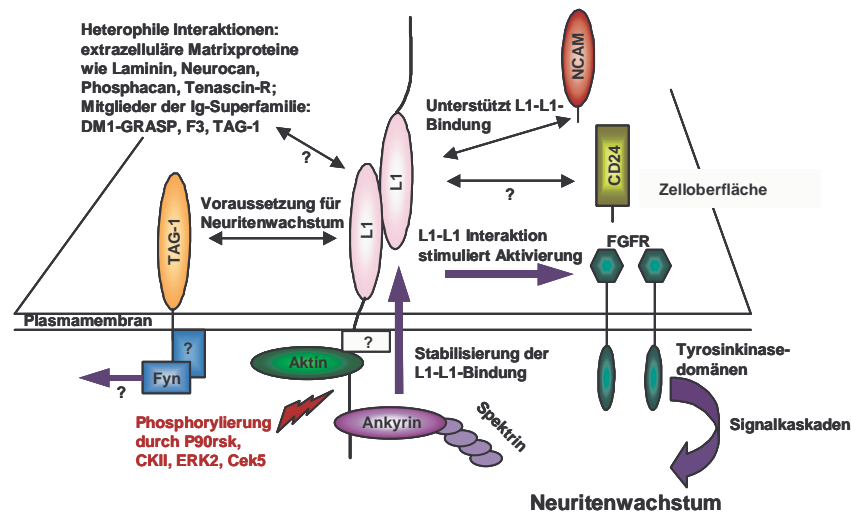
- verringerte Lebensspanne (in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes der Mäuse)
- lokomotorische Defizite
- gestörtes räumliches Lernvermögen (Fransen *et al.*, 1998)

Morphologische Defekte im Nervensystem von L1-Mutanten (Dahme *et al.*, 1997):

- Signifikante Erweiterung der Ventrikel (in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes der Mäuse)
- Hypoplasie des kortikospinalen Traktes und des Corpus Callosum
- Hypoplasie des Vermis Cerebelli

L1 ist in zahlreiche Prozesse des sich entwickelnden und adulten Nervensystems involviert, wie der Zellmigration (Lindner *et al.*, 1983; Asou *et al.*, 1992), dem Axonwachstum (Fischer *et al.*, 1986; Lagenaur und Lemmon, 1987), der Axonfaszikulierung (Chang *et al.*, 1987; Kunz *et al.*, 1996), der Synaptogenese und der Myelinisierung von Neuronen (Wood *et al.*, 1990). Darüber hinaus greift es in Prozesse wie die Regeneration von Nervenzellen (Martini und Schachner, 1988) und das Zellüberleben ein. L1 wird auch eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisleistungen zugeschrieben (Rose, 1995; Luthi *et al.*, 1996).

Die Funktionen von L1 scheinen vor allem durch homophile und heterophile Interaktionen vermittelt zu werden (**Abb. 1.11**). Zu den Bindungspartnern des L1-Moleküls zählen verschiedene Formen der Integrine (Ruppert *et al.*, 1995; Ebeling



**Abb. 1.11:** L1 ist nicht nur ein adhäsives Molekül, sondern auch ein signaltransduzierender Rezeptor (Kenwrick *et al.*, 2000). Die homophile Interaktion zweier L1-Moleküle *in trans* initiiert L1-abhängiges Neuritenwachstum durch die Aktivierung von FGF-Rezeptoren (Doherty und Walsh, 1996; Saffell *et al.*, 1997; Brittis *et al.*, 1996). Darüber hinaus interagiert die zytoplasmatische Domäne mit dem Zytoskelett und unterstützt so Vorgänge wie die Zelladhäsion, die essentiell für die Faszikulierung von Axonen und das Neuritenwachstum sind (Dahlin-Huppe *et al.*, 1997). Die Interaktion mit dem Zytoskelett wird über eine Ankyrin-Bindungsdomäne in der zytoplasmatischen Domäne vermittelt (Davis und Bennett, 1994). Weiterhin konnte für L1 eine Interaktion mit Aktin- und Myosin-stress fibers nachgewiesen werden. Die zytoplasmatische Domäne kann durch verschiedene Kinasen: *casein kinase II*, *p90rsk* (Wong *et al.*, 1996) und *Eph kinase Cdk5* (Zisch *et al.*, 1997) phosphoryliert werden.

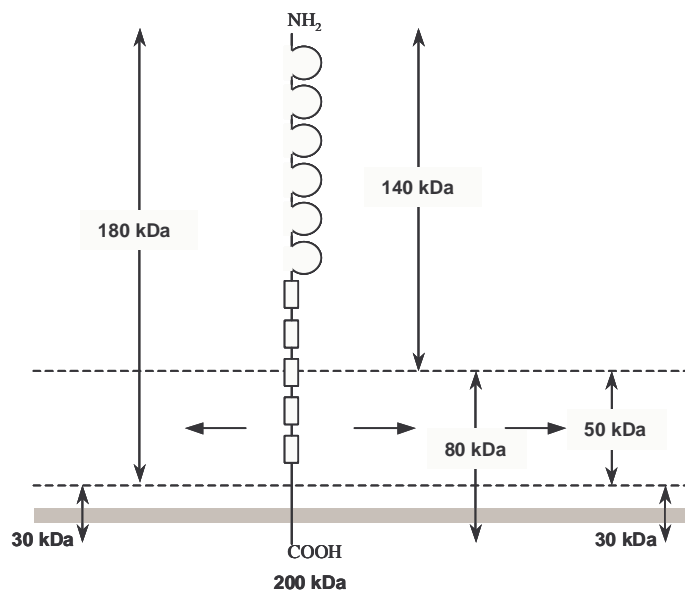
*et al.*, 1996), sowie Komponenten der EZM wie Laminin und zahlreiche Proteoglykane, wie Neurocan und Phosphacan (Friedlander *et al.*, 1994; Brummendorf und Rathjen, 1996; Kadmon und Altevogt, 1997; Kamiguchi und Lemmon, 1997). Weiterhin interagiert das L1-Molekül mit Liganden wie Contactin (F3/F11) (Brummendorf *et al.*, 1993), DM1-GRASP (DeBernardo und Chang, 1996), und TAG-1 (Axonin-1) (Kuhn *et al.*, 1991; Kunz *et al.*, 1996). Interaktionen mit L1 konnten auch für die Moleküle NCAM (Kadmon *et al.*, 1990), CD9 (Schmidt *et al.*, 1996) sowie für CD24 (Nectadrin) (Kadmon *et al.*, 1995; Sammar *et al.*, 1997) nachgewiesen werden.

### 1.4.3 Das Zelladhäsionsmolekül L1 und seine Spaltprodukte

Neben der membrangebundenen 200 kDa Form L1-200 konnten weitere L1-Formen detektiert werden, die durch die regulierte Prozessierung der

extrazellulären Domäne des Moleküls entstehen (Richter-Landsberg *et al.*, 1984; Montgomery *et al.*, 1996). Einen Überblick über die durch Proteolyse entstehenden, nach ihrem Molekulargewicht benannten, löslichen L1-Fragmente gibt **Abb. 1.12**.

Lösliche Formen des L1 Moleküls konnten in den Überständen von Gehirnhomogenaten der Maus (Rathjen und Schachner, 1984; Faissner *et al.*, 1985; Sadoul *et al.*, 1988), der Ratte (Liljelund *et al.*, 1994) und des humanen Kleinhirns (Wolff *et al.*, 1988) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden lösliche L1-Fragmente in Zellkulturüberständen von humanen und murinen Tumorzelllinien detektiert (Montgomery *et al.*, 1996; Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et*



**Abb. 1.12: Lösliche Fragmente des Moleküls L1 entstehen durch die regulierte Proteolyse der extrazellulären Domäne.** Die Spaltung in der dritten Fibronektindomäne führt zu der Entstehung eines löslichen 140 kDa-Fragmentes (L1-140) und eines membranengebundenen 80 kDa-Fragmentes (L1-80). Eine weitere Spaltstelle ist in der Nähe der Transmembrandomäne lokalisiert. Durch die Spaltung des 200 kDa Moleküls (L1-200) und des 80 kDa-Fragmentes in der Nähe des Membranankers werden zwei weitere lösliche Fragmente mit einem Molekulargewicht von 180 kDa und 50 kDa (L1-50), sowie ein membranständiges 30 kDa-Fragment (L1-30) generiert.

*et al.*, 2000). Eine Disregulation der Spaltung des Zelladhäsionsmoleküls scheint in die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen involviert zu sein. So wurden nicht nur im Serum von an Ovar- oder Uteruskarzinomen, an Nierentumoren (Meli *et al.*, 1999) und an Neuroblastomen (Hoefnagel *et al.*, 2001) erkrankten Patienten, sondern auch in der Zerebrospinalflüssigkeit von Alzheimer-Patienten (Nybroe *et al.*, 1989) erhöhte Mengen löslicher L1-Fragmente gefunden.

Die durch die Spaltung in der dritten Fibronektindomäne (Moos *et al.*, 1988) entstehenden 140 kDa- und 80 kDa-Fragmente können *in vitro* durch Plasmin (Silletti *et al.*, 2000) oder Trypsin (Sadoul *et al.*, 1988) generiert werden. Die dritte Fibronektindomäne des L1-Moleküls besitzt zwei RGD-unabhängige Integrin-Bindungsmotive, die in der Vermittlung der homophilen Interaktion (Holm *et al.*,

---

1995), dem Neuritenwachstum (Stallcup, 2000) und der Multimerisierung von L1 (Nayeem *et al.*, 1999; Silletti *et al.*, 2000) eine Rolle spielen. Die Spaltung dieser Domäne mittels Plasmin führt zu einer Reduktion der Multimerisierung und der RGD-unabhängigen Integrin-Bindung (Nayeem *et al.*, 1999; Silletti *et al.*, 2000). Die Fragmente L1-180 und L1-50 entstehen durch die Spaltung des membrangebundenen L1-Moleküls in der Nähe des Membranankers. Für die Spaltung der extrazellulären Domäne scheint eine Metalloprotease, vermutlich ein Mitglied der ADAM-Familie (s. 1.2.1.1) (Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2000) verantwortlich zu sein. Die Spaltung der extrazellulären Domäne von L1 unterstützt die L1-vermittelte Zellmigration (Gutwein *et al.*, 2000).

## 1.5 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Mechanismus der Entstehung löslicher Fragmente der Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM weiter aufzuschlüsseln, ihre Bedeutung für physiologische Prozesse des Zentralen Nervensystems zu untersuchen und anhand der Ergebnisse das Gesamtbild der Funktion der Moleküle L1 und NCAM für die Entwicklung des Nervensystems und darüber hinaus auch im adulten Organismus zu vervollständigen.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden folgende Arbeitsschritte geplant:

1. Identifizierung der für die Entstehung löslicher Fragmente der Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM verantwortliche Protease
2. Analyse der für die Freisetzung löslicher L1- und NCAM-Fragmente zugrunde liegenden Regulationsmechanismen
3. Untersuchung des Einflusses regulierter Prozessierung der Moleküle L1 und NCAM für das von ihnen vermittelte Neuritenwachstum

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Grundchemikalien in analysenreiner Qualität (p.a.) von folgenden Herstellern bezogen:

- Invitrogen (Karlsruhe)
- Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe)
- Merck (Darmstadt)
- Serva (Heidelberg)
- Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Alle verwendeten Lösungen wurden mit sterilem, deionisiertem Wasser angesetzt.

### 2.2 Zelllinien

Die folgende Tabelle (**Tab. 2.1**) liefert einen Überblick über die verwendeten Zelllinien und deren Eigenschaften.

**Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften**

Zelllinie	Herkunft	Referenz
" <i>chinese hamster ovary</i> " (CHO)	Dehydrofolatreduktase - defiziente Hamsterzelllinie	ATCC CRL-9096 (Stanley und Siminovitch, 1977)
Neuroblastoma 2a (Neuro 2a)	Maus Neuroblastoma - Zelllinie, etabliert von einem spontanen Tumor eines Albino A Mäusestammes	-/-

## 2.3 Kultivierung und Langzeitlagerung von Zellen

Für die Kultivierung und Langzeitlagerung der „*chinese hamster ovary*“ (CHO)-Zelllinie wurde „*Glasgow's Minimal Essential Medium*“ [GME-Medium (PAA Laboratories, Cölbe)] verwendet. Dem Basalmedium GMEM wurden die der **Tab. 2.2** zu entnehmenden Zusätze hinzugefügt.

**Tab. 2.2: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der CHO-Zelllinie**

Zusatz	Konzentration	Herkunft
„ <i>Glasgow's Minimal Essential</i> (GME)“-Medium	1 x	PAA Laboratories (Cölbe)
Fötale Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)	PAA Laboratories (Cölbe)
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM	PAA Laboratories (Cölbe)
L-Glutamin (200 mM)	2 mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	1 x	Invitrogen (Karlsruhe)
„ <i>non essential aminoacids</i> “ (100 x)	1 x	Invitrogen (Karlsruhe)
Glutamat / Aspartat (100 x)	1 x	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nucleoside (50 x)	1 x	Invitrogen (Karlsruhe)

Für die Kultivierung und Langzeitlagerung der „*Neuroblastoma 2a*“ (Neuro 2a)-Zelllinie wurde „*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“ [DME-Medium (PAA Laboratories, Cölbe)] verwendet. Das Basalmedium wurde durch die der **Tab. 2.3** zu entnehmenden Zusätze supplementiert.

**Tab. 2.3: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der Neuro 2a-Zelllinie**

Zusatz	Konzentration	Herkunft
„ <i>Dulbecco's Modified Eagle</i> (DME)“-Medium (hoher Glucosegehalt 4,5 g/l)	1 x	PAA Laboratories (Cölbe)
Fötale Kälberserum (hitzeinaktiviert)	10 % (v/v)	PAA Laboratories (Cölbe)
Natriumpyruvat (100 mM)	1 mM	PAA Laboratories (Cölbe)

Zusatz	Konzentration	Herkunft
L-Glutamin (200 mM)	2 mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Penicillin (10.000 Units/ml) / Streptomycin (10 mg/ml) (100 x)	1 x	Invitrogen (Karlsruhe)

### 2.3.1 Kultivierung

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %.

Die für die Kultivierung der Zelllinien verwendeten Kulturflaschen mit einer Größe von 75 cm<sup>2</sup> wurden von der Firma Nunc (Wiesbaden) bezogen.

Die Passage der Zellen wurde bei 80 - 90 %iger Konfluenz der Zellen durchgeführt. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit „Hank's gepufferter Salz-Lösung (HBSS)“ (PAA Laboratories, Cölbe) gewaschen. Das Ablösen der Zellen von dem Boden der Kulturflaschen erfolgte bei Raumtemperatur (RT) durch die 2 - 5-minütige Inkubation der Zellen mit Versen (1:5000, Invitrogen, Karlsruhe). Den abgelösten Zellen wurde Kulturmedium (s. 2.3) hinzugefügt und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die in der Zellsuspension enthaltenen Zellen wurden durch Zentrifugation für 8 min bei 200 x g und RT sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in Kulturmedium (s. 2.3) resuspendiert und in dem Verhältnis 1:3 ausgesät.

### 2.3.2 Langzeitlagerung

Für die Lagerung der Zellen über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen einer konfluenten Kulturflasche wie in **Kapitel 2.3.1** beschrieben mit HBSS gewaschen, durch Inkubation mit Versen vom Boden der Kulturflasche abgelöst und durch Zentrifugation sedimentiert. Im Anschluss an den Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 % DMSO-haltigem Kulturmedium (s. 2.3) aufgenommen. Aliquots der einzufrierenden Zellen wurden in speziellen Einfrierbehältern langsam auf eine Temperatur von -80 °C heruntergekühlt.

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff.

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt.

## 2.4 *E. coli*-Stämme

Die folgende Tabelle (**Tab. 2.4**) liefert einen Überblick über die verwendeten *E. coli*-Stämme und deren Eigenschaften.

**Tab. 2.4: Verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften**

Stamm	Genotyp und relevanter Phänotyp	Herkunft / Referenz
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	SupE44 $\Delta$ lac169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Clontech (Heidelberg)

## 2.5 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*

Für die Stammhaltung und Kultivierung wurde LB-Medium (s. 2.11) verwendet.

Rekombinante *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium (s. 2.11) kultiviert, das mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde.

### 2.5.1 Stammhaltung

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

## 2.5.2 Kultivierung

Zum Beimpfen von Flüssigkulturen wurden unter anderem auch Stammkulturen auf LB-Agar (s. 2.11), der im Fall rekombinanter Stämme mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurde, angelegt. Diese wurden über Nacht (ü.N.) bei 37 °C inkubiert und bei 4 °C bis zu 8 Wochen gelagert.

Für die Anzucht von 2,5 - 10 ml Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten in Flüssigkulturen überimpft, die im Fall von rekombinanten *E. coli*-Stämmen mit den entsprechenden Antibiotika versetzt wurden. Die Inkubation der angeimpften Flüssigkulturen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C und 225 rpm ü.N. in einem Schüttelinkubator.

## 2.6 Plasmide

Die den Expressionskonstrukten (s. 2.7) zugrunde liegenden Plasmide und ihre Eigenschaften sind der **Tab. 2.5** zu entnehmen. Die Plasmidkarten der entsprechenden Plasmide sind im Anhang angefügt.

**Tab. 2.5: Verwendete Plasmide und ihre Charakteristika**

Plasmide	Charakteristika	Herkunft/ Referenz
pcDNA3 (5400 bp)	CMV-Promotor; f1-origin; Ampicillinresistenz-Gen; Neomycinresistenz-Gen; SV40-Promotor; ColE1 origin, BGH pA	Invitrogen (Karlsruhe)
pRc/CMV (5500 bp)	CMV-Promotor; f1-origin; Ampicillinresistenz-Gen; Neomycinresistenz-Gen; SV40-Promotor; ColE1 origin, BGH pA	Invitrogen (Karlsruhe)

## 2.7 Expressionskonstrukte

Die in den Transfektionsexperimenten verwendeten Expressionskonstrukte und ihre Eigenschaften sind der **Tab. 2.6** zu entnehmen.

Tab. 2.6: Verwendete Expressionskonstrukte und ihre Charakteristika

Insert	Spezies	Plasmid	Größe des Inserts	Klonierungsstelle (5')	Klonierungsstelle (3')
<b>E-GFP</b> <i>(enhanced green fluorescent protein)</i>	-	pcDNA3	-	-	-
<b>Furin</b>	Mensch	pcDNA3	2500 bp	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV*</i>
<b>NCAM120</b> <i>(neural cell adhesion molecule 120)</i>	Maus	pcDNA3	2200 bp	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRI</i>
<b>NCAM140</b> <i>(neural cell adhesion molecule 140)</i>	Ratte	pcDNA3	2600 bp	<i>Apal</i>	<i>EcoRI</i>
<b>NCAM180</b> <i>(neural cell adhesion molecule 180)</i>	Ratte	pcDNA3	3400 bp	<i>EcoRI</i>	<i>Ehl</i>
<b>PC1</b> <i>(prohormon-convertase 1)</i>	Maus	pRc/CMV	2500 bp	blunt	blunt
<b>PC2</b> <i>(prohormon-convertase 2)</i>	Maus	pRc/CMV	2000 bp	blunt	blunt
<b>PC5A</b> <i>(prohormon-convertase 5A)</i>	Maus	pRc/CMV	2800 bp	<i>HindIII</i>	<i>XbaI</i>
<b>PC7</b> <i>(prohormon-convertase 7)</i>	Ratte	pRc/CMV	3500 bp	<i>HindIII</i>	<i>XbaI</i>
<b>PACE4</b> <i>(paired basic amino acid cleaving system 4)</i>	Mensch	pcDNA3	2900 bp	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i>
<b>TACE</b> <i>(TNF-<math>\alpha</math> converting enzyme)</i>	Maus	pcDNA3	2500 bp	?	?
<b>dTACE</b> <i>(deficient TACE)</i>	Maus	pcDNA3	1100 bp	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i>

\*Verlust der *EcoRV*-Schnittstelle durch Konstruktion

Das pcDNA3-E-GFP-Expressionskonstrukt wurde von der Firma Clontech (Heidelberg) bezogen.

Die Expressionskonstrukte pRc/CMV-PC1, pRc/CMV-PC2, pRc/CMV-PC4, pRc/CMV-PC5A, pcDNA3-PACE4 sowie das Expressionskonstrukt pcDNA3-Furin wurden freundlicherweise von Dr. N. G. Seidah (Clinical Research Institute of Montreal, Québec, Kanada) zur Verfügung gestellt.

Das pcDNA3-NCAM120-Konstrukt wurde durch Ausschneiden der NCAM120-DNS aus pMV7-N1 (erhalten von Dr. E. Bock, University of Copenhagen, Dänemark) mit *EcoRI* und anschließender Ligation in den *EcoRI*-linearisierten pcDNA3-Vektor hergestellt.

Die Expressionskonstrukte pcDNA3-NCAM140 und pcDNA3-NCAM180 wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. P. Maness (University of South Carolina, USA) und das pcDNA3-TACE-Konstrukt von Dr. A. Pandiella (Universidad de Salamanca, Salamanca, Spanien) zur Verfügung gestellt.

Das pcDNA3-dTACE-Konstrukt kodiert für eine Protease-defiziente Form des *TNF- $\alpha$  converting enzyme* (TACE). Die dominant-negative Form von TACE enthält kodierende Regionen für die Disintegrin- und EGF-ähnliche Domäne, gefolgt von

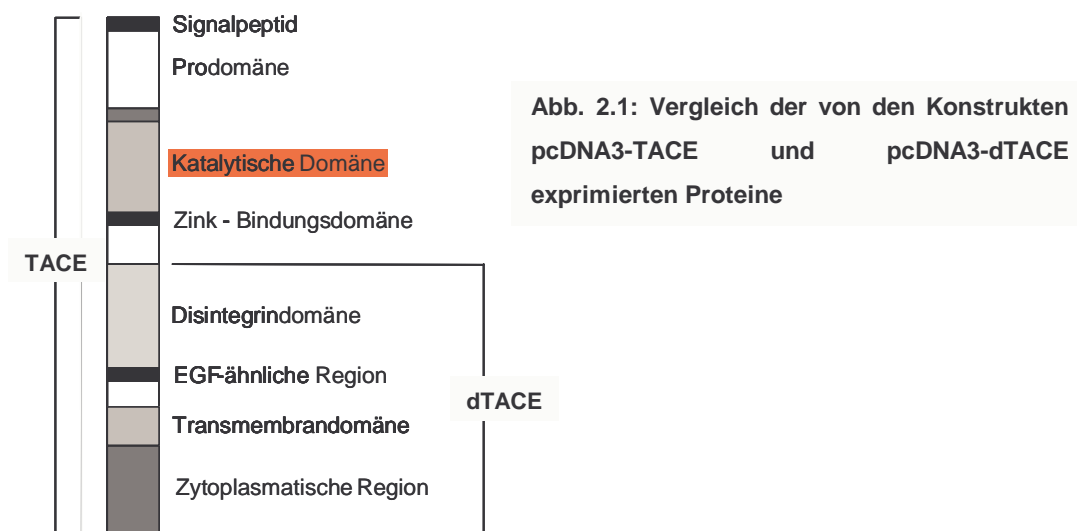


Abb. 2.1: Vergleich der von den Konstrukten pcDNA3-TACE und pcDNA3-dTACE exprimierten Proteine

einer Transmembrandomäne, der sich die zytoplasmatische Region des Proteins TACE anschließt. Ein Vergleich der von den Konstrukten pcDNA3-TACE und pcDNA3-dTACE exprimierten Proteine ist der **Abb. 2.1** zu entnehmen. Die Konstruktion des pcDNA3-dTACE-Expressionskonstruktes wurde von Dr. U. Bohrmann am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg durchgeführt.

## 2.8 Antibiotika

Eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika gibt die **Tab. 2.7**. Die Antibiotika wurden vor Gebrauch den Nährmedien aus sterilfiltrierten Stammlösungen zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden die Antibiotika dem Medium nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 40 °C hinzugefügt.

Tab. 2.7: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Herkunft
Ampicillin	100 µg/ml	Roche Diagnostics (Mannheim)

## 2.9 Antikörper

### 2.9.1 Primärantikörper

Die **Tab. 2.8** gibt eine Übersicht über die verwendeten Primärantikörper und ihre Charakteristika.

Tab. 2.8: Verwendete Primärantikörper und ihre Charakteristika

Bezeichnung	Spezies	Epitop	Verdünnung ELISA (s. 3.1.13)	Verdünnung Immunoblot- Analyse (s. 3.1.3)
<b>L1</b>	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von L1-Fc	-	1:4000
<b>L1 555</b> (Appel et al., 1995)	Ratte	extrazelluläre Domäne von L1, Aminosäuresequenz zwischen der 2. und 3. Fibronektindomäne	-	1:1000
<b>L1 2c2</b>	Maus	intrazelluläre Domäne von L1 und CHL-1 ( <i>close homologue of L1</i> )	-	1:2000
<b>NCAM 2B2</b>	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von NCAM	-	1:5000

Bezeichnung	Spezies	Epitop	Verdünnung ELISA (s. 3.1.13)	Verdünnung Immunoblot- Analyse (s. 3.1.3)
<b>NCAM 5B8</b>	Maus	intrazelluläre Domäne NCAM 140 und NCAM 180	von 1:1000	-
<b>NCAM D3</b>	Maus	intrazelluläre Domäne NCAM 180 (Exon 18)	von 1:500	1:1000
<b>TACE</b>	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von TACE ( <i>TNF<math>\alpha</math> converting enzyme</i> )	-	1:2000
<b>GAPDH</b>	Maus	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	-	1:2000
<b>PSA</b>	Maus	Polysialinsäure	-	1:2000

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

Der anti-TACE-Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. S. J. Frank (University of Alabama at Birmingham, Birmingham, USA) zur Verfügung gestellt.

Der Antikörper gerichtet gegen GAPDH wurde von Chemicon (Hofheim), der anti-NCAM-Antikörper 5B8 von Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa / Biological Sciences, Iowa City, USA) bezogen.

### 2.9.2 Sekundärantikörper

Die für die Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) und für ELISA-Experimente (s. 3.1.13) verwendeten Sekundärantikörper wurden von Dianova (Hamburg) bezogen.

Die eingesetzten Antikörper waren mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt und wurden in der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) in einer Verdünnung von 1:10000 und im ELISA (s. 3.1.13) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

## 2.10 Inhibitoren

Die in den Experimenten verwendeten Inhibitoren und ihre Eigenschaften sind der **Tab. 2.9** zu entnehmen.

**Tab. 2.9: Verwendete Inhibitoren**

<b>Name</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Herkunft</b>
<i>1,10-o-Phenanthrolin</i>	200 µM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Aprotinin</i>	1 µM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>CGS 9343 B</i>	10 - 20 µM	Novartis Consumer Health (Nyon, Schweiz)
<i>Colchicin</i>	1 - 5 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>“Complete - EDTA free”</i>	1 Tablette / 50 ml	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Cytochalasin D</i>	1 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>DAPT</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>GM 6001</i>	10 - 20 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Jasplakinolid</i>	1 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Latrunculin B</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Leupeptin</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>MG-132</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Pepstatin</i>	1 µM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

## 2.11 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

<b>Homogenisierungspuffer</b>	1mM CaCl <sub>2</sub>
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 mM Tris, pH 7,5
	0,32 M Saccharose
<b>LB-Medium</b>	10 g Bacto-Trypton
	5 g Hefeextrakt

---

	10 g NaCl
	ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O
	pH 7,5
<b>LB-Agar</b>	Zusammensetzung s. LB-Medium, zusätzlich 1 % (w/v) Agar
<b>Probenpuffer für PAGE</b> (4 x Laemmli-Puffer)	100 mM Tris/HCl, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % Glycerol 0,0005 % (w/v) Bromphenolblau + 4 % (w/v) DTT
<b>PBS</b>	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O pH 7,3
<b>TE-Puffer</b>	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 10 mM EDTA

## 3 Methoden

### 3.1 Biochemische Methoden

#### 3.1.1 Eindimensionale SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

(Laemmli, 1970)

##### Lösungen:

- |                        |                                                                          |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| (1) APS                | 10 % (w/v) APS in dH <sub>2</sub> O                                      |
| (2) Sammelgelpuffer    | 1 M Tris/HCl, pH 6,8                                                     |
| (3) Trenngelpuffer     | 2 M Tris/HCl, pH 8,8                                                     |
| (4) SDS                | 20 % (w/v) in dH <sub>2</sub> O                                          |
| (5) 1 x SDS-Laufpuffer | 3 g Tris/HCl<br>14,4 g Glycin<br>1 g SDS<br>ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O |

##### Durchführung:

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

Die Zusammensetzungen der Trenngel und des Sammelgels sind der **Tab. 3.1** zu entnehmen. Es wurden 7,5 %ige und 12,5 %ige Gele verwendet.

**Tab. 3.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngellösungen**

	Sammelgel; 5 %	Trenngel; 7,5 %	Trenngel; 12,5 %
30% PAA [30 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)]	0,83 ml	2 ml	3,335 ml
1M Tris/HCl, pH 6,8	0,625 ml	-	-
2M Tris/HCl, pH 8,8	-	1,49 ml	1,49 ml
20 % SDS	25 µl	40 µl	40 µl
dH <sub>2</sub> O	3,425 ml	4,45 ml	3,1 ml
TEMED	5 µl	4 µl	4 µl
APS	40 µl	24 µl	24 µl
Gesamtvolumen	5 ml	8 ml	8 ml

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit Probenpuffer (6) versetzt, bei 95 °C für 5 min erhitzt und kurz zentrifugiert. Als Größenvergleich wurde zusätzlich ein Proteinmarker [*BenchMark<sup>TM</sup> Pre-stained Protein Ladder* (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe)] aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde für das Sammelgel bei 80 V durchgeführt. Beim Übergang der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 130 V erhöht.

Nach elektrophoretischer Auftrennung können Proteine unspezifisch und direkt auf dem Gel angefärbt [Coomassie- oder Silberfärbung (s. 3.1.2)] oder mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) spezifisch über einen Antikörper nachgewiesen werden.

### 3.1.2 Silberfärbung

(Heukeshoven und Dernick, 1988)

#### Lösungen:

- |                        |                                                                          |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| (1) Fixierungslösung   | 300 ml Ethanol                                                           |
|                        | 100 ml Essigsäure                                                        |
|                        | ad 1l dH <sub>2</sub> O                                                  |
| (2) Inkubationslösung  | 75 ml Ethanol                                                            |
|                        | 17 g NaAc                                                                |
|                        | 1,25 ml Glutaraldehyd (25% w/v)                                          |
|                        | 0,5 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O |
|                        | ad 250 ml dH <sub>2</sub> O                                              |
| (3) Silberlösung       | 0,5 g AgNO <sub>3</sub>                                                  |
|                        | 50 µl Formaldehyd (37 % w/v)                                             |
|                        | ad 250 ml dH <sub>2</sub> O                                              |
| (4) Entwicklungslösung | 7,5 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                    |
|                        | 30 µl Formaldehyd (37 % w/v)                                             |
|                        | ad 300 ml dH <sub>2</sub> O, pH > 11,5                                   |
| (5) Stop-Lösung        | 2,5 g Glycin                                                             |
|                        | ad 250 ml dH <sub>2</sub> O                                              |

#### Durchführung:

Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das Gel für mind. 30 min in der Fixierungslösung (1) und im Anschluss für 30 min oder ü.N. in der Inkubationslösung (2) inkubiert. Daraufhin wurde das Gel für jeweils 5 min dreimal

mit Wasser gewaschen und eine Inkubation mit der Silberlösung (3) für einen Zeitraum von 20 min angeschlossen. Nach einem kurzen Waschschrift mit Wasser wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Entwicklungslösung (4) sichtbar gemacht. Die Entwicklungszeit beträgt in der Regel 3 - 7 min. Die Reaktion wurde durch den Austausch der Entwicklungslösung (4) gegen die Stop-Lösung (5) beendet.

Zur Langzeitlagerung wurde das Gel im Anschluß an die Silberfärbung getrocknet.

### 3.1.3 Immunoblot-Analyse

(Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981)

#### 3.1.3.1 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

(Towbin *et al.*, 1979)

#### Lösungen:

- |                             |                                                               |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------------|
| (1) Blotpuffer              | 3 g Tris/HCl<br>14,4 g Glycin<br>ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O |
| (2) PBST                    | PBS (s. 2.11) + 0,1 % TWEEN 20                                |
| (3) 4 % Blockierungsreagenz | 4 % Magermilchpulver in PBST (2)                              |

#### Durchführung:

Bei der Immunoblot-Analyse werden Proteine durch SDS-Gelelektrophorese (s. 3.1.1) aufgetrennt und anschließend vom SDS-Gel auf eine Membran (Nitrocellulose bzw. PVDF) transferiert.



Tab. 3.2: Eingesetzte Antikörper und ihre Charakteristika

Bezeichnung	Spezies	Epitop	Verdünnung Immuno-Blot (s. 3.1.3)
<b>L1</b>	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von L1-Fc	1:4000
<b>L1 555</b>	Ratte	extrazelluläre Domäne von L1, Aminosäuresequenz zwischen 2. und 3. Fibronektindomäne	1:1000
<b>L1 2c2</b>	Maus	intrazelluläre Domäne von L1 und CHL-1 ( <i>close homologue of L1</i> )	1:2000
<b>NCAM 2B2</b>	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von NCAM	1:5000
<b>NCAM D3</b>	Maus	intrazelluläre Domäne von NCAM 180 (Exon 18)	1:1000
<b>TACE</b>	Kaninchen	extrazelluläre Domäne von TACE ( <i>TNF<math>\alpha</math> converting enzyme</i> )	1:2000
<b>GAPDH</b>	Maus	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	1:2000
<b>PSA</b>	Maus	Polysialinsäure	1:2000

Die eingesetzten Sekundärantikörper (s. 2.9.2) waren mit dem Markerenzym Meerrettichperoxidase (HRP) kovalent gekoppelt und wurden in der Immunoblot-Analyse in einer Verdünnung von 1:10000 in PBST (1) eingesetzt.

### 3.1.3.3 ECL-Färbung

Die Nachweisreaktion erfolgte über die an den Zweitantikörper kovalent gebundene Meerrettichperoxidase, die katalytisch chemilumineszente Substrate umsetzt.

#### Durchführung:

Nach Beendigung der Waschschriffe wurde die zuvor im Verhältnis 1:1 gemischte Chemilumineszenzlösung [*ECL<sup>TM</sup> Western Blotting detection reagents*, Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) bzw. *Super Signal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate*, Pierce (Bonn)] auf die Membran gegeben und für ca. 1 min inkubiert. Anschließend wurde der Blot in einer Klarsichthülle in eine

Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm [Kodak® BioMax Light Film, Sigma-Aldrich (Taufkirchen)] aufgelegt, exponiert und entwickelt.

### **3.1.4 Proteinfällung**

#### **3.1.4.1 Proteinfällung nach Wessel**

(Wessel und Flugge, 1984)

#### **Lösungen:**

(1) Probenpuffer für PAGE      s. 2.11

#### **Durchführung:**

Die zu fällende Proteinlösung wurde mit 4 Volumina Methanol und anschließend mit einem Volumen Chloroform gemischt. Nach der Zugabe von 3 Volumina dH<sub>2</sub>O wurde der Ansatz erneut gemischt und für 3 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der methanollösliche Überstand wurde abgenommen, und zu der das Protein enthaltenden Interphase und der chloroformlöslichen Phase wurden 3 Volumina Methanol hinzugefügt, der Ansatz wiederum gut gemischt und erneut bei 16000 x g für 3 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Sediment getrocknet und anschließend in Probenpuffer für PAGE (1) aufgenommen. Die Proben wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

#### **3.1.4.2 Acetonfällung**

#### **Lösungen:**

(1) Probenpuffer für PAGE      s. 2.11

**Durchführung:**

Zur Fällung von Proteinlösungen wurde die Probe mit 7 Volumina eiskaltem Aceton vermischt und für mehr als 24 h bei -20 °C eingefroren. Die ausgefällten Proteine wurden für 30 min bei 3000 x g und 4 °C sedimentiert, der Überstand verworfen und das an der Luft getrocknete Sediment in Probenpuffer für PAGE (1) aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3).

**3.1.5 Proteinbestimmung (BCA-Test)**

(Smith *et al.*, 1985)

**Durchführung:**

Die Bestimmung der Konzentration von Proteingemischen wurde mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent Kits* der Firma Pierce (Bonn) in Mikrotiter-Platten durchgeführt. Zur Herstellung der BCA-Lösung wurden Reagenz A und B in dem Verhältnis 1:50 gemischt. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 210 µl. 10 µl der zu analysierenden Probe wurden mit 200 µl BCA-Lösung versetzt, der Ansatz gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 562 nm (ELISA-Reader, Micronaut Skan, Roche Diagnostics, Mannheim). Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Standardreihe bestehend aus 0 µg/ml - 2000 µg/ml BSA (0, 50, 100, 200, 500, 1000 und 2000 µg/ml) in oben beschriebener Weise angesetzt und mit den zu analysierenden Proben inkubiert. Mit Hilfe der linearen Regression wurde anhand der gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt.

### 3.1.6 Zellfraktionierung

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

#### 3.1.6.1 Herstellung eines Gehirnhomogenates aus Gesamtgehirn, Kleinhirn oder Hippocampus

##### Lösungen:

(1) Homogenisierungspuffer                      s. 2.11

##### Durchführung:

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Vergasung mit CO<sub>2</sub>. Die Schädeldecke wurde eröffnet und das Gehirn entnommen. Für die Herstellung eines Homogenates der Gehirnregionen des Kleinhirns bzw. des Hippocampus wurden die entsprechenden Gehirnregionen nach der Entnahme des Organs präpariert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Das entnommene Gehirn wurde in 3 ml Homogenisierungspuffer (1), das Kleinhirn bzw. der Hippocampus wurden in 100 µl Homogenisierungspuffer (1) überführt und in einem Glashomogenisator durch zehnmaliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Um Zellkerne und Zelltrümmer zu sedimentieren, wurde eine Zentrifugation des Homogenates für 15 min bei 1000 x g und 4 °C angeschlossen.

Die in dem Überstand des **Gesamtgehirnhomogenates** enthaltenen Proteine wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.1.9) analysiert.

Der Überstand des **Kleinhirn-**, sowie des **Hippocampus**homogenates wurde abgenommen und die darin enthaltenen Proteine mittels Proteinfällung nach Wessel (s. 3.1.4.1) präzipitiert. Eine Untersuchung der Proben erfolgte mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3).

Das in Homogenisierungspuffer (1) gelöste und homogenisierte **Sediment** wurde zur Isolierung von Fraktionen angereichert mit Synaptosomen von Moosfasern (s. 3.1.6.4) herangezogen.

### 3.1.6.2 Herstellung eines „17000 x g“-Überstandes und „17000 x g“-Sedimentes aus Gehirnhomogenat

#### Lösungen:

(1) Homogenisierungspuffer                      s. 2.11

#### Durchführung:

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Vergasung mit CO<sub>2</sub>. Die Schädeldecke wurde eröffnet und das Gehirn entnommen. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Präparation der einzelnen Gehirne erfolgte schrittweise. Je ein Gehirn wurde in 3 ml Homogenisierungspuffer (1) aufgenommen und in einem Glashomogenisator durch zehnmaliges Auf- und Abziehen des Teflonpistills homogenisiert. Die erhaltenen Homogenate wurden vereinigt und für 15 min bei 17000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in Homogenisierungspuffer (1) resuspendiert und erneut homogenisiert.

Der resultierende „**17000 x g**“-Überstand diente als Ausgangspunkt für die Isolierung von Fraktionen angereichert mit ER, Golgi-Apparat und glattem ER, sekretorischen Vesikeln und löslichen Proteinen (s. 3.1.6.3)

Das in Homogenisierungspuffer (1) gelöste und homogenisierte „**17000 x g**“-**Sediment** wurde mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.1.9) untersucht. Weiterhin wurde das „17000 x g“-Sediment zur Isolierung von Fraktionen angereichert mit Synaptosomen, Mitochondrien und Zellkernen (s. 3.1.6.5) herangezogen.

### 3.1.6.3 Isolierung von Fraktionen angereichert mit Endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi-Apparat und glattem ER, sekretorischen Vesikeln und löslichen Proteinen

#### Lösungen:

- |                             |                                                    |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| (1) Homogenisierungspuffer  | s. 2.11                                            |
| (2) 0,5 M Saccharoselösung  | 0,5 M Saccharose<br>ad Homogenisierungspuffer (1)  |
| (3) 0,86 M Saccharoselösung | 0,86 M Saccharose<br>ad Homogenisierungspuffer (1) |
| (4) 1,3 M Saccharoselösung  | 1,3 M Saccharose<br>ad Homogenisierungspuffer (1)  |
| (5) TE-Puffer               | s. 2.11                                            |
| (6) Probenpuffer für PAGE   | s. 2.11                                            |

#### Durchführung:

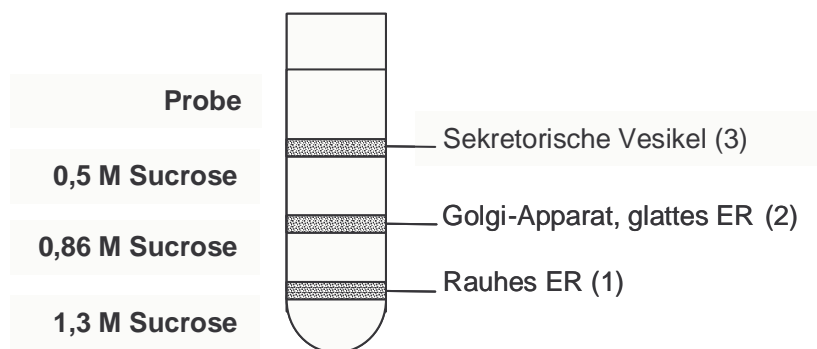
Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Fraktionen angereichert mit ER, Golgi-Apparat und glattem ER, sekretorischen Vesikeln und löslichen Proteinen diente der „17000 x g“-Überstand (s. 3.1.6.2). Für die Isolierung der Fraktionen wurden in der Regel 15 - 20 drei bis vier Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

Die Fraktion des „17000 x g“-Überstandes (s. 3.1.6.2) wurde für 1 h bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Der resultierende Überstand enthält lösliche Proteine des Zytosols sowie der extrazellulären Matrix (EZM) („**Fraktion der löslichen Proteine**“). Die „Fraktion der löslichen Proteine“ wurde mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.1.9) analysiert.

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



**Abb. 3.1: Aufbau des diskontinuierlichen Saccharosegradienten zur Isolierung von Fraktionen angereichert mit Endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi-Apparat und glattem ER und sekretorischen Vesikeln**

Glashomogenisator homogenisiert. Das resultierende Homogenat wurde auf einen Stufengradienten geschichtet, der sich aus den folgenden Saccharoselösungen zusammensetzte (vom Boden zur Öffnung des Zentrifugationsröhrchens): 1,3 M Saccharose (4), 0,86 M Saccharose (3) und 0,5 M Saccharose (2). Nach einem 2-stündigen Zentrifugationsschritt bei 100000 x g und 4 °C wurden die in den Interphasen der verschiedenen Saccharoselösungen gesammelten Fraktionen (**Abb. 3.1**), die mit ER (Fraktion 1), sowie mit Golgi-Apparat und glattem ER (Fraktion 2) und sekretorischen Vesikeln (Fraktion 3) angereichert waren, von oben nach unten d.h. von der Öffnung zum Boden des Zentrifugationsröhrchens abgenommen. Die resultierenden Fraktionen wurden mit Homogenisierungspuffer (1) in einem Mindestverhältnis von 1:2 gemischt und für 30 min bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das mit den verschiedenen Organellen angereicherte Sediment wurde in TE-Puffer (5) aufgenommen, mit Probenpuffer für PAGE (6) versetzt und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

### 3.1.6.4 Trennung in membranständige und membranassoziierte Proteine

#### Lösungen:

- |                                |                                    |
|--------------------------------|------------------------------------|
| (1) TE-Puffer                  | s. 2.11                            |
| (2) NaHCO <sub>3</sub> -Puffer | 0,3 M NaHCO <sub>3</sub> , pH 11,5 |
| (3) 50 mM Tris, pH 6,8         |                                    |
| (4) Probenpuffer für PAGE      | s. 2.11                            |

#### Durchführung:

Als Ausgangsmaterial für die Trennung von membranständigen und membranassoziierten Proteinen wurde eine mit ER angereicherte Fraktion (s. 3.1.6.3) verwendet.

Um assoziierte periphere Proteine von isolierten Membranen abzutrennen, wurden in TE-Puffer (1) resuspendierte isolierte ER-Membranen mit dem äquivalenten Volumen NaHCO<sub>3</sub>-Puffer (2) versetzt und für 2 h bei 4 °C extrahiert. Der Ansatz wurde für 30 min mit 100000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die peripheren Proteine enthält, wurde abgenommen. Das Sediment („gewaschene Membranen“ einschließlich der integralen Membranproteine) wurde in 50 mM Tris, pH 6,8 (3) aufgenommen. Nachdem sowohl der Überstand, als auch das Pellet mit Probenpuffer für PAGE (4) versetzt wurden, wurden die Proben mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

### 3.1.6.5 Isolierung von Fraktionen angereichert mit Synaptosomen bzw. Synaptosomen von Moosfasern, Mitochondrien und Zellkernen

#### Lösungen:

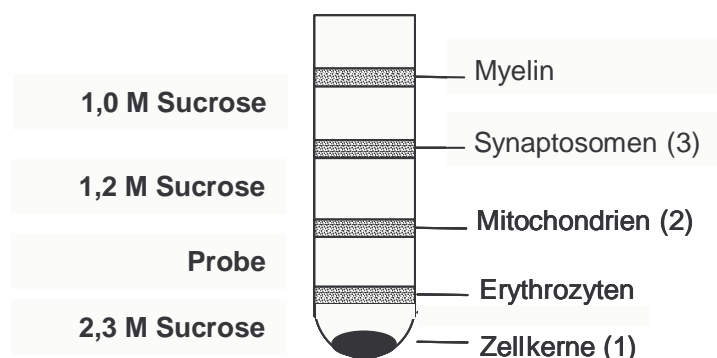
- |                               |                                                                      |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| (1) Homogenisierungspuffer    | s. 2.11                                                              |
| (2) Puffer Saccharosegradient | 1mM CaCl <sub>2</sub><br>1 mM MgCl <sub>2</sub><br>5 mM Tris, pH 7,5 |
| (3) 1,0 M Saccharoselösung    | 1,0 M Saccharose<br>ad Puffer Saccharosegradient (2)                 |
| (4) 1,2 M Saccharoselösung    | 1,2 M Saccharose<br>ad Puffer Saccharosegradient (2)                 |
| (5) 2,27 M Saccharoselösung   | 2,27 M Saccharose<br>ad Puffer Saccharosegradient (2)                |
| (6) 2,3 M Saccharoselösung    | 2,3 M Saccharose<br>ad Puffer Saccharosegradient (2)                 |
| (7) TE-Puffer                 | s. 2.11                                                              |
| (8) Lösung Roeder C           | s. 3.1.6.6                                                           |
| (9) Probenpuffer für PAGE     | s. 2.11                                                              |

Die Saccharoselösungen wurden ausgehend von einer 80 %igen Saccharoselösung (2,34 M Saccharose in dH<sub>2</sub>O) hergestellt.

**Durchführung:**

Das „17.000 x g“-Sediment (s. 3.1.6.2) wurde für die Isolierung von Fraktionen angereichert mit Synaptosomen, Mitochondrien und Zellkernen verwendet. Für die Isolierung der Fraktionen einschließlich der Fraktion „Synaptosomen von Moosfasern“ wurden in der Regel 15 - 20 drei bis vier Wochen alte Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet.

Das „17.000 x g“-Sediment wurde in Homogenisierungspuffer (1) resuspendiert, homogenisiert und in dem Verhältnis 1:2 mit 2,27 M-Saccharoselösung (5) gemischt. Der Ansatz wurde mit Hilfe eines diskontinuierlichen Saccharosegradienten in Fraktionen aufgetrennt, die mit Synaptosomen, Mitochondrien und Zellkernen angereichert waren. Der Gradient setzte sich wie folgt zusammen (vom Boden zur Öffnung des Zentrifugationsröhrchens)



**Abb. 3.2: Aufbau des diskontinuierlichen Saccharosegradienten zur Isolierung von Fraktionen angereichert mit synaptosomalen Membranen, Mitochondrien und Zellkernen**

(s. **Abb. 3.2**): 2,3 M Saccharose-Lösung (6), Probe, 1,2 M Saccharose-Lösung (4) und 1,0 M Saccharose-Lösung (3). Die Interphase zwischen der 2,3 M Saccharoselösung und der Probe wurde vor der Zentrifugation mit Hilfe einer Glaspasteurpipette gestört. Der Gradient wurde daraufhin einem Zentrifugationsschritt für eine Zeit von 2 h bei 100000 x g und 4 °C unterzogen. Die zwischen den Interphasen der verschiedenen Saccharoselösungen angereicherten Organellen (Fraktion 1: Zellkerne, Fraktion 2: Mitochondrien und Fraktion 3: Synaptosomen) wurden von der Öffnung zum Boden des Zentrifugationsröhrchens abgenommen. Die Fraktionen wurden mit Homogenisierungspuffer in einem Mindestverhältnis von 1:2 gemischt und die darin enthaltenen Organellen durch Zentrifugation für 30 min bei 100000 x g und 4 °C sedimentiert. Die angereicherten Organellen der einzelnen Sedimente

wurden in TE-Puffer (7) aufgenommen, mit Probenpuffer für PAGE (9) versetzt und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

Das mit Zellkernen angereicherte Sediment wurde zur Herstellung eines Zellkernextraktes (s. 3.1.6.6) in Lösung Roeder C (8) aufgenommen.

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Synaptosomen der Moosfasern wurde statt dem „17.000 x g“-Sediment das aus der Zentrifugation des Gehirnhomogenates resultierende „1000 x g“-Sediment (s. 3.1.6.1) verwendet. Die Isolierung der Fraktion erfolgte nach dem in diesem Kapitel beschriebenen Protokoll, bis auf die Veränderung, dass als „Probe“ das „1000 x g“-Sediment eingesetzt wurde. Die angereicherten Organellen wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

### 3.1.6.6 Herstellung eines Zellkernextraktes

#### Lösungen:

(1) Lösung Roeder C	10 mM Tris, pH 8
	10 % Glycerin
	300 mM NaCl
	2 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM EDTA

#### Durchführung:

Als Ausgangspunkt für die Herstellung eines Zellkernextraktes wurde eine mit Zellkernen angereicherte Fraktion (s. 3.1.6.5) verwendet.

Das mit Zellkernen angereicherte Sediment wurde in Lösung Roeder C (1) aufgenommen. Mit einem Glashomogenisator („Douncer“) wurde die Fraktion durch 10-maliges Auf- und Abziehen des Glaspistills homogenisiert und für 30 min bei 4 °C auf einem Magnetprüher extrahiert. Eine Zentrifugation für 30 min

bei 200000 x g und 4 °C wurde angeschlossen. Der Überstand, das **Kernextrakt**, wurde abgenommen und für Immunpräzipitationsexperimente (s. 3.1.8) verwendet.

### 3.1.7 Kopplung eines Antikörpers an DYNA-Beads

#### Lösungen:

- |         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| (1) PBS | s. 2.11                               |
| (2) TBS | 10 mM Tris/HCl<br>150 mM NaCl, pH 8,0 |

#### Durchführung:

Die in diesem Versuch verwendeten, mit Protein A kovalent gekoppelten, magnetischen DYNA-Beads wurden von der Firma Dynal (Hamburg) bezogen.

Für die kovalente Kopplung des anti-L1-Antikörpers 2c2 an Protein A DYNA-Beads (s. 2.9.1) wurden die magnetischen Beads zweimal mit PBS (1) gewaschen, in PBS (1) resuspendiert und dem Ansatz anti-L1-Antikörpers 2c2 (s. 2.9.1) (5 - 10 µg Antikörper / 300 µl DYNA-Beads) hinzugefügt. Als Kontrollansatz wurden darüber hinaus Beads mit Fc-Protein (10 µg Protein / 300 µl DYNA-Beads) versetzt. Eine Inkubation der DYNA-Beads für 30 min bei RT auf einem Drehrad wurde angeschlossen. Nach drei weiteren Waschschritten mit PBS (1) wurden die DYNA-Beads zur kovalenten Vernetzung des Antikörpers mit dem an die Beads geknüpften Protein A in 1 mg BS<sup>3</sup> [Bis(sulfosuccinimidyl)suberate]-Crosslinker (Pierce, Bonn) / 300 µl DYNA-Beads, der in PBS (1) gelöst wurde, aufgenommen. Der Ansatz wurde erneut für 1 h bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigem Crosslinker und zur Absättigung freier Aminogruppen folgten sechs Waschschrritte mit TBS (2) und ein Waschschrtritt mit PBS (1).

Die gewaschenen mit anti-L1-Antikörper 2c2 gekoppelten Protein A Sepharose-DYNA-Beads wurden in PBS (1) aufgenommen und in Immunpräzipitationsexperimenten (s. 3.1.8) zur Isolierung von den durch den Antikörper gebundenen Antigenen eingesetzt.

### 3.1.8 Immunpräzipitation aus einem Zellkernextrakt

#### Lösungen:

(1) PBS s. 2.11

(2) Probenpuffer für PAGE s. 2.11

#### Durchführung:

Für Immunpräzipitationsexperimente aus einem Zellkernextrakt (s. 3.1.6.6) wurden kovalent mit anti-L1-Antikörper 2c2 verknüpfte Protein A DYNA-Beads (s. 3.1.7) verwendet.

Kovalent mit anti-L1-Antikörper 2c2 gekoppelte Protein A DYNA-Beads (s. 3.1.7) wurden dem aus Zellkernen isolierten Zellkernextrakt (s. 3.1.6.6) hinzugefügt und der Ansatz über Nacht bei 4 °C auf einem „*head-over-tail*“-Rotor inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde der Ansatz dreimal mit PBS (1) gewaschen und die DYNA-Beads in Probenpuffer für PAGE (2) aufgenommen. Vor der Analyse der Proben wurde der Ansatz für 5 min bei 95 °C denaturiert, wodurch die an den Antikörper nicht-kovalent gebundenen Antigene abgelöst wurden. Die sich nun im Überstand befindlichen Proteine wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

Als Negativkontrollen wurden zusätzlich Ansätze mit Fc-Protein verknüpften und ungekoppelten Protein A DYNA-Beads (s. 3.1.7) bearbeitet.

### 3.1.9 Dichtegradientenzentrifugation

#### Lösungen:

(1) Extraktionspuffer	0,32 M Saccharose 1mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Tris, pH 7,5 1 % Triton X-100
(2) Puffer für Gradient	1mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM Tris, pH 7,5 1 % Triton X-100
(3) 30 %ige Saccharoselösung	30 % Saccharose ad Puffer für Gradient (2)
(4) 5 %ige Saccharoselösung	5 % Saccharose ad Puffer für Gradient (2)

#### Durchführung:

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wurde das Gesamtgehirnhomogenat (s. 3.1.6.1), die Fraktion der löslichen Proteine (s. 3.1.6.3), sowie das „17000 x g“-Sediment (s. 3.1.6.2) analysiert.

Je 1 ml der zu analysierenden Fraktionen wurden im Verhältnis 1:2 mit Extraktionspuffer (1) gemischt und für 1 h bei 4 °C inkubiert.

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurden aus 4,5 ml einer 30 %igen Saccharoselösung (3) und 4,5 ml einer 5 %igen Saccharoselösung (4) ein

kontinuierlicher Saccharosegradient hergestellt. Die zu analysierenden Proben mit einem Volumen von 2 ml wurden nach der Extraktion auf den kontinuierlichen Dichtegradienten (5 % - 30 % Saccharosegehalt) geschichtet und für 16 h bei 35000 rpm und 4 °C in einem Beckman SW 41-Rotor zentrifugiert.

Im Anschluß an die Zentrifugation wurde der Saccharosegradient von der Öffnung zum Boden des Zentrifugenröhrchens in 0,5 ml - Schritten fraktioniert. Die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mit Hilfe der Proteinfällung nach Wessel (s. 3.1.4.1) konzentriert und im Anschluß mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

Zur Analyse der Molekulargewichte der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine und Proteinkomplexe wurde parallel zu den oben genannten Ansätzen ein Gradient mit den Molekulargewichtsstandards Rinderserumalbumin [(BSA) 66 kDa], Katalase (260 kDa), Apoferritin (480 kDa) und Thyroglobulin (670 kDa) analysiert. Im Anschluß an die Zentrifugation wurde der Saccharosegradient fraktioniert (s.o.), die in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine mit Hilfe der Proteinfällung nach Wessel (s. 3.1.4.1) konzentriert und nach Auftrennung in der SDS-PAGE (s. 3.1.1) mit Hilfe der Silberfärbung (s. 3.1.2) sichtbar gemacht. Die als Molekulargewichtsstandards verwendeten Proteine wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

### 3.1.10 *Proteolyseassay an isolierten Membranen*

(Probstmeier *et al.*, 1989)

#### **Lösungen:**

- |                                     |                                   |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| (1) Homogenisierungspuffer          | 1 mM NaHCO <sub>3</sub>           |
|                                     | 0,2 mM CaCl <sub>2</sub>          |
|                                     | 0,2 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,9 |
|                                     | 1 mM Spermidin                    |
| (2) RPMI-Medium 1640 mit L-Glutamin | PAA Laboratories, Cölbe           |

(3) TE-Puffer	s. 2.11
(4) Lysis-Puffer	150 mM NaCitrat, pH 6,4 2 % Brij 35

**Durchführung:**

Für die Untersuchung der proteolytischen Prozessierung der Proteine L1 und NCAM *in vitro* wurden 1 – 2 Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/J6 mit einem Alter von 3 – 4 Wochen verwendet.

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Vergasung mit CO<sub>2</sub>. Die Schädeldecke wurde eröffnet, das Gehirn entnommen und in 3 ml Homogenisierungspuffer (1) überführt. Mit Hilfe eines Glashomogenisators wurde das Gehirn zu einem Homogenat verarbeitet und durch Zentrifugation für 15 min bei 600 x g und 4 °C in Überstand und Sediment getrennt. Der Überstand wurde für 45 min bei 25000 x g und 4 °C rezentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen löslichen Bestandteile des Homogenates wurden verworfen, die mit Membranen angereicherte Sedimentfraktion in RPMI-Medium (2) resuspendiert und in Ansätze à 1 ml aufgeteilt. Zur Analyse der proteolytischen Prozessierung des Moleküls L1 in der Transmembrandomäne wurde das RPMI-Medium (2) gegen Lysispuffer (4) ersetzt. Die Ansätze wurden in An- oder Abwesenheit von verschiedenen Inhibitoren für 0,5 - 4 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluß für 1 h bei 100000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die in den resultierenden Überständen enthaltenen Proteine wurden durch Acetonfällung (s. 3.1.4.2) konzentriert und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht. Die Sedimente wurden in 100 µl TE-Puffer (3) aufgenommen und für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Die Konzentration der Proteine wurde mittels Proteinfällung nach Wessel (s. 3.1.4.1) durchgeführt. Die anschließende Untersuchung der in den Ansätzen enthaltenen Proteine erfolgte mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3).

Die in diesem Versuch verwendeten Inhibitoren einschließlich Angaben zu den eingesetzten Konzentrationen sind der **Tab. 3.3** zu entnehmen.

Tab. 3.3: Verwendete Inhibitoren (Proteolyseassay an isolierten Membranen)

Name	Endkonzentration	Herkunft
<i>1,10-o-Phenanthrolin</i>	200 µM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>Boehringer „Complete“</i>	1 Tablette / 50 ml	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>CGS 9343 B</i>	10 - 20 µM	Novartis Consumer Health (Nyon, Schweiz)
<i>DAPT</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>EDTA</i>	5 mM	-
<i>GM 6001</i>	10 - 20 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Leupeptin</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>MG-132</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Pepstatin</i>	1 µM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

### 3.1.11 Verdau mit Endo N (Neuraminidase)

#### Durchführung:

Als Ausgangsmaterial für den Verdau mit Neuraminidase dienten die aus der Inkubation von isolierten Membranen in Abwesenheit von verschiedenen Proteaseinhibitoren resultierenden Überstände des *Proteolyseassays* (s. 3.1.10).

Die Überstände wurden mit dem rekombinant hergestellten Enzym Endo N (Neuraminidase, Ausgangskonz.: 200 µg/ml) in einer Konzentration von 0,2 µg Enzym / 1 ml Ansatz versetzt, ü.N. bei 37 °C inkubiert und die Proteine nach der Konzentration durch Acetonfällung (s. 3.1.4.2) mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

### 3.1.12 Verdau von rekombinant hergestellten L1-Fragmenten mit Gelatinase

#### Lösungen:

(1) Aktivierungspuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 0,5 M NaCl 5 mM CaCl <sub>2</sub>
(2) Puffer 2	20 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM NaCl 5 mM CaCl <sub>2</sub>
(3) Trypsinlösung	3 mg Trypsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad 5 ml Puffer 2
(4) Aprotininlösung	3,2 mg Aprotinin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad 5 ml Puffer 2

#### Durchführung:

Die in diesem Versuch verwendete aus menschlichem Blut isolierte Gelatinase (MMP9) wurde von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Die als inaktives Proenzym vorliegende Gelatinase muss vor ihrem Einsatz durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert werden. Diese Reaktion kann von der Protease Trypsin katalysiert werden.

Für die Aktivierung der Gelatinase wurden 5 µl der Gelatinaselösung in 100 µl Aktivierungspuffer (1) aufgenommen und 10 µl Trypsinlösung (3) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Aprotininlösung (4) zur Inaktivierung des Enzyms Trypsin wurde der Ansatz

erneut für 10 min bei 37 °C inkubiert. Ein Kontrollansatz ohne Gelatinaselösung wurde parallel bearbeitet.

Zur Analyse der proteolytischen Spaltung der extrazellulären Domäne von L1 durch Gelatinase wurden je 1 - 2 µg der rekombinant hergestellten humanen L1-Fragmente „L1 extra“, „L1 Ig 1 - 6“ und „L1 Fn 1 - 5“ mit 50 µl der aktivierten Gelatinaselösung, sowie parallel mit 50 µl des Kontrollansatzes verdaut. Die mit einem Fc-Tag fusionierten L1-Fragmente „L1 extra“, „L1 Ig 1 - 6“ und „L1 Fn 1 - 5“ wurden aus dem Zellkulturüberstand von stabil transfizierten CHO-Zellen mit Hilfe einer Protein A - Sepharose-Säule aufgereinigt. Die Aufreinigung der rekombinanten L1-Fragmente wurde von Dr. G. Loers durchgeführt. Der Enzymverdau mit Gelatinase wurde über einen Zeitraum von 6 h bei 37 °C durchgeführt. Die verdauten Ansätze wurden mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

### 3.1.13 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

#### **Lösungen:**

- |                          |                                                                                                                                                          |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1) PBS                  | s. 2.11                                                                                                                                                  |
| (2) Blockierungslösung 1 | 1 % BSA in PBS (1)                                                                                                                                       |
| (3) PBST                 | PBS (1) + 0,05 % TWEEN 20                                                                                                                                |
| (4) Blockierungslösung 2 | 1 % BSA<br>1 mM CaCl <sub>2</sub><br>1 mM MgCl <sub>2</sub> in PBST (3)                                                                                  |
| (5) ABTS-Lösung          | 250 µl 2 % ABTS (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in dH <sub>2</sub> O<br>3,5 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 % w/v)<br>ad 4,75 ml Natriumacetat, pH 5,0 |

**Durchführung:**

Für den Nachweis der Interaktion der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 mit Calmodulin wurden ELISA-Studien durchgeführt.

Der Bindungspartner Calmodulin wurde auf der Polyvinylchlorid-beschichteten Oberfläche einer 96-well Microtiter-Platte (Nunc-Immnomodule Maxisorb, Nunc, Wiesbaden) durch Inkubation mit einer 10 µg/ml enthaltenden Calmodulinlösung, gelöst in 1 mM CaCl<sub>2</sub> in dH<sub>2</sub>O, ü.N bei 4 °C auf einem Schüttler immobilisiert. Als Kontrolle diente steriles Wasser. Das in diesem Versuch verwendete Calmodulin, isoliert aus Rindergehirn, wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Nicht gebundenes Calmodulin wurde durch drei aufeinanderfolgende Waschschriffe mit PBS (1) entfernt. Unspezifische Bindungen wurden durch Inkubation mit der Blockierungslösung 1 (2) für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler abgesättigt. Nach drei weiteren Waschschriffen mit PBST (3) wurde eine Inkubation von immobilisiertem Calmodulin mit den potentiellen Bindungspartnern, den intrazellulären Domänen von NCAM140 bzw. NCAM180 für 2 h bei RT auf einem Schüttler angeschlossen. Die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 wurden in Blockierungslösung 2 (4) gelöst.

Die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 wurden mit Hilfe des pQE-Systems rekombinant in *E. coli* hergestellt. Die Proteine wurden für die Aufreinigung und Detektion mit einem 6xHis Affinity Tag exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte über eine Ni-NTA-Säule nach Angaben des Herstellers (*Qiaexpressionist* Handbuch). Die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 wurden freundlicherweise von C. Friedrich zur Verfügung gestellt.

Für die Eingrenzung der Calmodulinbindungsstelle in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 wurden Bindungssexperimente in Anwesenheit von putativen kompetierenden Peptiden (Peptid 1, Peptid 2 und Peptid 3) durchgeführt. Die Peptide wurden zusammen mit den möglichen Bindungspartnern inkubiert. Die Lokalisierung der Peptide in Bezug auf die Aminosäuresequenz der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 ist in der **Abb. 3.3** dargestellt. Die Peptide 1, 2 und 3 wurden von Dr. Heukeshoven (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) synthetisiert.

Nach der Inkubation des Calmodulins mit den putativen Bindungspartnern in An- oder Abwesenheit der möglichen kompetierenden Peptide 1, 2 und 3 wurden drei Waschschrte mit PBST (3) angeschlossen. Ein Nachweis der spezifischen

14      8    5    1      Peptid 1	
MDITCYFLNKCGLLMCI <sup>14</sup> AVNLC <sup>8</sup> CGKAGPGAKGKDM <sup>5</sup> E <sup>1</sup> E <sup>1</sup> GKAAFSKDESKEPI	NCAM140IC
MDITCYFLNKCGLLMCI <sup>14</sup> AVNLC <sup>8</sup> CGKAGPGAKGKDM <sup>5</sup> E <sup>1</sup> E <sup>1</sup> GKAAFSKDESKEPI	NCAM180IC
Peptid 2	
VEVRTEEERTPNHDGGKHTEPNETTPLEPE-----	NCAM140IC
VEVRTEEERTPNHDGGKHTEPNETTPLEPELPA <sup>14</sup> DTTATVEDMLPSVTTV	NCAM180IC
-----	NCAM140IC
TTNSDTITETFATAQNSPTSETTTLTSSIAPPATTVPDSNSVPAGQATPS	NCAM180IC
-----	NCAM140IC
KGVTASSSSPASAPKVAPLV <sup>14</sup> DLSDTPTSAPSASNLSSTVLANQGAVLSPS	NCAM180IC
-----	NCAM140IC
TPASAGETSKAPPASKASPAPTPTPAGAASPLAAVAAPATDAPQAKQEAP	NCAM180IC
-----	NCAM140IC
STKGPDPPEPTQPGTVKNPPEAATAPASPKSKAATTNPSQGEDLKMDEGNF	NCAM180IC
-----	NCAM140IC
----- <sup>14</sup> KG	NCAM140IC
KTPDIDLAKDVFAALGSPRPATGASGQASELAPSPADSAVPPAPAKTEKG	NCAM180IC
Peptid 3	
PVETKSE <sup>14</sup> PQ <sup>8</sup> ESEAKPAPTEVKTVPNEATQTKENESKA	NCAM140IC
PVETKSE <sup>14</sup> PP <sup>8</sup> ESEAKPAPTEVKTVPNEATQTKENESKA	NCAM180IC

**Abb. 3.3: Aminosäuresequenzvergleich der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180.**

Die Lage der in den ELISA-Experimenten eingesetzten Peptide Peptid 1 (rot), Peptid 2 (blau) und Peptid 3 (orange) ist farblich hervorgehoben. Die grün hinterlegten Aminosäuren kennzeichnen ein mögliches Calmodulinbindungsmotiv in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180.

Bindung der intrazellulären Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 an Calmodulin erfolgte über die Inkubation mit einem Primärantikörper für 1,5 h bei RT auf einem Schüttler. Für den Nachweis der intrazellulären Domäne von NCAM 140 wurde der anti-NCAM-Antikörper 5B8 (s. 2.9.1) in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Für die Detektion der intrazellulären Domäne von NCAM 180 hingegen wurde der anti-NCAM-Antikörper D3 (s. 2.9.1) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Die Primärantikörper wurden in Blockierungslösung 2 (4) verdünnt. Nach drei weiteren Waschschrten mit PBST (3) folgte eine einstündige Inkubation bei RT auf einem Schüttler mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in der Blockierungslösung 2 (4) eingesetzt. Der ELISA wurde weiteren drei Waschschrten mit PBST (3) unterzogen, dem ein vierter Waschschrte mit PBS (1) angeschlossen wurde. Der Nachweis der Bindungseffizienz erfolgte mit einer, von dem an den Sekundärantikörper gekoppelten Nachweisenzym (HRP), katalysierten Farbreaktion. Das Enzym HRP

setzt ein in der applizierten ABTS-Lösung (5) enthaltenes Substrat zu einem grünen Farbniederschlag um, der nach 15 min und nach 30 min bei 405 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers (Micronaut Skan, Roche Diagnostics, Mannheim) gemessen wurde.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Restriktionsverdau

(Sambrook und Gething, 1989)

Die Restriktion der DNS erfolgte unter den von den Herstellern empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen.

Für analytische Zwecke wurde einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers pro µg DNS 1 U Restriktionsendonuklease hinzugefügt. Bei der Restriktion mit zwei verschiedenen Endonukleasen wurde der Puffer verwendet, in dem beide Enzyme nach Angaben des Herstellers mindestens eine Aktivität von 75 % aufwiesen. Waren die Puffer nicht kompatibel, wurde zwischen den Teilverdau ein Pufferwechsel mit dem Concert™ PCR Purification System der Firma Life Technologies (Karlsruhe) durchgeführt. Der Ansatz wurde für 1,5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.2) und analysiert.

Verwendete Restriktionsendonukleasen:

*Bam*HI 10 U/µl

*Eco*RI 10 U/µl

*Hind*III 10 U/µl

*Xba*I 10 U/ µl

Die oben genannten Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen.

### 3.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

(Sambrook und Gething, 1989)

#### Lösungen:

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

#### Durchführung:

Zu analytischen Zwecken wurden die nach Restriktionsspaltungen erhaltenen DNS-Fragmente durch Elektrophorese in horizontalen 1 %igen Agarosegelen (SubCell<sup>®</sup>GT Elektrophoresekammern, BioRad, München) aufgetrennt. Die Agarosegele wurden durch Lösung von 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer (2) hergestellt.

Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (1) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Abschätzung der Molekülgröße wurde zusätzlich ein Größenmarker (DNA-Leiter 1kb, Gibco BRL, Karlsruhe) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufes wurde zur Sichtbarmachung der DNS das Gel in einer Ethidiumbromid-haltigen Lösung [0,5 µg/ml in 1 x TAE Puffer (2)] für 30 min gefärbt und mit Hilfe eines Imagesystems (E.A.S.Y. RH Imager, HEROLAB, Wiesloh) unter UV-Licht fotografiert.

### 3.2.3 Herstellung von kompetenten Bakterien (*E. coli*-Stamm: DH5 $\alpha$ )

#### Lösungen:

(1) LB-Medium	s. 2.11
(2) TFB1-Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl <sub>2</sub> 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin pH 5,8; Lösung sterilfiltrieren
(3) TFB2-Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl <sub>2</sub> 15 % Glycerin pH 8,0 (mit KOH); Lösung sterilfiltrieren

#### Durchführung:

Zur Herstellung chemokompetenter Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  wurden 1 ml einer Übernachtskultur (s. 2.5.2) in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium (1) überführt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

Nach Kühlung der Kultur für 5 min auf Eis wurden die Bakterien für 5 min mit 4000 x g bei 4 °C abzentrifugiert und vorsichtig in 30 ml kaltem TFB1-Puffer (2) resuspendiert. Es folgte eine 90-minütige Inkubation der Bakterien auf Eis. Daraufhin wurden sie erneut in Überstand und Sediment getrennt (5 min, 4000 x g, 4 °C) und das Sediment in 4 ml kaltem TFB2-Puffer (3) aufgenommen.

Aliquots à 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4 Transformation von Bakterien

(Sambrook und Gething, 1989)

#### Lösungen:

(1) LB-Medium s. 2.11

(2) LB-Agar s. 2.11

#### Durchführung:

Zur chemischen Transformation von Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5α wurden 10 - 100 ng Plasmid-DNS mit 100 µl langsam aufgetauten chemokompetenten Bakterien gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Bakterien für 90 s auf 42 °C erwärmt und nach dem Hitzeschock wiederum für 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 900 µl LB-Medium (1) für 1 h bei 37 °C inkubiert, kurz abzentrifugiert, 700 µl des Überstandes verworfen und die restlichen Bakterien in den verbleibenden 200 µl resuspendiert. Diese wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Selektivagar (2) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.5 Maxipräparation von Plasmid-DNS aus einer Bakterienkultur

Die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab erfolgte mit Hilfe des Maxipräparationskits Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

### 3.3 Zellbiologische Methoden

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 %. Die für die Kultivierung von Zellen verwendete Plastikware wurde von der Firma Nunc (Wiesbaden) bezogen.

#### 3.3.1 Aufarbeitung von Zellen und Zellkulturüberständen

##### Lösungen:

(1) PBS s. 2.11

(2) Probenpuffer für PAGE s. 2.11

##### Durchführung:

Für die biochemische Analyse von transient transfizierten Zellen (s. 3.3.3), Zellen der Primärzellkultur (s. 3.3.5.5 und s. 3.3.5.4) bzw. mit Inhibitoren behandelten Zellen (s. 3.3.2) wurden die Zellkulturüberstände und Zellen getrennt voneinander aufgearbeitet.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Die **Zellkulturüberstände** wurden abgenommen, gesammelt und durch Zentrifugation für 1 h bei 100000 x g und 4 °C von abgestorbenen Zellen und Zelldebris getrennt. Daraufhin wurden die in den Überständen der Zentrifugation enthaltenen Proteine durch Acetonfällung (s. 3.1.4.2) konzentriert und anschließend mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

Die behandelten **Zellen** wurden einmal mit eiskaltem PBS (1) gewaschen, abgeschabt und homogenisiert. Zur Abtrennung der Zellkerne wurde das Zelllysat anschließend für 10 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die resultierenden Überstände wurden mit SDS-Probenpuffer (2) versetzt und ebenfalls mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

### 3.3.2 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

#### Lösungen:

(1) Kulturmedium s. 2.3

#### Durchführung:

Für die Behandlung von Zellen mit verschiedenen Inhibitoren wurden Zellen der Neuroblastoma-Zelllinie Neuro 2a (s. 2.2) verwendet.

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von  $10^5$  -  $10^6$  Zellen / well auf 35 mm well - Platten (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und in Kulturmedium (1) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch serumfreies Kulturmedium (2) ersetzt, dem Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt waren. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen in An- bzw. Abwesenheit der Inhibitoren wurden die Zellkulturüberstände und Zellen getrennt voneinander aufgearbeitet (s. 3.3.1).

Die **Tab. 3.4** gibt eine Übersicht über die in diesem Versuch verwendeten Inhibitoren.

**Tab. 3.4: Verwendete Inhibitoren (Behandlung von Zellen mit Inhibitoren)**

Name	Endkonzentration	Herkunft
<i>Aprotinin</i>	1 $\mu$ M	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>CGS 9343 B</i>	10 - 20 $\mu$ M	Novartis Consumer Health (Nyon, Schweiz)
<i>Colchicin</i>	1 - 5 $\mu$ M	Calbiochem (Bad Soden)
<i>“Complete- EDTA free”</i>	1 Tablette / 50 ml	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Cytochalasin D</i>	1 $\mu$ M	Calbiochem (Bad Soden)
<i>GM 6001</i>	10 - 20 $\mu$ M	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Jasplakinolid</i>	1 $\mu$ M	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Latrunculin B</i>	10 $\mu$ M	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Leupeptin</i>	10 $\mu$ M	Calbiochem (Bad Soden)

### 3.3.3 Transiente Transfektion von Neuro 2a- und CHO-Zellen

#### Lösungen:

(1) Kulturmedium

s. 2.3

#### Durchführung:

Zellen der Zelllinie Neuro 2a (s. 2.2) sowie CHO (s. 2.2) wurden für die transiente Transfektion mit verschiedenen Expressionskonstrukten (s. 2.7) verwendet.

Die Expressionskonstrukte wurden zuvor durch Transformation in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (s. 3.2.3 und 3.2.4) und anschließender Präparation von Plasmid-DNS aus einer Bakterienkultur (s. 3.2.5) amplifiziert. Die vervielfältigten Expressionskonstrukte wurden mit Hilfe eines Restriktionsverdau (s. 3.2.1) kontrolliert und die verdauten Ansätze in einem Agarosegel (s. 3.2.2) aufgetrennt und analysiert.

Die transiente Transfektion von Zellen wurde mit Hilfe des Transfektionskits *LIPOFECTAMINE PLUS™ Reagent* (Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers (Shih *et al.*, 1997) durchgeführt. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in einer Zelldichte von  $10^5$  -  $10^6$  / *well* auf 35 mm *well*-Platten (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und in Kulturmedium (1) kultiviert. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von 80 - 90 % (nach ca. 18 - 24 h) wurde das Kulturmedium (1) gegen serumfreies Kulturmedium (1) ausgetauscht. Die Zellen wurden pro *well* mit 2  $\mu$ g DNS transfiziert, bei gleichzeitiger Transfektion mit mehreren Expressionskonstrukten wurden jeweils 2  $\mu$ g DNS verwendet.

Die **Tab. 3.5** gibt eine Übersicht über die verwendeten Expressionskonstrukte.

**Tab. 3.5: Verwendete Expressionskonstrukte**

Insert	Spezies	Plasmid
<i>E-GFP</i>		pcDNA3
<i>Furin</i>	Mensch	pcDNA3

<b>Insert</b>	<b>Spezies</b>	<b>Plasmid</b>
<i>NCAM120</i>	Maus	pcDNA3
<i>NCAM140</i>	Ratte	pcDNA3
<i>NCAM180</i>	Ratte	pcDNA3
<i>PC1</i>	Maus	pRc/CMV
<i>PC2</i>	Maus	pRc/CMV
<i>PC5A</i>	Maus	pRc/CMV
<i>PC7</i>	Ratte	pRc/CMV
<i>PACE4</i>	Mensch	pcDNA3
<i>TACE</i>	Maus	pcDNA3
<i>dTACE</i>	Maus	pcDNA3

Es wurden 6 µl Plus Reagent und 4 µl Lipofectamin pro *well* eingesetzt. Nach 6-stündiger Inkubation der Zellen mit dem Transfektionsansatz wurde die Transfektion durch Zugabe von serum- und antibiotikahaltigem Kulturmedium (1) gestoppt. 24 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium (1) gegen serumfreies Kulturmedium (1) ausgetauscht und die Zellkulturüberstände und Zellen nach einer Kultivierung für weitere 24 h getrennt voneinander aufgearbeitet (s. 3.3.1).

Die Transfektionseffizienz wurde durch die Cotransfektion der Zellen mit einem GFP-Expressionsplasmid überprüft. In etwa 30 % der Zellen konnte eine Expression des Proteins GFP nachgewiesen werden.

### 3.3.4 Immunhistochemie an Neuro 2a-Zellen

#### Lösungen:

- (1) Kulturmedium s. 2.3.1
- (2) PBS s. 2.11
- (3) 4 % PFA in PBS (1)

- |                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| (4) PBST               | 0,3 % Triton X-100 in PBS (1) |
| (5) Blockierungslösung | 0,1 % BSA in PBST             |

**Durchführung:**

Für die immunhistochemische Analyse der Lokalisierung der zytoplasmatischen Domäne des Moleküls L1 wurden Zellen der Neuroblastoma-Zelllinie Neuro 2a verwendet (s. 2.2).

Zellen der Zelllinie Neuro 2a wurden in einer Zelldichte von  $10^5$  -  $10^6$  Zellen / well in 35 mm well -Platten (Nunc, Wiesbaden) auf mit poly-L-Lysin (PLL) - beschichteten Deckgläschen (s. 3.3.5.1) ausgesät und in Kulturmedium (1) kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium durch serumfreies Kulturmedium (1) ersetzt und die Zellen nach weiteren 24 h für 1 h bei RT mit 4 % PFA in PBS (3) fixiert. Rückstände des Paraformaldehyds (PFA) wurden im Anschluß durch drei Waschschrte mit PBS (2) à 10 min entfernt. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen durch eine 40-minütige Inkubation der Zellen bei RT mit Blockierungslösung (5) wurde eine Inkubation der Zellen mit dem anti-L1-Antikörper 2c2 (s. 2.9.1) in einer Konzentration von 1:1000 in PBS (2) für 1,5 h bei RT angeschlossen. Die Zellen wurden im Anschluß dreimal mit PBS (2) à 10 min gewaschen und für maximal 1 h bei RT mit dem, mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelten, Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in PBS (2) inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten à 10 min mit PBS (2) wurden die Zellen mit Aqua Poly / Mount Medium (Polysciences Inc., Warrington, USA) eingebettet.

Der in diesem Versuch verwendete Sekundärantikörper wurde von Dianova (Hamburg) bezogen.

Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C.

### 3.3.5 Primärzellkultur

#### 3.3.5.1 Beschichtung von Deckgläschen mit poly-L-Lysin (PLL)

##### Lösungen:

- |                         |                                                       |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|
| (1) PBS                 | s. 2.11                                               |
| (2) poly-L-Lysin-Lösung | 0,01 % PLL (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)<br>ad PBS (1) |

##### Durchführung:

Die Deckgläschen (Durchmesser: 15 mm) wurden für eine halbe Stunde in einem Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler mit Aceton gewaschen. Es wurden drei Waschschrirte mit Wasser angeschlossen, um das Aceton zu entfernen. Die Beschichtung der Deckgläschen mit poly-L-Lysin erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Dazu wurden die gewaschenen Deckgläschen in einer 0,01 %igen poly-L-Lysin-Lösung (2) aufgenommen. Nach der Inkubation wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit Wasser gewaschen und im Anschluss unter der Sterilbank in einer zuvor mit UV-Licht bestrahlten und mit Alu-Folie ausgelegten Wanne für 1,5 h – 2 h getrocknet. Nach 15-minütiger Bestrahlung der getrockneten Deckgläschen mit UV-Licht wurden diese unter sterilen Bedingungen aufbewahrt.

### 3.3.5.2 Kleinhirnexplantate

(Bix und Clark, 1998)

#### Lösungen:

- |                  |                                                                 |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|
| (1) HBSS         | (PAA Laboratories, Cölbe)                                       |
| (2) Kulturmedium | MEM (PAA Laboratories, Cölbe)                                   |
|                  | 10 % Pferdeserum (PAA Laboratories, Cölbe)                      |
|                  | 10 % Fötale Kälberserum (PAA Laboratories, Cölbe)               |
|                  | 200 µM L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe)                     |
|                  | 1 x Penicillin / Streptomycin [100 x (PAA Laboratories, Cölbe)] |
|                  | 10 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)                   |
|                  | 10 ng/ml Natriumselenit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)            |

#### Durchführung:

Für die Präparation von Kleinhirnexplantaten wurden 6 - 8 Tage alte C57BL/J6 Wildtyp-Mäuse verwendet.

Die Präparation wurde auf Eis durchgeführt. Der Tod der Mäuse wurde durch Dekaptierung herbeigeführt. Die Schädeldecke wurde eröffnet, das Gehirn entfernt und das Kleinhirn präpariert. Das Kleinhirn wurde in eiskalte HBSS (1) überführt. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskopes die Hirnhaut und die assoziierten Blutgefäße des Organs entfernt. Mittels der umgebogenen Spitze einer Glaspasteurpipette wurde das Organ durch ein Draht-Netz mit einer Porengröße von 100 µm gedrückt. Die resultierenden Kleinhirnexplantate wurden vorsichtig dreimal mit eiskalter

HBSS (1) gewaschen. Das Absetzen der Explantate zwischen den einzelnen Waschschrritten erfolgte mittels Sedimentation. Im Anschluss an die Waschschrritte wurden die Gewebestückchen in Kulturmedium (2) aufgenommen (1 ml Kulturmedium / Kleinhirn) und auf Deckgläschen ausgesät. Auf ein zuvor mit HBSS (1) gewaschenes Deckgläschen wurden etwa 30 Explantate in einem Volumen von 50 µl gleichmäßig verteilt.

Für die Analyse des L1- bzw. NCAM-abhängigen Neuritenwachstums wurden sowohl mit L1 als auch mit NCAM-beschichtete Deckgläschen verwendet: Mit PLL beschichtete Deckgläschen (s. 3.3.5.1) wurden über Nacht bei 4 °C unter sterilen Bedingungen mit nativem, murinen L1 und mit nativem NCAM der Maus [je 2 µg/ml gelöst in HBSS (1)] inkubiert. Die Aufreinigung von nativem L1 der Maus wurde von Dr. G. Loers durchgeführt. Natives NCAM der Maus wurde freundlicherweise von A. Dahmann zur Verfügung gestellt. Als Positivkontrolle wurden die Deckgläschen mit 1 µM Laminin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in HBSS (1) beschichtet. PLL-beschichtete Deckgläschen wurden als Negativkontrolle eingesetzt.

Die Adhäsion der Explantate erfolgte über einen Zeitraum von 16 h. Im Anschluss wurden die auf den Deckgläschen haftenden Explantate in 1 ml serumfreies Kulturmedium (2) überführt. Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Proteaseinhibitoren auf das L1- bzw. NCAM-abhängige Neuritenwachstum wurden die Explantate für weitere 24 h in An- oder Abwesenheit verschiedener Inhibitoren inkubiert. Einen Überblick über die verwendeten Inhibitoren gibt **Tab. 3.6**.

**Tab. 3.6: Verwendete Inhibitoren (Kleinhirnexplantate)**

Name	Endkonzentration	Herkunft
<i>Aprotinin</i>	1 µM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
<i>CGS 9343 B</i>	10 - 20 µM	Novartis Consumer Health (Nyon, Schweiz)
<i>GM 6001</i>	10 - 20 µM	Calbiochem (Bad Soden)
<i>Leupeptin</i>	10 µM	Calbiochem (Bad Soden)

Nach der Inkubationszeit von 24 h wurden die Kleinhirnexplantate zur Analyse des Neuritenwachstums fixiert und gefärbt (s. 3.3.5.3).

### 3.3.5.3 Neuritenwachstum von Kleinhirnexplantaten

#### Lösungen:

- |                            |                                               |
|----------------------------|-----------------------------------------------|
| (1) Färbelösung            | 1 % Toluidinblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) |
|                            | 1 % Methylenblau                              |
|                            | 1 % Borax                                     |
|                            | ad dH <sub>2</sub> O                          |
| (2) 25 % Glutaraldehyd     |                                               |
| (3) PBS (steril filtriert) | s. 2.11                                       |
| (4) Eukitt                 | (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)                  |

#### Durchführung:

Für die Analyse des L1- bzw. NCAM-abhängigen Neuritenwachstums wurden die Kleinhirnexplantate (s. 3.3.5.2) nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren durch Hinzufügen von 25 %iger Glutaraldehydlösung [Endkonzentration: 2,5 % Glutaraldehyd, (2)] im Verhältnis 1:10 zum Kulturmedium fixiert. Nach einer Dauer von 20 - 30 min wurde die Fixierungslösung entfernt und die Explantate dreimal mit PBS (3) gewaschen. Zur Färbung der Kleinhirnexplantate wurde eine Inkubation für 15 - 20 min mit Färbelösung (1) angeschlossen, die Explantate dreimal mit autoklaviertem Wasser gewaschen und bei RT getrocknet. Die Deckgläschen wurden mit Hilfe von Eukitt (4) eingebettet. Die fixierten Kleinhirnexplantate wurden bei RT gelagert.

Die Auswertung des L1- und NCAM-abhängigen Neuritenwachstums erfolgte mit Hilfe des IBAS Image Analysis System (Kontron, Zeiss) und dem Programm „Carl Zeiss Vision KS 400 V2.0“. Es wurden pro Versuchsansatz die 10 längsten Neuriten von 15 Explantaten ausgezählt.

#### 3.3.5.4 Einzelzellkulturen von Kleinhirnneuronen

##### Lösungen:

- (1) HBSS (PAA Laboratories, Cölbe)
- (2) Medium X-1 MEM (PAA Laboratories, Cölbe)
- 1 x Penicillin / Streptomycin [100 x (PAA Laboratories, Cölbe)]
- 0,1 % BSA
- 10 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 4 nM L-Thyroxin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 100 µg/ml Transferrin (Calbiochem, Bad Soden)
- 0,027 TIU/ml Aprotinin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 30 nM Natriumselenit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Optional:
- 1 x Natriumpyruvat (PAA Laboratories, Cölbe)
- 1 x L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe)
- 10 % Fötales Kälberserum (PAA Laboratories, Cölbe)
- (3) Trypsin/DNase I-Lösung
- 0,2 g Trypsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 20 mg DNase I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- 200 µl 80 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,8
- ad 20 ml HBSS

- (4) DNase I-Lösung      10 mg DNase I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)  
50 mg Glucose  
ad 20 ml MEM (PAA Laboratories, Cölbe)
- (5) Trypanblau            (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

**Durchführung:**

Die Präparation der Kleinhirnneuronen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. G. Loers durchgeführt.

Für die Präparation und Kultivierung von Kleinhirnneuronen wurden 6 - 8 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Präparation des Kleinhirns wurde auf Eis durchgeführt.

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekaptierung. Das Gehirn wurde entnommen und das Kleinhirn präpariert. Nach Überführen des Kleinhirns in eiskalte HBSS-Lösung (1) wurden unter zu Hilfenahme eines Stereomikroskopes assoziierte Blutgefäße und die Hirnhaut des Organs entfernt, das Kleinhirn in neue HBSS-Lösung (1) aufgenommen und mit einer Schere in drei Stücke geteilt. Die Gewebestücke wurden einmal mit HBSS (1) gewaschen (5 ml HBSS / drei Kleinhirne). Nach Abnahme der HBSS-Lösung (1) wurde den Kleinhirnstücken Trypsin/DNase I-Lösung (3) (1 ml / drei Kleinhirne) hinzugefügt und nach einer 15minütigen Inkubationszeit erneut drei Waschschrte mit HBSS-Lösung (1) angeschlossen. Nach Zugabe von DNase I-Lösung (4) (1 ml / drei Kleinhirne) wurden die Gewebestücke durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer abgerundeten Glaspasteurpipette mit abnehmendem Durchmesser homogenisiert. Der Zellsuspension wurden 5 ml HBSS-Lösung (1) hinzugefügt, der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 100 x g und 4 °C die Zellen sedimentiert. Kommt es nach der Inkubation der Zellsuspension auf Eis zu einer Sedimentation von Gewebestücken, ist eine erneute Homogenisation mit Glaspasteurpipetten erforderlich. Nach der Zentrifugation wurde der resultierende Überstand vorsichtig abgenommen und die

Kleinhirnneuronen in Medium X1 (2) (5ml / 3 Kleinhirne) mit einer Temperatur von 37 °C resuspendiert.

Die Zellen wurden in einer Zelldichte von  $10^6$  Zellen / ml ausgesät.

Zur Expressionsanalyse des Proteins L1 in Kleinhirnneuronen wurden sowohl die Zellkulturüberstände, als auch die Kleinhirnneuronen aufgearbeitet (s. 3.3.1) und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

### 3.3.5.5 Einzelzellkulturen von hippocampalen Neuronen

(Lochter *et al.*, 1991; Brewer *et al.*, 1993)

#### Lösungen:

- |                            |                                                                                                                                                       |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1) HBSS                   | (PAA Laboratories, Cölbe)                                                                                                                             |
| (2) Präparationslösung     | 0,72 g BSA (Boehringer, Mannheim)<br>0,347 g MgSO <sub>4</sub><br>ad 240 ml HBSS (1)                                                                  |
| (3) Lösung für Verdau      | 800 mg NaCl<br>37 mg KCl<br>99 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>595 mg HEPES<br>35 mg NaHCO <sub>3</sub><br>ad 100 ml dH <sub>2</sub> O, pH 7,4 |
| (4) Trypsin/DNase-Lösung   | 6 mg Trypsin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)<br>1,5 mg Dnase I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)<br>ad 1,8 ml Lösung für Verdau                               |
| (5) Trypsininhibitorlösung | 2,4 mg Trypsininhibitor (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)                                                                                                  |

	ad 4 ml Lösung für Verdau
(6) Serum	Pferdeserum (PAA Laboratories, Cölbe)
(7) DNase-Lösung	1 mg DNase I (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ad 2,5 ml Präparationslösung (2)
(8) Trypanblau	(Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
(9) Kulturmedium	500 mg D-Glucose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 100 µg/ml Transferrin (Calbiochem, Bad Soden) 0,025 mg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 2 mM Glutamax I (Life Technologies, Karlsruhe) 5 mg/ml Gentamycin (Life Technologies, Karlsruhe)

**Durchführung:**

Die Präparation der hippocampalen Neuronen wurde von G. Dityateva durchgeführt.

Für die Präparation von hippocampalen Neuronen wurden 1 - 3 Tage alte Wildtyp-Mäuse des Stammes C57Bl/6J verwendet. Die Präparation wurde auf Eis durchgeführt.

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch Dekaptierung. Nach Eröffnen der Schädeldecke wurde das Gehirn entfernt und der Hippocampus präpariert. Das Gewebe wurde in 1 mm dicke Stücke geteilt und dreimal mit Präparationslösung (2) und im Anschluss einmal mit HBSS-Lösung (1) gewaschen. Daraufhin wurde dem Gewebe Trypsin-DNase I-Lösung (3) hinzugefügt und eine Inkubation für 5 min angeschlossen. Nach weiteren zwei Waschschritten mit Präparationslösung (2) wurde der Ansatz für 5 min mit Trypsininhibitorlösung (5) versetzt, das Gewebe erneut mit Präparationslösung (2) gewaschen und für 10 min mit einer Mischung aus Präparationslösung (2) und Serum (6) (Verhältnis 1:5) inkubiert. Der Ansatz wurde erneut mit Trypsininhibitorlösung (5) versetzt und die nachfolgenden Arbeitsschritte wie oben beschrieben durchgeführt. Daraufhin

wurden zwei Waschschrirte mit Präparationslösung (2) angeschlossen, DNase I-Lösung (7) hinzugefügt und die Gewebestücke mit Hilfe einer abgerundeten Glaspasteurpipette mit abnehmendem Durchmesser durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren zu einer homogenen Zellsuspension verarbeitet. Der Zellsuspension wurde Präparationslösung (2) hinzugefügt und für 15 min bei 80 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden ein weiteres Mal in Präparationslösung (2) gewaschen. Die nach der Zentrifugation sedimentierten Zellen wurden in Präparationslösung (2) aufgenommen und in einer Dichte von 1000 Zellen / mm<sup>2</sup> ausgesät.

In den ersten drei Tagen wurden die Zellen in Kulturmedium (8) mit 10 % Serum (6) kultiviert. Am dritten Tag und jeweils zwei Tage später wurde die Hälfte des Mediums entfernt und durch Kulturmedium mit den Zusätzen 5% Serum (6), 2 % B-27 supplement (Life Technologies, Karlsruhe) und 5 µM Ara C (Cytosine b-D-Arabinofuranoside, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ersetzt.

Zur Expressionsanalyse des Proteins L1 in hippocampalen Neuronen wurden sowohl die Zellkulturüberstände, als auch die Kleinhirnneuronen aufgearbeitet (s. 3.3.1) und mit Hilfe der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) untersucht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM für das Zentrale Nervensystem

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist im Zentralen Nervensystem an einer Vielzahl von Prozessen wie der Zellmigration, dem Neuritenwachstum und der Axonfaszikulierung beteiligt (Murase und Schuman, 1999; Ronn *et al.*, 2002) (s. 1.4.1). Zusätzlich zu den membranständigen Isoformen des Moleküls NCAM180, NCAM140 und NCAM120 (Doherty *et al.*, 1989; Doherty *et al.*, 1990), wurden lösliche NCAM-Fragmente nachgewiesen, die nicht nur in physiologische Prozesse wie der synaptischen Plastizität (Fazeli *et al.*, 1994) involviert zu sein scheinen, sondern auch unter pathologischen Bedingungen des Zentralen Nervensystems eine Rolle spielen (Vawter *et al.*, 2001) (s. 1.4.1.1). Das Vorkommen löslicher Fragmente des Moleküls NCAM erweitert dessen Einsatzbereich über einen „parakrinen“ Mechanismus hinaus und erhöht die Vielfältigkeit seiner Funktionen. Bisher konnte die Entstehung löslicher NCAM-Fragmente noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Bereits veröffentlichte Studien weisen darauf hin, dass lösliche Fragmente des Moleküls durch die Spaltung der extrazellulären Domäne, d.h. der regulierten Prozessierung der membranständigen Isoformen und nicht durch den Vorgang des „Alternativen Spleißens“ entstehen.

Um einen Hinweis auf die Herkunft löslicher NCAM-Fragmente zu erhalten und deren Entstehung und Bedeutung für das Zentrale Nervensystem zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* (s. 4.1.1.1 und 4.1.1.2) und *in vivo* (s. 4.1.1.3) *Proteolyseassays* durchgeführt. Mit Hilfe von Transfektionsstudien (s. 4.1.1.5) sollte die für die Entstehung der löslichen NCAM-Fragmente verantwortliche Protease ermittelt werden. Neben Experimenten zur Untersuchung der regulierten Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen in

Abhängigkeit des Kalziumsensors Calmodulin (s. 4.1.2.1 und 4.1.2.2), sowie des Zytoskeletts (s. 4.1.3.1) wurde der Einfluss der regulierten Prozessierung des Moleküls NCAM auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum (s. 4.1.3.2 und 4.1.3.3) analysiert.

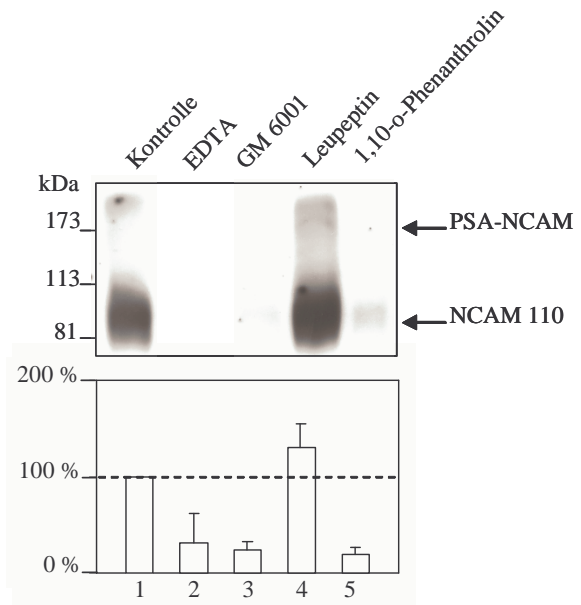
#### 4.1.1 Die Entstehung des löslichen Fragmentes NCAM110

##### 4.1.1.1 Die Freisetzung membranständiger NCAM-Isoformen durch regulierte Proteolyse

Zur Untersuchung der Entstehung löslicher NCAM-Fragmente wurden *in vitro* *Proteolyseassays* (s. 3.1.10) in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren durchgeführt. Neben den Metalloproteasen der ADAM-Familie (s. 1.2.1.1) und den Matrixmetalloproteasen (s. 1.2.1.2) sind auch Serinproteasen (s. 1.2.2) an der Spaltung von Transmembranproteinen beteiligt. Basierend auf dieser Tatsache wurden im Rahmen dieses Experimentes die Metalloproteaseinhibitoren EDTA, 1,10-o-Phenanthrolin und GM 6001, sowie der Serin- und Cysteinproteaseinhibitor Leupeptin verwendet. Liegt der Entstehung löslicher NCAM-Fragmente die Prozessierung membranständiger Isoformen zugrunde, kommt es während der Inkubation der für den *Proteolyseassay* verwendeten isolierten Membranen bei 37 °C zur Spaltung und Freisetzung löslicher NCAM-Fragmente durch die verantwortliche Protease. Der Einsatz wirksamer Proteaseinhibitoren führt zu einer Inhibition der Freisetzung löslicher Fragmente.

Unter Kontrollbedingungen, in Abwesenheit eines Proteaseinhibitors (**Abb. 4.1**, Spur 1), sowie in Anwesenheit des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (**Abb. 4.1**, Spur 4) wurde ein lösliches NCAM-Fragment mit einem Molekulargewicht von 110 kDa in den Überständen nachgewiesen. Das Molekulargewicht dieses Fragmentes stimmte mit dem Molekulargewicht der Hauptkomponente löslicher NCAM-Fragmente überein (Nybroe *et al.*, 1989). Nach der Inkubation der isolierten Membranen mit EDTA

(Abb. 4.1, Spur 2) fehlte dagegen das lösliche NCAM110-Fragment in dem Überstand des Ansatzes. EDTA ist in der Lage zweiwertige Ionen (z.B. Zink-, Kalzium- oder Magnesiumionen) zu binden. Das Fehlen des Fragmentes NCAM110 in dem Überstand des Ansatzes nach der Behandlung mit EDTA weist daraufhin, dass für die Entstehung löslicher NCAM-Fragmente zweiwertige Ionen essentiell sind. Die an der Spaltung zahlreicher Transmembranproteine beteiligten Metalloproteasen haben als Voraussetzung für ihre Aktivität in ihrem katalytischen Zentrum ein zweiwertiges Zinkion gebunden. Darüber hinaus sind zwei bis drei Kalziumionen und ein weiteres Zinkion an der Stabilisierung der katalytischen Domäne beteiligt. EDTA ist daher in der Lage, die Spaltung von Transmembranproteinen und die Entstehung löslicher Fragmente durch eine Inhibition der verantwortlichen Metalloprotease zu verhindern (Black und White, 1998). Der Einfluss von EDTA auf die Entstehung des Fragmentes NCAM110 ließ darauf schließen, dass lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM durch die Spaltung membranständiger Isoformen unter Beteiligung einer Metalloprotease von der Membran gelöst werden. Die Aktivität von Metalloproteasen kann *in vitro* nicht nur durch EDTA, sondern durch einen weiteren Chelator, das 1,10-o-Phenanthrolin inhibiert werden (Black und White,



**Abb. 4.1: Nachweis der löslichen NCAM-Fragmente in den Überständen des *in vitro* Proteolyseassays nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.** Isolierte Membranen wurden für 2 h bei 37 °C in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) der Proteaseinhibitoren EDTA (5 mM, Spur 2), GM 6001 (10 µM, Spur 3), Leupeptin (10 µM, Spur 4) und 1,10-o-Phenanthrolin (10 µM, Spur 5) inkubiert (s. 3.1.10). Im Anschluss wurden die Proben durch Zentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Die in den Überständen enthaltenen Proteine wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 untersucht. Das Balkendiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung der Bande des NCAM110-Fragmentes dreier unabhängiger Experimente. Die Position der unterschiedlichen NCAM-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

1998). Nach der Inkubation der isolierten Membranen mit dem Inhibitor (**Abb. 4.1**, Spur 5) war die in den Überständen detektierbare Menge des Fragmentes NCAM110 auf weniger als 20 % des Kontrollansatzes reduziert. Auch der Einsatz des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 (**Abb. 4.1**, Spur 3), dessen Wirkungsmechanismus nicht auf der Chelatierung von zweiwertigen Metallionen beruht, führte zu einer Abnahme des in den Überständen detektierbaren Fragmentes NCAM110.

Die Inhibition der Freisetzung des löslichen Fragmentes NCAM110 in Anwesenheit der Metalloproteaseinhibitoren EDTA, sowie GM 6001 und 1,10-o-Phenanthrolin zeigte, dass lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls durch die regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne des Moleküls entstehen. An der Prozessierung membranständiger NCAM-Fragmente scheint eine Metalloprotease beteiligt zu sein. Die Beteiligung einer Cystein- oder Serinprotease an der Spaltung konnte, aufgrund des fehlenden Einflusses des Inhibitors Leupeptin auf die Entstehung des Fragmentes NCAM110, ausgeschlossen werden.

#### 4.1.1.2 PSA-tragende lösliche Fragmente des Moleküls NCAM

Zu den Hauptkomponenten der löslichen NCAM-Formen zählt neben dem bereits in **Kapitel 4.1.1.1** beschriebenen löslichen Fragment des Zelladhäsionsmoleküls NCAM110 ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 180 kDa (sNCAM180) (Nybroe *et al.*, 1989; Krog *et al.*, 1992; Takamatsu *et al.*, 1994).

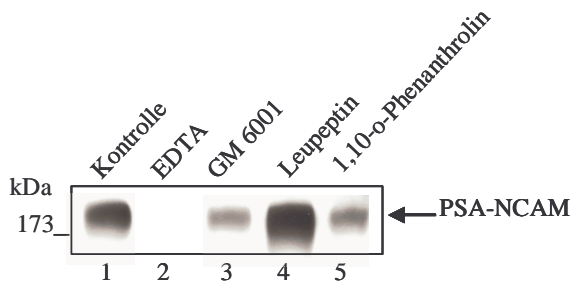
In den Überständen der Ansätze des *Proteolyseassays* (s. 4.1.1.1) konnte zusätzlich zu NCAM110 ein weiteres lösliches Fragment detektiert werden (**Abb. 4.1**, Spur 1 und 4). Das Bruchstück wies ein für lösliche Fragmente des Moleküls NCAM charakteristisches Molekulargewicht von 180 kDa auf. Unter Kontrollbedingungen, in Abwesenheit eines Proteaseinhibitors (**Abb. 4.1**, Spur 1), sowie in Anwesenheit des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (**Abb. 4.1**, Spur 4) war das lösliche NCAM-Fragment mit einem Molekulargewicht von 180 kDa in den Überständen der Ansätze nachweisbar. Im Gegensatz dazu fehlte nach der Inkubation der isolierten Membranen mit den

Metalloproteaseinhibitoren EDTA (**Abb. 4.1**, Spur 2), GM 6001 (**Abb. 4.1**, Spur 3) und 1,10-o-Phenanthrolin (**Abb. 4.1**, Spur 5) das lösliche Fragment sNCAM180 in den Überständen. Die Entstehung des löslichen 180 kDa schweren NCAM-Fragmentes scheint wie die Freisetzung des Fragmentes NCAM110 von der Aktivität einer Metalloprotease abhängig zu sein.

Basiert die Entstehung der löslichen Fragmente NCAM110 und sNCAM180, wie das Ergebnis des *Proteolyseassays* vermuten ließ, auf der Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen, beträgt das zu erwartende Molekulargewicht der von der Membran freigesetzten und für alle NCAM-Isoformen in der Aminosäuresequenz identischen extrazellulären Domäne etwa 110 kDa (s. 1.4.1). Das Molekulargewicht der in den Überständen des *Proteolyseassays* detektierbaren Bande von 180 kDa stand im Gegensatz zu der berechneten Größe der extrazellulären Domäne der Isoformen NCAM180, NCAM140 und NCAM120.- Zahlreiche Moleküle unter anderem auch NCAM werden durch posttranslationale Glykosylierungen modifiziert. NCAM ist jedoch einzigartig darin, dass es eine große Menge des negativ geladenen Zuckers, der  $\alpha$ 2,8-verknüpften Polysialinsäure (PSA) trägt (Hoffman *et al.*, 1982). Kommt es zu einer Freisetzung membrangebundener glykosylierter, mit Polysialinsäure verknüpfter NCAM-Isoformen, so erhöht sich das zu erwartende Molekulargewicht der freigesetzten NCAM-Fragmente um die Anzahl der Zucker. Dies führte zu der Vermutung, dass das in den Überständen der Ansätze des *Proteolyseassays* nachgewiesene lösliche Fragment sNCAM180 durch die Spaltung PSA-tragender membranständiger NCAM-Isoformen entsteht. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Ansätze der Überstände des *Proteolyseassays* erneut mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung eines anti-PSA-Antikörpers untersucht.

Die **Abb. 4.2** zeigt unter Kontrollbedingungen (**Abb. 4.2**, Spur 1) sowie in der Anwesenheit des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (**Abb. 4.2**, Spur 4) ein PSA-tragendes Fragment mit einem Molekulargewicht von 180 kDa, wohingegen in Anwesenheit der Metalloproteaseinhibitoren EDTA (**Abb. 4.2**, Spur 2), GM 6001 (**Abb. 4.2**, Spur 3) und 1,10-o-Phenanthrolin (**Abb. 4.2**, Spur 5) der Anteil des PSA-tragenden Fragmentes in den Überständen reduziert ist. Das

mit dem anti-NCAM-Antikörper 2B2 nachweisbare 180 kDa-Fragment schien mit dem PSA-tragenden Fragment von 180 kDa identisch zu sein.



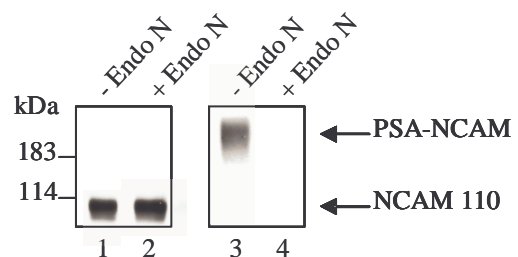
**Abb. 4.2:** Nachweis der löslichen PSA-tragenden NCAM-Fragmente in den Überständen des *in vitro* Proteolyseassays nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren. Isolierte Membranen wurden für 2 h bei 37 °C in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) der Proteaseinhibitoren EDTA (5 mM, Spur 2), GM 6001 (10 µM, Spur 3), Leupeptin (10 µM, Spur 4) und 1,10-o-Phenanthrolin (10 µM, Spur 5) inkubiert (s. 3.1.10). Im Anschluss wurden die Proben durch Zentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Die in den Überständen enthaltenen Proteine wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-PSA-Antikörpers untersucht.

Dieses Ergebnis unterstützte die Vermutung, dass lösliche Fragmente mit einem Molekulargewicht größer als 110 kDa durch die Spaltung membranständiger glykosylierter NCAM-Isoformen entstehen.

Um diese Hypothese zu untermauern, wurde der in Abwesenheit von Proteaseinhibitoren inkubierte Überstand eines

*Proteolyseassays* einem enzymatischen Verdau mit dem Enzym Endo N unterzogen (s. 3.1.11). Das auch als Endo-Neuraminidase bezeichnete Enzym ist in der Lage, innerhalb einer  $\alpha$ 2,8-verknüpften Sialinsäurekette zu spalten.

Der Nachweis der löslichen NCAM-Fragmente mit Hilfe des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 in den Überständen des *in vitro* *Proteolyseassays* zeigte in An- und Abwesenheit des Enzyms eine Bande mit einem Molekulargewicht von 110 kDa (**Abb. 4.3**, Spur 1 und 2). Daraus folgte, dass das in den Überständen der *Proteolyseassays*



**Abb. 4.3:** Analyse des enzymatischen Verdaus der Proben des *in vitro* *Proteolyseassays* unter Kontrollbedingungen mit dem Enzym Endo N. Der in Abwesenheit eines Proteaseinhibitors inkubierte Überstand eines *Proteolyseassays* wurde ü.N. in Ab- (Spur 1 und 3) bzw. Anwesenheit des Enzyms (Spur 2 und 4) Endo N verdaut (s. 3.1.11). Die in den Ansätzen enthaltenen Proteine wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 (Spur 1 und 2) sowie des anti-PSA-Antikörpers (Spur 3 und 4) untersucht. Die Position der unterschiedlichen NCAM-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

detektierbare Fragment NCAM 110 keine

Glykosylierungen in Form der Polysialinsäure aufwies. Ein lösliches Fragment mit einem Molekulargewicht von 180 kDa konnte in den Ansätzen des *in vitro* Proteolyseassays mit Hilfe anti-NCAM-Antikörpers 2B2 nicht nachgewiesen werden. Die Menge der PSA-tragenden NCAM-Fragmente schien in diesem Versuch unter der Nachweisgrenze zu liegen. Im Gegensatz dazu war das Fragment sNCAM180 unter Verwendung des anti-PSA-Antikörpers in dem Überstand des nicht mit dem Enzym Endo N behandelten Ansatzes detektierbar (**Abb. 4.3**, Spur 3). Der anti-PSA-Antikörper scheint im Vergleich zu dem anti-NCAM-Antikörper 2B2 eine höhere Spezifität für PSA-tragende Proteine, d.h. für PSA-tragende NCAM-Formen aufzuweisen. In dem mit Endo N verdauten Ansatz konnte kein PSA-tragendes Fragment in dem Überstand detektiert werden (**Abb. 4.3**, Spur 4). Die Neuraminidase spaltet Polysialinsäureketten und entfernt somit das Erkennungsepitop des anti-PSA-Antikörpers. Dies führt dazu, dass die in dem Ansatz enthaltenen NCAM-Fragmente von dem anti-PSA-Antikörper nicht mehr erkannt werden können.

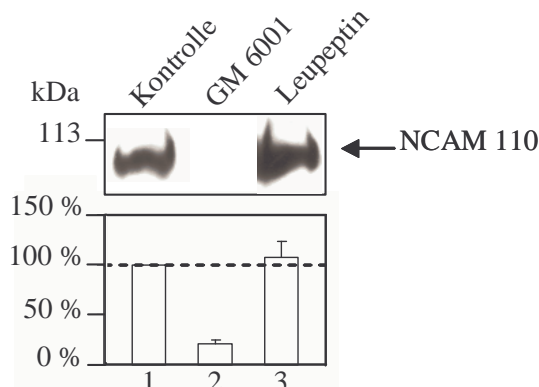
Die Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen scheint unabhängig von dem Glykosylierungsmuster der Proteine zu erfolgen. Lösliche NCAM-Fragmente mit einem Molekulargewicht von 110 kDa entstehen durch die Spaltung membranständiger nicht-glykosylierter NCAM-Isoformen, wohingegen lösliche NCAM-Fragmente mit einem Molekulargewicht größer als 110 kDa durch die Spaltung glykosylierter NCAM-Isoformen entstehen.

#### 4.1.1.3 Metalloproteasen als verantwortliche Enzyme?

Die Ergebnisse des *in vitro* Proteolyseassays (s. 4.1.1.1) führten zu der Vermutung, dass lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM durch die Spaltung der extrazellulären Domäne des Moleküls entstehen, an der eine Metalloprotease beteiligt zu sein scheint. Um diese Vermutung zu bekräftigen, wurden in Zellkultur *in vivo* Inhibitorassays (s. 3.3.2) unter Verwendung verschiedener Proteaseinhibitoren durchgeführt.

In den Zellkulturüberständen des *Inhibitorassays* konnte unter Kontrollbedingungen, in Abwesenheit eines Proteaseinhibitors (**Abb. 4.4**, Spur 1)

und in Anwesenheit des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (**Abb. 4.4**, Spur 3) ein NCAM-Fragment mit einem Molekulargewicht von 110 kDa nachgewiesen werden. In Anwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001



**Abb. 4.4: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.** Zellen der Zelllinie Neuro 2a wurden in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 (10  $\mu$ M, Spur 2) und des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (10  $\mu$ M, Spur 3) inkubiert (s. 3.3.2). Im Anschluss wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2) unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 untersucht. Das Blockdiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente.

(**Abb. 4.4**, Spur 2) war das Fragment NCAM110 nicht detektierbar. Lösliche NCAM-Fragmente mit einem Molekulargewicht größer als 110 kDa fehlten in den Zellkulturüberständen. Die Glykosylierungsmuster von Proteinen der Neuroblastomazelllinie Neuro 2a scheinen sich von denen der murinen NCAM-Proteine zu unterscheiden.

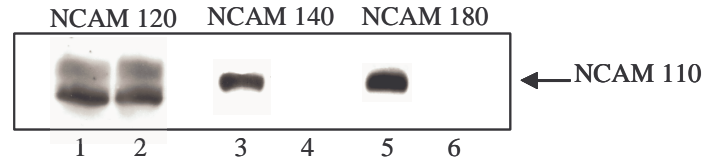
Das Ergebnis des *in vivo* Inhibitorassays unterstützte die Hypothese, dass lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM durch die Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen entstehen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* scheint eine Metalloprotease und keine Serin- oder Cysteinprotease für die Freisetzung der extrazellulären Domäne verantwortlich zu sein.

#### 4.1.1.4 Proteasen und Phospholipasen: zwei verschiedene Mechanismen?

Das lösliche Fragment NCAM110 kann *in vitro* durch die Behandlung mit der *phosphatidylinositol-specific Phospholipase C* (He *et al.*, 1986; Sadoul *et al.*, 1986) generiert werden. Das Enzym PI-PLC ist in der Lage, GPI-verankerte Proteine durch Spaltung ihres Membranankers zu solubilisieren. Darüber hinaus konnten Endo *et al.* in *in vitro*-Studien zeigen, dass die membranverankerten Isoformen

NCAM140 und NCAM180 von der Serinprotease Plasmin gespalten werden können (Endo *et al.*, 1998; Endo *et al.*, 1999). Allerdings weisen die entstandenen Spaltprodukte Molekulargewichte von 60 kDa und 90 kDa auf. Die Freisetzung löslicher NCAM-Fragmente scheint auf zwei verschiedenen Mechanismen zu beruhen, an denen Enzyme unterschiedlicher Klassen beteiligt sind. So wird vermutet, dass die Isoform NCAM120 durch die Spaltung des GPI-Membranankers unter Beteiligung von Phospholipasen von der Membran gelöst wird. In den Prozess der Spaltung der membranständigen NCAM-Isoformen NCAM140 und NCAM180 scheinen dagegen Proteasen involviert zu sein.

Zur Beantwortung der Frage, welche der NCAM-Isoformen durch die Prozessierung der extrazellulären Domäne unter Beteiligung einer Metalloprotease von der Membran gelöst werden kann, wurden in Zellkulturexperimenten NCAM-negative Zellen der Zelllinie CHO transient mit den Expressionskonstrukten kodierend für die membranständigen Isoformen NCAM180, NCAM140 und der GPI-verankerten NCAM-Isoform NCAM120



**Abb. 4.5:** Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit den Expressionskonstrukten NCAM180, NCAM140 und NCAM120 transfizierten CHO-Zellen nach der Inkubation mit dem Metalloproteaseinhibitor GM 6001. Zellen der Zelllinie CHO wurden transient mit den Expressionskonstrukten NCAM180, NCAM140 und NCAM120 transfiziert und anschließend in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1, 3 und 5) des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 (10 µM, Spur 2, 4 und 6) inkubiert (s. 3.3.3). Im Anschluss wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 untersucht.

transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 inkubiert, der in der Lage ist, die an der Entstehung löslicher NCAM-Fragmente beteiligte Metalloprotease zu inhibieren.

In Abwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 wurde in den Zellkulturüberständen der transient mit den Expressionskonstrukten NCAM180 und NCAM140 transfizierten Zellen eine 110 kDa Bande (**Abb. 4.5**, Spur 3 und 5) nachgewiesen, wohingegen nach der Transfektion der Zellen mit dem Expressionskonstrukt NCAM120 zwei Banden (**Abb. 4.5**, Spur 1) mit einem

Molekulargewicht von 100 kDa und 120 kDa detektierbar waren. Die durch Spaltung der NCAM-Isoform NCAM120 entstandenen Fragmente unterschieden sich von dem durch Prozessierung der Isoformen NCAM140 und NCAM180 freigesetzten Fragment.

Nach der Behandlung der mit NCAM140 und NCAM180 transfizierten Zellen mit dem Metalloproteaseinhibitor GM 6001 fehlte das Fragment mit einem Molekulargewicht von 110 kDa in den Zellkulturüberständen (**Abb. 4.5**, Spur 4 und 6). Die Freisetzung des extrazellulären Anteils der GPI-verankerten Isoform NCAM120 wurde durch die Inkubation mit dem Inhibitor GM 6001 nicht beeinflusst (**Abb. 4.5**, Spur 2).

Daraus folgte, dass das lösliche Fragment NCAM110 durch die proteolytische Spaltung der extrazellulären Domäne der Transmembranproteine NCAM180 und NCAM140 unter Beteiligung einer Metalloprotease freigesetzt wird. Der Spaltung der GPI-verankerten NCAM-Isoform NCAM120 liegt dagegen ein anderer Mechanismus zugrunde. Zusammenfassend lässt sich aus diesem Ergebnis schlussfolgern, dass die Entstehung löslicher NCAM-Fragmente von zwei verschiedenen Mechanismen reguliert wird.

#### 4.1.1.5 Die Metalloprotease TACE (*TNF $\alpha$ converting enzyme*)

An der regulierten Proteolyse von Transmembranproteinen sind neben den der Metalloproteasefamilie zugehörigen Mitgliedern der MMPs (s. 1.2.1.2) und den Prohormonkonvertasen (s. 1.2.1) vor allem Vertreter der ADAM-Familie (s. 1.2.1.1) beteiligt (Werb und Yan, 1998). ADAMs gehören zu der Familie der Metalloproteasen. Sowohl die Ergebnisse des *in vitro* Proteolyseassays (s. 4.1.1.1), als auch des *in vivo* Inhibitorassays (s. 4.1.1.3) wiesen darauf hin, dass für die Spaltung der membranständigen Isoformen NCAM180 und NCAM140 eine Metalloprotease verantwortlich ist. Die Vermutung lag daher nah, dass in die Freisetzung löslicher NCAM-Fragmente eine Mitglied der ADAM-Familie involviert sein könnte. Die Metalloprotease ADAM 17, auch als *tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme* (TACE) bezeichnet, zählt zu den am besten untersuchten

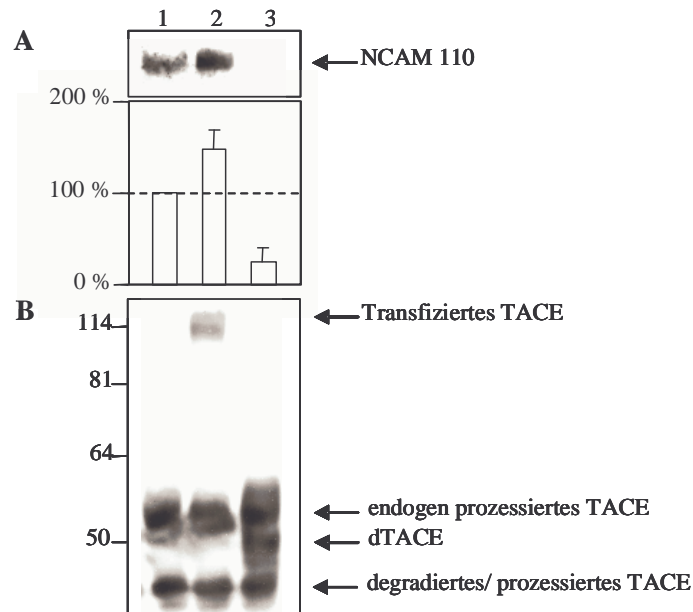
Vertretern der ADAM-Familie. Zahlreiche Substrate der Protease konnten bereits identifiziert werden.

Erste Hinweise für eine Beteiligung der Metalloprotease ADAM17 an der Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen gaben Versuche mit TACE-defizienten Fibroblasten, die mit einem TACE-Expressionkonstrukt retransfiziert wurden. Erst nach der Transfektion war in den Zellkulturüberständen der Fibroblasten ein lösliches NCAM-Fragment mit einem Molekulargewicht von 110 kDa nachweisbar (Bohrmann, 2001).

Um die Hinweise der Beteiligung von TACE an der Prozessierung von NCAM zu untermauern, wurde ein dominant-negativer Versuchsansatz gewählt. Zellen der Zelllinie Neuro 2a wurden mit einem Kontrollvektor, einem Expressionskonstrukt kodierend für TACE und einem Expressionskonstrukt kodierend für eine defiziente Form von TACE (dTACE) transient transfiziert (s. 3.3.3). Das von dem Expressionkonstrukt dTACE exprimierte Protein enthält keine Proteasedomäne und ist somit proteolytisch inaktiv. Die Deletion der katalytischen Domäne eines Enzyms kann unter anderem die Faltung und Reifung des Proteins negativ beeinflussen. Eine Akkumulation des mutierten Proteins im ER könnte die Folge sein. Weiterhin kann die Deletion der katalytischen Domäne auch zu einer veränderten zellulären Lokalisierung der Protease führen. Darüber hinaus sind dominant-negative Konstrukte von Proteasen der ADAM-Familie in der Lage, Substrate über adhäsive Domänen zu binden, sie aber nicht proteolytisch zu spalten. Es kommt zu einer Blockierung des Enzyms durch das Substrat, das für andere proteolytisch aktive Enzyme nicht mehr zur Verfügung steht (Beer *et al.*, 1999).

Die **Abb. 4.6 A** zeigt ein lösliches NCAM-Fragment in den Zellkulturüberständen der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen (**Abb. 4.6 A**, Spur 1). Eine geringe Zunahme des Fragmentes NCAM110 war nach der Transfektion der Zellen mit dem Expressionskonstrukt für die funktionelle Form der Protease TACE detektierbar (**Abb. 4.6 A**, Spur 2). Im Gegensatz dazu führte die Transfektion mit dem dominant-negativen TACE-Konstrukt zu einer Abnahme des löslichen NCAM-Fragmentes auf weniger als 25 % der in den Kontrollansätzen nachgewiesenen Menge, wie das Blockdiagramm in **Abb. 4.6 A** zeigt. Neben

endogenem TACE mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, sowie prozessiertem endogenem Enzym (**Abb. 4.6 B**, Spur 1) konnte in den Zellextrakten der transfizierten Zellen sowohl aktives TACE (110 kDa, **Abb. 4.6 B**, Spur 2), als auch die dominant-negative Form von TACE mit einem Molekulargewicht von 45 kDa (**Abb. 4.6 B**, Spur 3) nachgewiesen werden.



**Abb. 4.6: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit den Expressionskonstrukten TACE und dTACE transfizierten Neuro 2a-Zellen.** **A:** Zellen der Neuroblastoma Zelllinie Neuro 2a wurden mit einem Kontrollvektor (pcDNA3, Spur 1), einem Expressionskonstrukt kodierend für TACE (Spur 2) und einem Expressionskonstrukt kodierend für eine defiziente Form von TACE (dTACE, Spur 3) transient transfiziert (s. 3.3.3). Die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 untersucht. Das Blockdiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente. **B:** Zur Kontrolle der von den eingebrachten Expressionskonstrukten exprimierten TACE-Proteine wurden die transfizierten Zellen aufgearbeitet (s. 3.3.1) und die Proteine mit Hilfe der Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-TACE-Antikörpers analysiert. Die Lage der verschiedenen TACE-

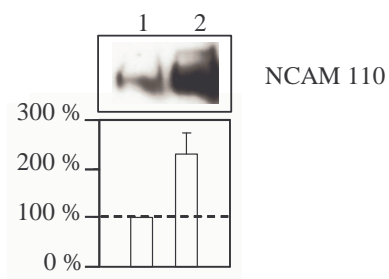
Dieser Versuch zeigte, dass die Metalloprotease TACE, ein Mitglied der ADAM-Familie, in der Lage ist, membranständige NCAM-Isoformen zu spalten.

## 4.1.2 Calmodulin und das Zelladhäsionsmolekül NCAM

### 4.1.2.1 Regulation der Prozessierung von NCAM durch Calmodulin

Für das Verständnis der Funktion der Proteolyse von Transmembranproteinen ist die Identifizierung der beteiligten Proteasen und vor allem die diesen Prozess bestimmenden Regulationsmechanismen essentiell. Diaz-Rodriguez *et al.* konnten zeigen, dass an der Regulation des *Ectodomain Sheddings* der Transmembranproteine des *transforming growth factor- $\alpha$  receptors*, des *amyloid precursor proteins*, der *tyrosine receptor kinase A* oder des *L-selectins* der Kalziumsensor Calmodulin beteiligt ist. Calmodulininhibitoren stimulieren die Freisetzung der extrazellulären Domäne dieser Moleküle (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000).

Um zu überprüfen, ob die Prozessierung der membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180 ebenfalls durch Calmodulin beeinflusst wird, wurden Zellen der Zelllinie Neuro 2a in An- bzw. Abwesenheit des Calmodulininhibitors CGS 9343 B kultiviert.

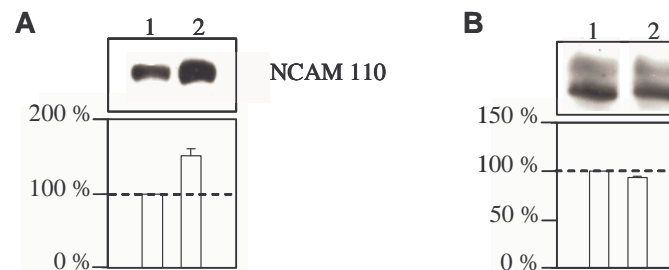


**Abb. 4.7: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit dem Calmodulininhibitor CGS 9343 B.** Zellen der Zelllinie Neuro 2a wurden in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) des Calmodulininhibitors CGS 9343 B (10  $\mu$ M, Spur 2) inkubiert (s. 3.3.2). Im Anschluss wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 untersucht. Das Blockdiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente.

In Anwesenheit des Calmodulininhibitors konnte eine Zunahme des NCAM110-Fragmentes im Zellkulturüberstand um mehr als 100 % im Vergleich zu den Zellkulturüberständen der nicht behandelten Zellen detektiert werden (**Abb. 4.7**, Spur 2). Calmodulin scheint auch die Prozessierung von NCAM negativ zu beeinflussen.

Diese Vermutung wurde durch folgendes Ergebnis unterstützt: Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen (**Abb. 4.8 A**, Spur 1) stimulierte der Calmodulininhibitor

CGS 9343 B (**Abb. 4.8 A**, Spur 2) die Freisetzung des löslichen Fragmentes NCAM110 nach der Transfektion von Zellen der Zelllinie CHO mit dem Expressionskonstrukt NCAM140. Die densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente führt zu einer Zunahme des löslichen NCAM110 in Anwesenheit des Calmodulininhibitors um das 1,5 fache.



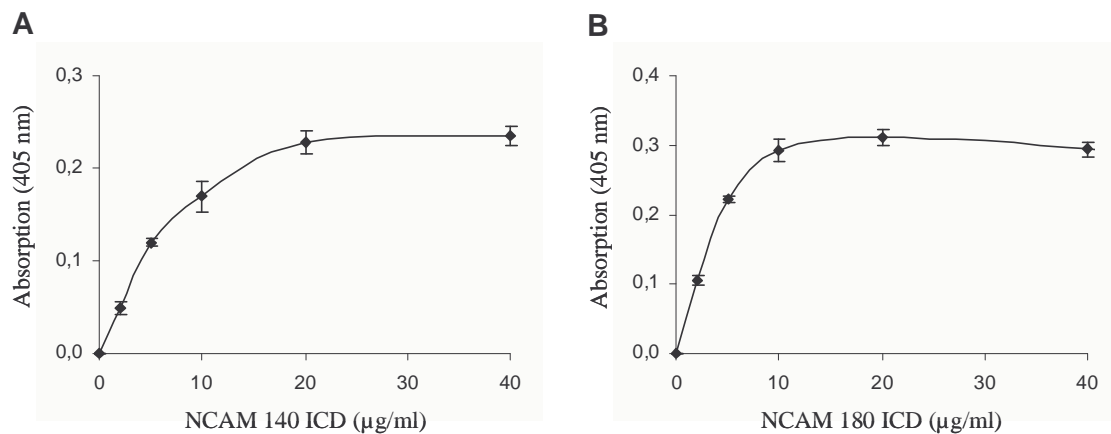
**Abb. 4.8:** Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit den Expressionskonstrukten NCAM140 (A) und NCAM120 (B) transfizierten CHO-Zellen nach der Inkubation mit dem Calmodulininhibitor CGS 9343 B. Zellen der Zelllinie CHO wurden transient mit den Expressionskonstrukten NCAM140 (A) und NCAM120 (B) transfiziert und anschließend in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) des Calmodulininhibitors CGS 9343 B (10  $\mu$ M, Spur 2) inkubiert (s. 3.3.2). Im Anschluss wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 untersucht. Das Blockdiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente.

Der Calmodulininhibitor (**Abb. 4.8 B**, Spur 2) zeigte dagegen keinerlei Effekt auf die Freisetzung des löslichen NCAM-Fragmentes in den Zellkulturüberständen von transient mit dem Expressionskonstrukt NCAM120 transfizierten Zellen. Das Ergebnis war ein weiterer Hinweis dafür, dass die Entstehung löslicher Fragmente des GPI-verankerten Proteins NCAM120 auf einem anderen Mechanismus beruht.

#### 4.1.2.2 Calmodulin als Interaktionspartner

Die Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls *L-selectin* wird ebenso wie die Proteolyse des NCAMs negativ von Calmodulin beeinflusst (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000). Die Regulation der Spaltung des Proteins *L-selectin* ist von einer direkten Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit dem Kalziumsensor Calmodulin abhängig (Kahn *et al.*, 1998; Matala *et al.*, 2001). Dies implizierte die Frage, ob auch die Regulation der Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM durch Calmodulin auf eine direkte Interaktion der Proteine zurückzuführen ist.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden ELISA-Studien (s. 3.1.13) durchgeführt. Sowohl für die intrazelluläre Domäne von NCAM140 (**Abb. 4.9 A**), als auch für die intrazelluläre Domäne von NCAM180 (**Abb. 4.9 B**) konnte eine konzentrationsabhängige Bindung an Calmodulin nachgewiesen werden. Die intrazelluläre Domäne von NCAM180 wies im Vergleich zu der intrazellulären



**Abb. 4.9: Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von NCAM140 (A) und NCAM180 (B) mit Calmodulin.** Mit Calmodulin in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 in steigenden Konzentrationen von je 2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml und 40 µg/ml inkubiert (s. 3.1.13). Die Bindung der möglichen Interaktionspartner von Calmodulin wurde im Fall der intrazellulären Domäne von NCAM140 mit Hilfe des anti-NCAM-Antikörpers 5B8 und für den Nachweis der gebundenen intrazellulären Domäne von NCAM180 unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers D3 nachgewiesen.

Domäne von NCAM140 eine höhere Affinität zu Calmodulin auf, wie der steilere Anstieg der Bindungskurve der intrazellulären Domäne von NCAM180 (**Abb. 4.9**, vergleiche B mit A) verdeutlichte. Die Bindung von Calmodulin an die intrazelluläre Domäne von NCAM180 erreichte bereits bei einer Konzentration von 15 µg/ml eine Sättigung. Calmodulin und die intrazelluläre Domäne von NCAM140 dagegen lagen erst bei einer Konzentration des Bindungspartners von 25 µg/ml in einem Gleichgewichtszustand vor.

Das Ergebnis der ELISA-Studien untermauerte die Aussage früherer Immunpräzipitationsexperimente, in denen gezeigt werden konnte, dass Calmodulin mit den intrazellulären Domänen von NCAM180 und NCAM140 interagiert (Bohrmann, 2001). Auch die Untersuchung der Interaktion der beteiligten Moleküle mittels *Surface Plasmon Resonance* (Biacore) deutete auf eine kalzium- und magnesiumabhängige Interaktion der intrazellulären Domänen von NCAM180 und NCAM140 mit Calmodulin hin (Bohrmann, 2001).

Calmodulin interagiert kalziumabhängig über zwei verschiedene Aminosäuremotive mit seinen potentiellen Bindungspartnern. Die Bindungsmotive werden basierend auf der Lage von hydrophoben Aminosäuren als „1-5-10“-Motiv mit der Konsensussequenz [FILVW]XXX[FILV]XXXX[FILVW] und „1-8-14“-Motiv mit der Konsensussequenz [FILVW]XXXXXX[FAILVW]XXXXX[FILVW] bezeichnet. Das „1-8-14“-Motiv wird weiterhin unterteilt in Typ A, welches eine zusätzliche hydrophobe Aminosäure an der Position 5 (F, A, I, L, V und W)

14      8    5    1      Peptid 1 MDITCYFLNKCGLLMCI <sup>14</sup> AVNLC <sup>8</sup> CGKAGP <sup>5</sup> GA <sup>1</sup> KGKDMEEGKA <sup>14</sup> AFSKDESKEPI MDITCYFLNKCGLLMCI <sup>14</sup> AVNLC <sup>8</sup> CGKAGP <sup>5</sup> GA <sup>1</sup> KGKDMEEGKA <sup>14</sup> AFSKDESKEPI	NCAM140IC NCAM180IC
Peptid 2 VEVRT <sup>14</sup> EEERTPNHDGGKHTEPN <sup>8</sup> ETTPLEPE----- VEVRT <sup>14</sup> EEERTPNHDGGKHTEPN <sup>8</sup> ETTPLEPEL <sup>14</sup> PADTTATVEDMLPSVTTV  ----- TTNSDTITET <sup>14</sup> FATAQNSPTSETTTLTSS <sup>8</sup> IAPPATTVPDSNSVPAGQATPS  ----- KGV <sup>14</sup> TASSSSPASAPKVAPLV <sup>8</sup> DLSDTPTSAPSASNLSS <sup>14</sup> TVLANQGAVLSPS  ----- TPASAGETSKAPPASKASPAPTPTPAGAASPLA <sup>14</sup> AVAAPATDAPQAKQEAP  ----- STKGPDP <sup>14</sup> PEPTQPGTVKNPPEAATAPASP <sup>8</sup> KSKAATTNPSQGEDLKMDEGNF  -----	NCAM140IC NCAM180IC  NCAM140IC NCAM180IC  NCAM140IC NCAM180IC  NCAM140IC NCAM180IC  NCAM140IC NCAM180IC
Peptid 3 PVETKSE <sup>14</sup> PQSESEAKPAPTEV <sup>8</sup> KTV <sup>14</sup> PN <sup>14</sup> EATQTKENESKA PVETKSE <sup>14</sup> PESESEAKPAPTEV <sup>8</sup> KTV <sup>14</sup> PN <sup>14</sup> EATQTKENESKA	NCAM140IC NCAM180IC

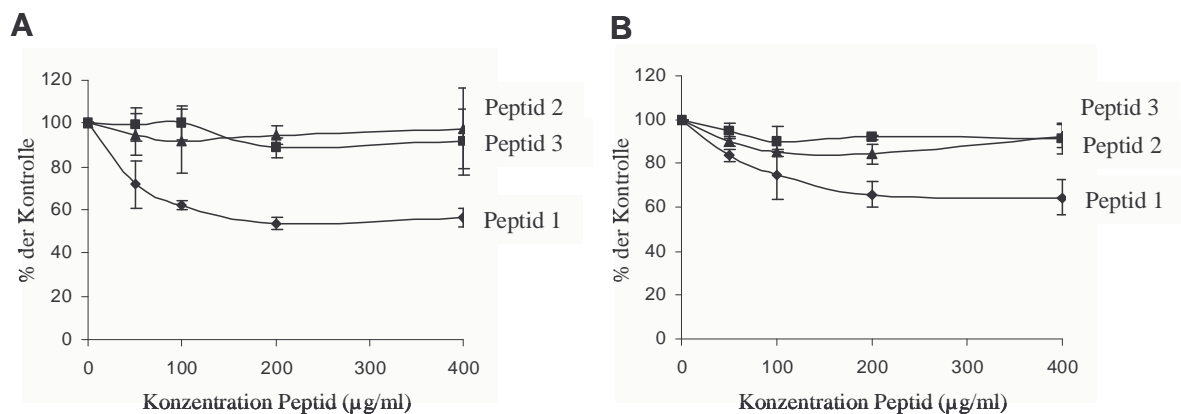
**Abb. 4.10: Lokalisierung eines putativen Calmodulinbindungsmotivs in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180.** Sequenzvergleiche führten zu der Identifizierung eines putativen invertierten „1-5-8-14“-Calmodulinbindungsmotivs (grün hinterlegt) in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180. Die Lage der in den ELISA-Experimenten eingesetzten Peptide Peptid 1 (rot), Peptid 2 (blau) und Peptid 3 (orange) ist farblich hervorgehoben.

aufweist („1-5-8-14“- Motiv) und Typ B („1-8-14“-Motiv). Aufgrund der zweifachen pseudo-Symmetrie des Calmodulinmoleküls ist Calmodulin nicht nur in der Lage, Sequenzmotive in der Orientierung von Amino- nach Carboxyterminus, sondern auch in reverser Orientierung zu binden (Rhoads und Friedberg, 1997). Die Analyse der Aminosäuresequenz der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 führten zu der Identifizierung eines möglichen invertierten Calmodulinbindungsmotivs („1-5-8-14“- Motiv) (**Abb. 4.10**).

Zur genaueren Lokalisierung des Calmodulinbindungsmotives in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 wurden Konkurrenzexperimente in Anwesenheit von Peptiden durchgeführt, die

verschiedene Abschnitte der Aminosäuresequenz der intrazellulären Domänen des Moleküls NCAM140 und NCAM180 repräsentieren (s. 3.1.13). Die Lage der Peptide in bezug auf die intrazellulären Domänen der Proteine NCAM180 und NCAM140 ist der **Abb. 4.10** zu entnehmen. Das Peptid 1 enthielt die Konsensussequenz für das putative Calmodulinbindungsmotiv „1-5-8-14“.

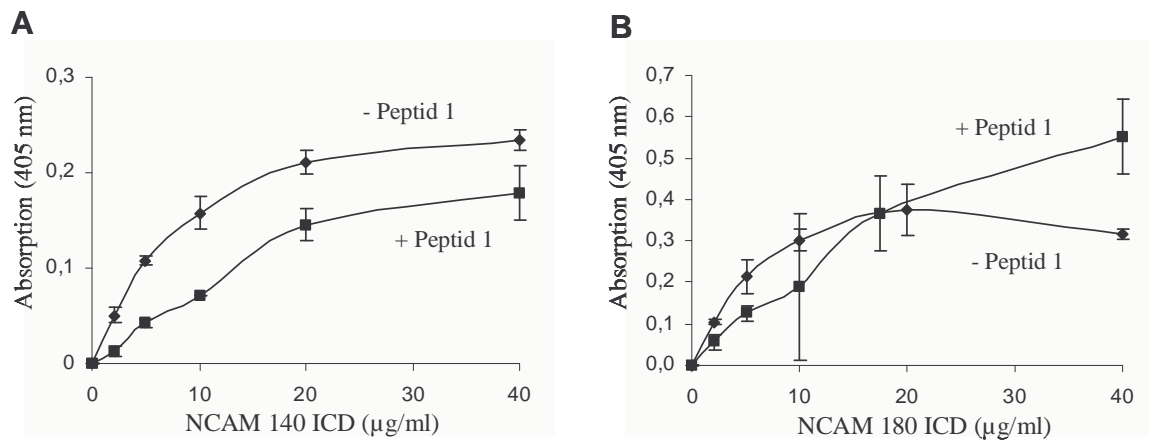
Wie die **Abb. 4.11 A und B** zeigt, haben die Peptide 2 und 3 keinen Einfluss auf die Interaktion von Calmodulin mit den intrazellulären Domänen von NCAM180 und NCAM140. In Anwesenheit des Peptids 1 kam es jedoch zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Bindung von Calmodulin an seine



**Abb. 4.11: Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von NCAM140 (A) und NCAM180 (B) mit Calmodulin in Anwesenheit der Peptide 1 - 3.** Mit Calmodulin in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 in einer konstanten Konzentration von 10 µg/ml in Anwesenheit der Peptide 1 - 3, die in steigenden Konzentrationen von 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml bis 400 µg/ml zugesetzt wurden, inkubiert (s. 3.1.13). Die Bindungseffizienz der Interaktionspartner von Calmodulin wurde im Fall der intrazellulären Domäne von NCAM140 mit Hilfe des anti-NCAM-Antikörpers 5B8 und im Fall der intrazellulären Domäne von NCAM180 unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers D3 nachgewiesen.

Interaktionspartner, die bei einer Konzentration des Peptids 1 von etwa 200 µg/ml eine Sättigung erreichte. Das Peptid 1, das das putative Calmodulinbindungsmotiv trägt, war in der Lage, mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 um die von Calmodulin präsentierten Bindungsstellen zu kompetieren. Die Interaktion konnte jedoch nicht vollständig inhibiert werden. Aus diesen Ergebnissen folgte, dass das putative Calmodulinbindungsmotiv der Moleküle NCAM140 und NCAM180 in der Aminosäuresequenz des Peptids 1 lokalisiert zu sein scheint.

Um auszuschließen, dass die Beeinflussung der Interaktion von Calmodulin mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 durch das Peptid 1 auf einem indirekten Mechanismus wie einer Konformationsänderung der Bindungspartner NCAM140-ICD und NCAM180-ICD beruht, wurden weitere ELISA-Studien (s. 3.1.13) mit steigenden Konzentrationen der intrazellulären Domänen von NCAM180 und NCAM140 in Anwesenheit einer konstanten



**Abb. 4.12: Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von NCAM140 (A) und NCAM180 (B) mit Calmodulin in Anwesenheit des Peptids 1.** Mit Calmodulin in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit steigenden Konzentrationen der intrazellulären Domänen von NCAM180 und NCAM140 (2 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml und 40 µg/ml) in Anwesenheit einer konstanten Konzentration des Peptids 1 von 200 µg/ml inkubiert (s. 3.1.13). Die Bindungseffizienz der Interaktionspartner von Calmodulin wurde im Fall der intrazellulären Domäne von NCAM140 mit Hilfe des anti-NCAM-Antikörpers 5B8 und im Fall der intrazellulären Domäne von NCAM180 unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers D3 nachgewiesen.

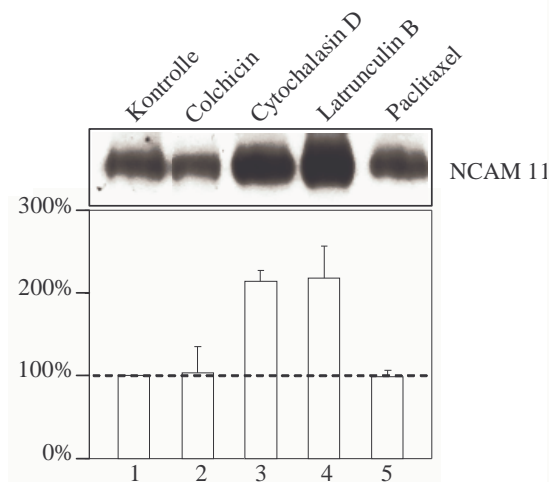
Konzentration des Peptids 1 durchgeführt. In Anwesenheit des Peptids 1 war die Dissoziationskonstante für die Bindung der intrazellulären Domäne von NCAM140 an Calmodulin erhöht, wie eine kleinere Steigung der Kurve verdeutlichte (**Abb. 4.12 A**). Eine geringere Anzahl von Bindungspartnern kann an das immobilisierte Calmodulin binden, da das kompetierende Peptid die Bindungsstellen besetzt. Dies führt dazu, dass die Bindung auf einem niedrigeren Niveau in der Sättigung endet. Auch die Bindung von Calmodulin an die intrazelluläre Domäne von NCAM180 wurde bei Konzentrationen der intrazellulären Domäne von NCAM180 kleiner als 5 - 10 µg/ml durch das Peptid 1 kompetiert. Höhere Konzentrationen der intrazellulären Domäne führten jedoch zu einem fast linearen Anstieg der Kurve, der das Plateau der Bindungskurve in

Abwesenheit des Peptids übertraf und unter den eingesetzten Konzentrationen keine Sättigung erreichte.

### 4.1.3 Das Zytoskelett und das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

#### 4.1.3.1 Regulation der Prozessierung von NCAM durch das Aktinzytoskelett

Die Modulation des Aktinzytoskeletts durch Aktin-stabilisierende oder -destabilisierende Substanzen beeinflusst die Prozessierung zahlreicher Transmembranproteine wie CD 44 (Shi *et al.*, 2001), Fcγ-Rezeptor III, CD 43 und *L-selectin* (Middelhoven *et al.*, 1999) sowie der membranständigen Metalloprotease MT1-MMP (Annabi *et al.*, 2001). Das Aktinzytoskelett scheint daher an der Regulation der Prozessierung von Transmembranproteinen beteiligt zu sein. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist in Prozesse wie das Neuritenwachstums (Doherty *et al.*, 1990) und der Zellmigration (Thomaidou *et*



**Abb. 4.13: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit Zytoskelett-modulierenden Substanzen.** Zellen der Zelllinie Neuro 2a wurden in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) der Mikrotubuli-stabilisierenden Substanz Colchicin (2 µM, Spur 2), der Aktin-destabilisierenden Substanzen Cytochalasin D (1 µM, Spur 3) und Latrunculin B (10 µM, Spur 4) und der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Paclitaxel (50 nM, Spur 5) inkubiert (s. 3.3.2). Im Anschluss wurden die in den Zellkulturüberständen enthaltenen Proteine mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-NCAM-Antikörpers 2B2 untersucht. Das Blockdiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente.

*al.*, 2001b) involviert, die auf dem Auf- und Abbau von Elementen des Zytoskeletts beruhen. Im folgenden wurde der Einfluss des Zytoskeletts auf die Regulation der Prozessierung von NCAM mit Hilfe von *in vivo Inhibitorassays* in An- bzw. Abwesenheit von Aktin- bzw. Tubulin-stabilisierenden oder -destabilisierenden Agentien untersucht (s. 3.3.2).

Sowohl unter Kontrollbedingungen (**Abb. 4.13**, Spur 1) als auch unter dem Einfluss der Mikrotubuli-destabilisierenden Substanz Colchicin (**Abb. 4.13**, Spur 2) und der Mikrotubuli-stabilisierenden Substanz Paclitaxel (**Abb. 4.13**, Spur 5) konnte das lösliche Fragment NCAM110 in den Zellkulturüberständen der behandelten Zellen nachgewiesen werden. Die Aktin-destabilisierenden Substanzen Cytochalasin D (**Abb. 4.13**, Spur 3) und Latrunculin B (**Abb. 4.13**, Spur 4) stimulierten hingegen die Proteolyse von NCAM. Es kam zu einer Zunahme des löslichen Fragmentes NCAM110 in den Zellkulturüberständen der behandelten Zellen um etwa 100 % im Vergleich zu den Kontrollansätzen, wie die densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente zeigt.

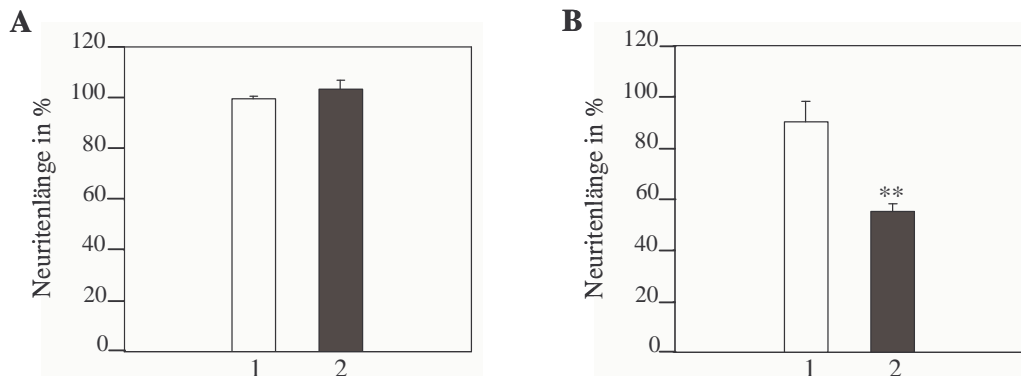
Aus den Ergebnissen folgte, dass das Aktinzytoskelett, nicht aber Mikrotubuli, an der Regulation der Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls NCAM beteiligt sind.

#### **4.1.3.2 Bedeutung der Proteolyse von NCAM für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum**

Die Beeinflussung der Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls NCAM durch die Modulation des Aktinzytoskeletts (s. 4.1.3.1) führte zu der Vermutung, dass die Prozessierung des Moleküls NCAM auch an dem Prozess des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums, einem von dem Zytoskelett regulierten Vorgang, beteiligt ist. Kleinhirnneurone von NCAM-defizienten Mäusen zeigen auf dem Substrat NCAM kein Neuritenwachstum. Daraus folgt, dass NCAM-abhängiges Neuritenwachstum auf einer homophilen Interaktion von NCAM-Molekülen basiert (Williams *et al.*, 1994). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Effekt des Metalloproteaseinhibitors GM 6001, für den in vorhergehenden Experimenten (s. 4.1.1.3, 4.1.1.5) eine inhibitorische Wirkung auf die Proteolyse von NCAM nachgewiesen werden konnte, auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum von Kleinhirnexplantaten der Maus (s. 3.3.5.2) untersucht.

Der Metalloproteaseinhibitor GM 6001 zeigte keinen Einfluss auf poly-L-Lysin-abhängiges Neuritenwachstum (**Abb. 4.14 A**, Balken 2). Im Vergleich dazu wurde NCAM-abhängiges Neuritenwachstum in Anwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 (**Abb. 4.14 B**, Balken 2) auf weniger als 60 %

des Kontrollansatzes reduziert. Poly-L-Lysin- und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum zeigten in Anwesenheit des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 4.14 A und B**, Balken 1). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass eine Metalloprotease, jedoch keine Serin- oder Cysteinprotease an der Vermittlung des NCAM-

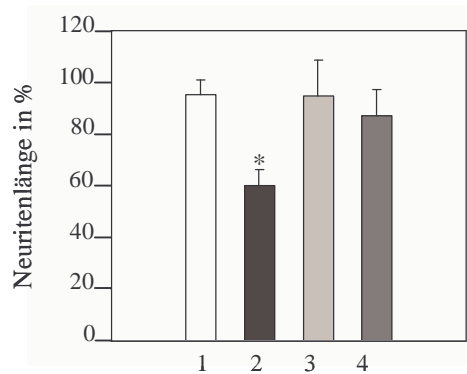


**Abb. 4.14: Effekt des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin und des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum.** Kleinhirnexplantate der Maus (s. 3.3.5.2) wurden auf poly-L-Lysin (A) bzw. auf, mit einer Kombination aus poly-L-Lysin und murinem NCAM (B) beschichteten Deckgläschen in Ab- bzw. Anwesenheit des Serin- und Cysteininhibitors Leupeptin (10  $\mu$ M, Balken 1, A und B) und des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 (10  $\mu$ M, Balken 2, A und B) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, gefärbt und das Neuritenwachstum am Mikroskop ausgewertet. Die durchschnittliche Neuritenlänge auf den Substraten poly-L-Lysin und NCAM in Abwesenheit der Inhibitoren (Kontrollansatz) wurde als 100 % festgelegt. Die durchschnittliche Neuritenlänge in Anwesenheit der Inhibitoren wurde auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente. \*\*  $p < 0,01$

abhängigen Neuritenwachstums beteiligt ist. Die Prozessierung der extrazellulären Domäne von NCAM scheint eine essentielle Rolle für das NCAM-induzierte Wachstum von Neuriten zu spielen.

#### 4.1.3.3 Bedeutung des Moleküls Calmodulin für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum

Die Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM scheint eine wichtige Rolle für den Prozess des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums zu spielen (s. 4.1.3.2). In *in vivo Inhibitorassays* konnte gezeigt werden, dass die Spaltung von NCAM durch Calmodulin negativ beeinflusst wird (s. 4.1.2.1). Zur Untersuchung des Effektes von Calmodulin auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum wurden Kleinhirnexplantate der Maus (s. 3.3.5.2) in An- bzw. Abwesenheit des Calmodulininhibitors CGS 9343 B kultiviert.



**Abb. 4.15: Effekt des Calmodulininhibitors CGS 9343 B auf poly-L-Lysin-, NCAM-, Laminin- und L1-abhängiges Neuritenwachstum.** Kleinhirnexplantate der Maus (s. 3.3.5.2) wurden auf poly-L-Lysin (Balken 1) oder auf, mit einer Kombination aus poly-L-Lysin und murinem NCAM (Balken 2) bzw. Laminin (Balken 3) oder murinem L1 (Balken 4) beschichteten Deckgläschen in Ab- bzw. Anwesenheit des Calmodulininhibitors CGS 9343 B (10  $\mu$ M) kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, gefärbt und das Neuritenwachstum am Mikroskop ausgewertet. Die durchschnittliche Neuritenlänge auf den Substraten poly-L-Lysin, NCAM, Laminin und L1 in Abwesenheit der Inhibitoren (Kontrollansatz) wurde als 100% festgelegt. Die durchschnittliche Neuritenlänge in Anwesenheit der Inhibitoren wurde auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente. \*\*  $p < 0,01$

Lediglich das NCAM-abhängige Neuritenwachstum wurde durch den Calmodulininhibitor CGS 9343 B negativ beeinflusst (**Abb. 4.15**, Balken 2). In Anwesenheit des Calmodulininhibitors konnte eine Reduktion der durchschnittlichen Neuritenlänge auf weniger als 60 % des Kontrollansatzes nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigte der Calmodulininhibitor keinen Einfluss auf PLL-, Laminin- oder L1-induzierte Neuritenwachstum (**Abb. 4.15**, Balken 1, 3 und 4).

## **4.2 Untersuchung zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls L1 für das Zentrale Nervensystem**

Das Zelladhäsionsmolekül L1 spielt eine zentrale Rolle in dem sich entwickelnden sowie im adulten Nervensystem (s. 1.4.2). Die Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls L1 für die Integrität des Organismus wird durch das Krankheitsbild des CRASH-Syndroms, das durch Mutationen in dem für L1 kodierenden Gen hervorgerufen wird, unterstützt (Fransen *et al.*, 1995). Die Funktionen des Zelladhäsionsmoleküls L1 können durch die proteolytische Spaltung seiner extrazellulären Domäne in die Fragmente L1-180, L1-140, L1-80, L1-50 und L1-30 reguliert und moduliert werden (s. 1.4.3). Die Entstehung und die Funktion der löslichen L1-Fragmente *in vivo* konnte bisher nicht im Detail aufgeklärt werden.

In Anbetracht der biologischen Relevanz des Moleküls, unterstützt durch das schwere Krankheitsbild des CRASH-Syndroms, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Entstehung und Bedeutung löslicher L1-Fragmente für das Zentrale Nervensystem untersucht. Mit Hilfe von Transfektionsstudien (s. 4.2.1.1) sollte die für die Prozessierung des Moleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne und für die Entstehung des löslichen Fragmentes L1-140 verantwortliche Protease ermittelt werden. Weiterhin wurde das Vorkommen des Fragmentes L1-140 in den Gehirnregionen Hippocampus und Kleinhirn analysiert (s. 4.2.1.2). Zur Untersuchung der Entstehung des Fragmentes L1-180, das an der Freisetzung des löslichen Fragmentes L1-140 beteiligt zu sein scheint (s. 4.2.2.2), wurden *in vitro* Proteolyseassays (s. 4.1.1.1) durchgeführt. Darüber hinaus wurde im Anschluss an Experimente zur Untersuchung der regulierten Spaltung des Moleküls L1 in Abhängigkeit des Kalziumsensors Calmodulin (s.4.2.2.3) der Einfluss der proteolytischen Prozessierung des Moleküls auf das L1-abhängige Neuritenwachstum (s. 4.2.2.4) untersucht. Neben den bereits bekannten löslichen Fragmenten L1-140, L1-180 und L1-50 konnten im Laufe dieser Untersuchung zusätzliche L1-Fragmente nachgewiesen werden, deren Entstehung ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde.

## 4.2.1 Die Entstehung des Fragmentes L1-140

### 4.2.1.1 Prohormonkonvertasen als verantwortliche Enzyme?

Die in Gehirnhomogenaten von Mäusen nachgewiesenen löslichen L1-Fragmente L1-140 und L1-180 entstehen durch die proteolytische Spaltung membranständiger L1-Moleküle. Das Fragment L1-140 wird durch die Spaltung des Moleküls in der dritten Fibronektindomäne von der Membran gelöst. Die aminoternale Sequenzierung des membranständigen, zu L1-140 komplementären, L1-80 führte zu dem Ergebnis, dass die Spaltung des Moleküls in der dritten Fibronektindomäne carboxyterminal der Aminosäure Arginin 845 erfolgt (Sadoul *et al.*, 1988). Sequenzvergleiche der Schnittstelle ergaben, dass aminoterminal dieser Spaltstelle eine putative Erkennungssequenz und Schnittstelle der den Serinproteasen zugehörigen Prohormonkonvertasen (PC) (**Abb. 4.16**, s. 1.2.2) lokalisiert ist.

	815	825	835	845	855	865	875
Mensch	AVLVKWRPVDLAQVKGHLRGYNVTYWREGSQR	<b>KHSKR</b>	HIHKD	HVVPANTTSVILSGLRPYSSYHLEVQA			
Ratte	AVLVRWRPVDLAQVKGHLRGYNVTYWWKGSQR	<b>KHSKR</b>	HVHKSHM	VVPANTTSAILSGLRPYSSYHLEVQA			
Maus	AVLVRWRPVDLAQVKGHLRGYNVTYWWKGSQR	<b>KHSKR</b>	HIHKSHI	VVPANTTSAILSGLRPYSSYHLEVQA			

**Abb. 4.16: Putatives Prohormonkonvertase-Erkennungsmotiv in der dritten Fibronektindomäne des L1-Moleküls.** Die Sequenzen zeigen Ausschnitte aus der dritten Fibronektindomäne des L1-Moleküls des Menschen, der Ratte und der Maus (Swiss Protein Database accession numbers P32004, Q05695, P11627). Das in allen drei Sequenzen konservierte PC-Erkennungsmotiv ist fett unterlegt. Die durch Sequenzierung identifizierte aminoternale Sequenz des murinen L1-80 ist rot hervorgehoben (Silletti *et al.*, 2000). Die unterstrichenen Abschnitte in der humanen L1-Sequenz stellen RGD-unabhängige Integrin-Bindungsmotive dar (Moos *et al.*, 1988).

Um zu untersuchen, ob eine Prohormonkonvertase an der Spaltung von L1 in der dritten Fibronektindomäne beteiligt ist, wurden Transfektionsstudien mit Zellen der Zelllinie Neuro 2a unter Verwendung von Expressionskonstrukten durchgeführt, die für verschiedene Mitglieder der Proteasefamilie PC1, PC2, PC4, PC5A, PACE4 und Furin kodieren (s. 3.3.3).

Für diesen Versuch wurden Zellen der Neuroblastoma Zelllinie Neuro 2a als geeignetes Zellsystem ausgewählt, da ein lösliches Fragment L1-140 in den Zellkulturüberständen dieser Zelllinie nicht nachweisbar ist. Das von den Zellen

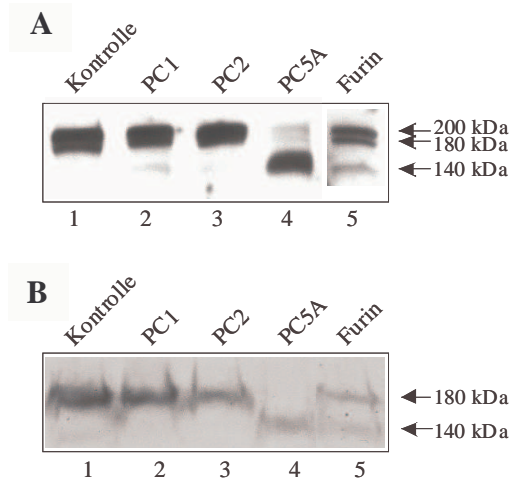
endogen exprimierte Protein L1 wird nur in der Nähe des Membranankers gespalten, so dass ein lösliches L1-Fragment mit einem Molekulargewicht von 180 kDa entsteht. Die Proteasen der Zelllinie Neuro 2a sind nicht in der Lage, das Protein L1 in der dritten Fibronektindomäne zu spalten.

Der Versuch zeigte, dass in den Zelllysaten der transfizierten Zellen nach der Transfektion mit dem Kontrollvektor das membranständige L1-Molekül mit einem Molekulargewicht von 200 kDa detektierbar ist (Abb. 4.17 A, Spur 1). Das lösliche Fragment L1-180 konnte unter

Kontrollbedingungen sowohl in den Zelllysaten, als auch in den Zellkulturüberständen

nachgewiesen werden (Abb. 4.17 A und B, Spur 1), wohingegen das lösliche Fragment L1-140 weder mit der Zellmembran assoziierte, noch in den Zellkulturüberständen detektierbar war. Die transiente Transfektion der Zellen mit den Expressionskonstrukten PC1 (Abb. 4.17 A und B, Spur 2), PC2 (Abb. 4.17 A und B, Spur 3),

PACE4 (Daten nicht gezeigt) und PC7 (Daten nicht gezeigt) führten zu dem gleichen Ergebnis. Im Gegensatz dazu konnte nach der Transfektion der Zellen mit dem Expressionskonstrukt PC5A in den Zelllysaten der transfizierten Zellen ein prominentes Fragment mit einem Molekulargewicht von 140 kDa nachgewiesen werden (Abb. 4.17 A, Spur 4). Der Anteil des membranständigen Proteins L1-200, sowie des löslichen Fragmentes L1-180 war in diesen Zellen



**Abb. 4.17: Nachweis von L1-Fragmenten in den Zelllysaten (A) und den Zellkulturüberständen (B) von transient mit den Expressionskonstrukten PC1, PC2, PC5A und Furin transfizierten Neuro 2a-Zellen.** Zellen der Zelllinie Neuro 2a wurden transient mit einem Kontrollvektor (Spur 1, A und B) und den Expressionsprodukten PC1 (Spur 2, A und B), PC2 (Spur 3, A und B), PC5A (Spur 4, A und B) und Furin (Spur 5, A und B) transfiziert (s. 3.3.3). Nach einer Inkubation der Zellen in serumfreiem Kulturmedium wurden die transfizierten Zellen getrennt von den Zellkulturüberständen aufgearbeitet (s. 3.3.1). Zusammen mit den Ansätzen der Zellkulturüberstände wurden die Zelllysate mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers detektiert. Die Position der verschiedenen L1-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

stark reduziert. In den Zellkulturüberständen der mit PC5A transfizierten Zellen konnte ausschließlich das Fragment L1-140 detektiert werden (**Abb. 4.17 B**, Spur 4). Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Analyse der Zellkulturüberstände und der Zelllysate der mit Furin transfizierten Zellen, jedoch stellte das lösliche Fragment L1-140 im Vergleich zu dem löslichen Fragment L1-180 und dem membranständigen L1-200 eher eine minore Komponente (**Abb. 4.17 A und B**, Spur 5) dar.

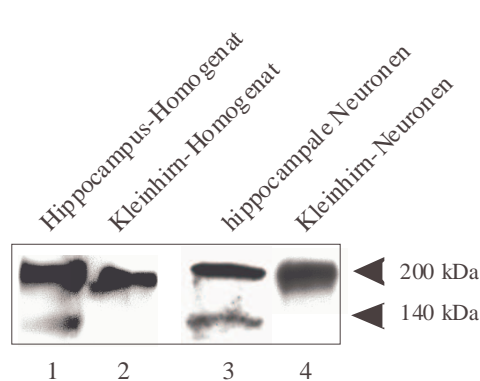
Zusammenfassend folgte daraus, dass die Prohormonkonvertase PC5A und mit einer geringeren Effizienz auch Furin in der Lage ist, das membranständige L1 Molekül zu schneiden und das lösliche Fragment L1-140 freizusetzen. Die Prohormonkonvertasen PC1, PC2, PC7 und PACE4 sind an der Spaltung des Zelladhäsionsmoleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne nicht beteiligt.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Expressionsspiegel oder die fehlende Aktivität der transfizierten Proteasen konnte ausgeschlossen werden. In bereits veröffentlichten Studien wurde gezeigt, dass die transfizierten Prohormonkonvertasen als aktive Proteasen exprimiert werden und in der Effektivität ihrer enzymatischen Aktivität übereinstimmen (Benjannet *et al.*, 2001; Khatib *et al.*, 2001).

Das Ergebnis dieser Transfektionsexperimente wurde durch Versuche bestätigt, in denen Zellen der Zelllinie HEK 293 mit Expressionskonstrukten kodierend für das Protein L1 der Maus und einer in der putativen Spalt- und Erkennungssequenz mutierten Form des Moleküls L1 transfiziert wurden. Die Versuche zeigten, dass die Prohormonkonvertase PC5A nicht in der Lage ist, das mutierte L1-Expressionskonstrukt zu spalten (Schnegelsberg, 2001). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass PC5A das Zelladhäsionsmolekül L1 über die Prohormonkonvertase-Erkennungssequenz als potentiell Substrat identifiziert und carboxyterminal dieser Sequenz die Peptidkette nach der Aminosäure Arg 845 spaltet.

#### 4.2.1.2 Vorkommen des Fragmentes L1-140 in verschiedenen Gehirnregionen

Die an der Entstehung des Fragmentes L1-140 beteiligte Prohormonkonvertase PC5A wird nur in wenigen Regionen des Kleinhirns exprimiert, wohingegen im Hippocampus eine starke Expression der Protease nachgewiesen werden konnte (Villeneuve *et al.*, 1999; Villeneuve *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob das Protein L1 als Substrat der Prohormonkonvertase PC5A auch *in vivo* in Frage kommt, wurde das Vorkommen des Fragmentes L1-140 in den Homogenaten von adulten Maus Hippocampi und Kleinhirnen (s. 3.1.6.1) sowie in Zelllysaten von kultivierten Kleinhirnneuronen (s. 3.3.5.4 und 3.3.1) und hippocampalen



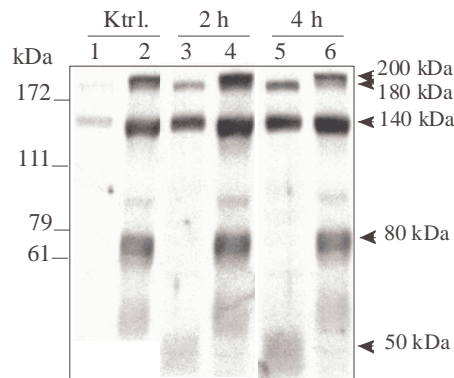
**Abb. 4.18: Nachweis des löslichen Fragmentes L1-140 in Homogenaten von adulten Hippocampi und Kleinhirnen der Maus sowie von kultivierten Kleinhirnneuronen und hippocampalen Neuronen.** Homogenate von adulten Maus Hippocampi und Kleinhirnen (s. 3.1.6.1) sowie von kultivierten Kleinhirnneuronen (s. 3.3.5.4 und 3.3.1) und hippocampalen Neuronen (s. 3.3.5.5 und 3.3.1) wurden mittels Immunoblot-Analyse (s. 3.1.2) unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 555 untersucht. Die Position der unterschiedlichen L1-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

Neuronen (s. 3.3.5.5 und 3.3.1) analysiert. Wie die **Abb. 4.18** zeigt, ist das membranständige Molekül L1-200 sowohl in den Homogenaten des Kleinhirns (**Abb. 4.18**, Spur 2) und des Hippocampus (**Abb. 4.18**, Spur 1) als auch in den Zelllysaten von kultivierten Kleinhirnneuronen (**Abb. 4.18**, Spur 4) und hippocampalen Neuronen (**Abb. 4.18**, Spur 3) detektierbar. Das Fragment L1-140 konnte im Gegensatz dazu nur in dem Homogenat der Hippocampi, sowie in den Ansätzen der aufgearbeiteten hippocampalen Neuronen nachgewiesen werden (**Abb. 4.18**, Spur 1 und 3).

Basierend auf der Tatsache, dass die Entstehung des Fragmentes L1-140 in Bereichen des Nervensystems stattfindet, in denen auch eine Expression der Protease PC5A nachgewiesen werden konnte, ließ sich schlussfolgern, dass die Prohormonkonvertase PC5A auch *in vivo* an der Spaltung des Proteins L1 in der dritten Fibronektindomäne beteiligt ist.

### 4.2.1.3 Das Fragment L1-140 verbleibt membranassoziiert

Um die Entstehung des Fragmentes L1-140 detaillierter zu untersuchen, wurden *in vitro* Proteolyseassays (s. 3.1.10) an isolierten Membranen aus Mausgehirnhomogenat durchgeführt.



**Abb. 4.19: Nachweis löslicher und membrangebundener Fragmente des Moleküls L1 in den Überständen und Sedimenten des *in vitro* Proteolyseassays.** Isolierte Membranen aus Mausgehirnhomogenat wurden für 2 h (Spur 3 und 4) oder 4 h (Spur 5 und 6) bei 37 °C, sowie unter Kontrollbedingungen für 4 h (Spur 1 und 2) bei 4 °C inkubiert. Während der Inkubation der isolierten Membranen bei 37 °C kommt es zu der Spaltung von Transmembranproteinen durch die verantwortlichen Proteasen und zu einer Freisetzung der generierten Fragmente. Im Anschluss wurden die Ansätze durch Zentrifugation in die Überstände (Spur 1, 3 und 5) und die Sedimente (Spur 2, 4 und 6) getrennt und mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers untersucht. Die Position der unterschiedlichen L1-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

In den Sedimenten der Ansätze des *Proteolyseassays* wurden neben den membranständigen L1-Formen L1-200 und L1-80 auch das lösliche Fragment L1-140 detektiert (**Abb. 4.19**, Spur 2, 4 und 6). Die Ursache und Funktion für das Verbleiben des löslichen Fragmentes L1-140 an der Membran, unter anderem auch nach der Behandlung mit hohen Salzkonzentrationen oder extremen pH-Werten (Sadoul *et al.*, 1988), konnte bisher nicht aufgeklärt werden.- Nach der Inkubation der Ansätze für 4 h bei 4 °C waren nur geringe Mengen der löslichen Fragmente L1-180, L1-140 und L1-50 in den Überständen der Ansätze nachweisbar (**Abb. 4.19**, Spur 1, 3 und 5). Das lösliche Fragment L1-180 wird durch die Spaltung des extrazellulären Anteils von L1 in Membrannähe generiert, wohingegen das lösliche Fragment L1-50 durch die Spaltung des Membranstumpfes L1-80 in der Nähe des Membranankers entsteht, der aus der Prozessierung des Moleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne resultiert.- Die

Inkubation der Ansätze für 2 h bzw. 4 h bei 37 °C führt im Vergleich zu dem Kontrollansatz zu einer verstärkten Spaltung des Proteins L1-200 und zu einer damit verbundenen erhöhten Freisetzung der löslichen Fragmente L1-180, L1-140 und L1-50 (**Abb. 4.19**, Spur 3 und 5). Das Verhältnis der löslichen Hauptfragmente L1-180 und L1-140 in den Überständen der Ansätze des *Proteolyseassays* änderte sich in Abhängigkeit der Inkubationsbedingungen nicht. Dies führte zu der Vermutung, dass die Freisetzung der beiden löslichen Komponenten von der Membran in den Überstand miteinander verknüpft ist. Weitere Hinweise bezüglich dieser Hypothese lieferten *in vitro Proteolyseassays* in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren (s. 4.2.2).

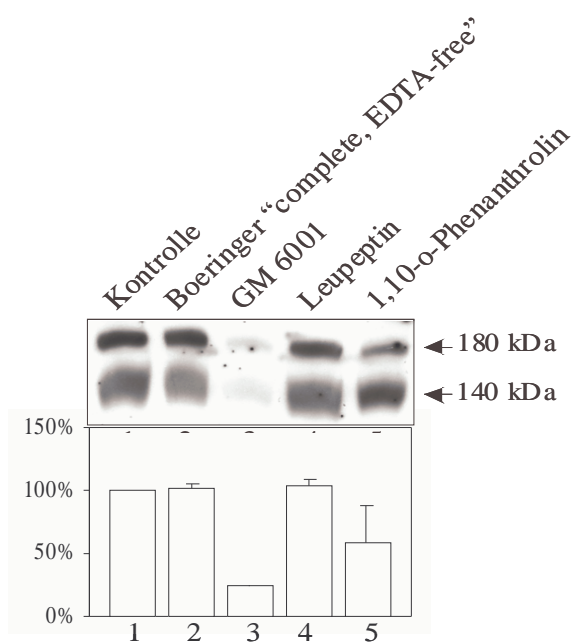
## 4.2.2 Die Entstehung des Fragmentes L1-180

### 4.2.2.1 Metalloproteasen als verantwortliche Enzyme?

Um näher zu untersuchen, ob die Freisetzung der löslichen Fragmente L1-180 und L1-140 miteinander verknüpft ist, wurden *in vitro Proteolyseassays* (s. 3.1.10) in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren durchgeführt. Es wird vermutet, dass für die Spaltung der extrazellulären Domäne von L1 eine Metalloprotease verantwortlich ist (Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2000). Fördert die Spaltung des L1-200 in der Nähe des Membranankers auch die Freisetzung des löslichen Fragmentes L1-140, führt eine Inhibition der verantwortlichen Metalloprotease, durch Inhibitoren wie GM 6001 oder auch 1,10-o-Phenanthrolin, zu einer Hemmung der Freisetzung nicht nur des L1-180, sondern auch des L1-140.

Unter Kontrollbedingungen (**Abb. 4.20**, Spur 1), sowie in Anwesenheit des Breitspektrum-Proteaseinhibitors „complete, EDTA-free“ (**Abb. 4.20**, Spur 2) und des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (**Abb. 4.20**, Spur 4) konnten zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 180 kDa und 140 kDa in den Überständen der Ansätze nachgewiesen werden: L1-180 und L1-140. Die beiden Metalloproteaseinhibitoren GM 6001 und 1,10-o-Phenanthrolin zeigten einen

negativen Einfluss auf die Spaltung und Freisetzung der beiden löslichen L1-Fragmente. Nach der Inkubation der isolierten Membranen mit dem Inhibitor GM 6001 (**Abb. 4.20**, Spur 3) waren weder das Fragment L1-180, noch das Fragment L1-140 in dem Überstand detektierbar. Der Metalloproteaseinhibitor 1,10-o-Phenanthrolin (**Abb. 4.20**, Spur 5) zeigte ebenfalls eine Inhibition der Freisetzung der beiden L1-Fragmente, jedoch in einem geringeren Maße als der Inhibitor GM 6001.



**Abb. 4.20: Nachweis der löslichen L1-Fragmente in den Überständen des *in vitro* Proteolyseassays nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.** Isolierte Membranen wurden für 2 h bei 37 °C in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) der Proteaseinhibitoren Boeinger „complete, EDTA-free“ (5 mM, Spur 2), GM 6001 (10 µM, Spur 3), Leupeptin (10 µM, Spur 4) und 1,10-o-Phenanthrolin (10 µM, Spur 5) inkubiert (s. 3.1.10). Im Anschluss wurden die Proben durch Zentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Die in den Überständen enthaltenen Proteine wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers untersucht. Das Balkendiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente. Die Position der unterschiedlichen L1-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

Dieses Ergebnis untermauerte die Vermutung, dass an der Spaltung des membranständigen Moleküls L1-200 in der Nähe des Membranankers und an der Freisetzung des Spaltproduktes L1-180 eine Metalloprotease beteiligt ist. Weiterhin scheint die Spaltung des L1-200 in Membrannähe durch eine Metalloprotease die Freisetzung des löslichen, aber weiterhin membranassoziierten Fragmentes L1-140 zu fördern. Es lag die Vermutung nah, dass das Fragment L1-140 durch die Ausbildung eines Heterodimers mit einem membranständigen L1-200 Molekül membranassoziiert bleibt und erst durch die Spaltung seines „Bindungspartners“ zusammen mit dem entstehenden Fragment L1-180 von der Membran gelöst wird.

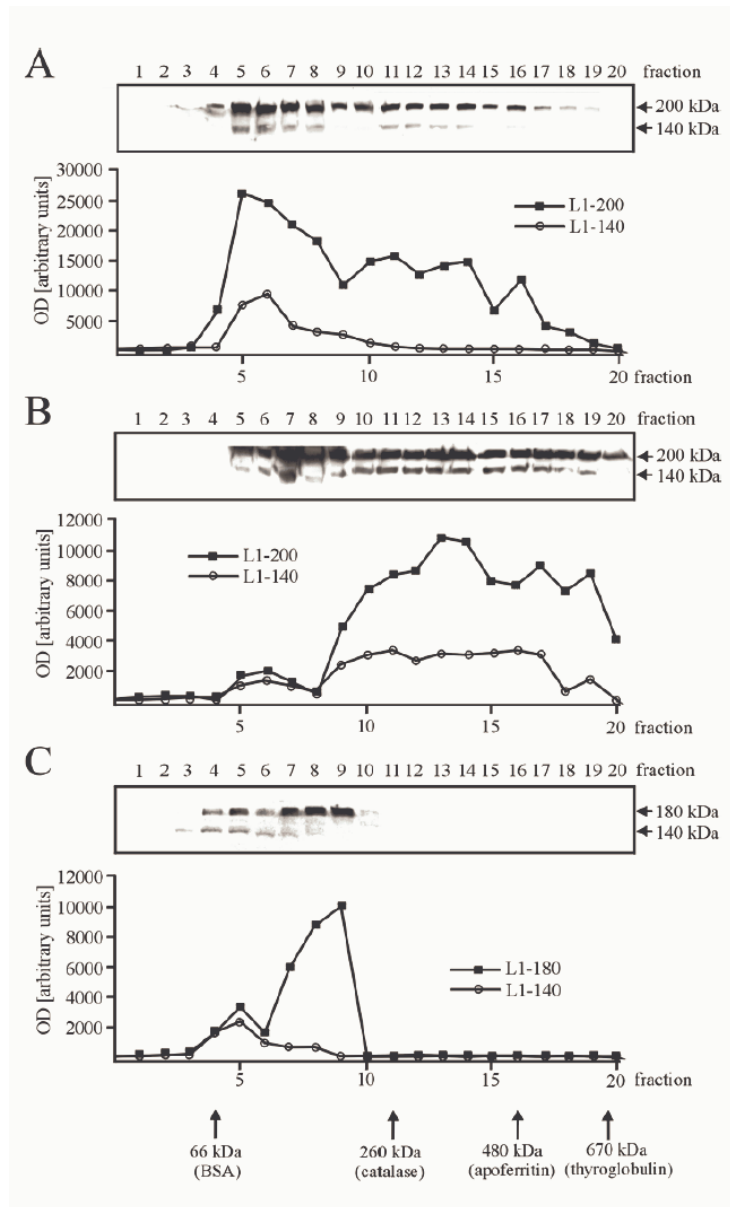
#### 4.2.2.2 Die „Dimerisierungshypothese“

Bisher konnten die Ursache und die Funktion für das Verbleiben des löslichen Fragmentes L1-140 an der Membran nicht aufgeklärt werden. Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente führten zu der Vermutung, dass das Fragment L1-140 möglicherweise mit einem membranständigen L1-200 Molekül dimerisiert und erst nach der Spaltung seines „Bindungspartners“ in der Nähe des Membranankers zusammen mit dem entstehenden Fragment L1-180 von der Membran gelöst wird. Die Dimerisierung bzw. Multimerisierung von L1-Molekülen im allgemeinen konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Kamiguchi und Lemmon, 1997; Haspel *et al.*, 2001). So zählt die homophile Interaktion von L1-Molekülen auf der Zelloberfläche zu den initiierenden Schritten des L1-vermittelten Neuritenwachstums (Kamiguchi und Lemmon, 1997).

Zur Beantwortung der Frage, ob das lösliche Fragment L1-140 mit dem membranständigen Molekül L1-200 dimerisiert, wurden eine mit Triton X-100 solubilisierte Gehirnhomogenatfraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation analysiert (s. 3.1.9). Das membranständige Protein L1-200 sowie das lösliche Fragment L1-140 konnten in zahlreichen Fraktionen des Saccharosegradienten detektiert werden (**Abb. 4.21 A**). Der Nachweis des Fragmentes L1-180, der zweiten neben L1-140 löslichen Hauptkomponente des Moleküls L1, war durch die Prominenz der 200 kDa-Bande des membranständigen L1-Moleküls erschwert. Basierend auf den eingesetzten Molekulargewichtsmarkern, die parallel zu dem Gradient des Gehirnhomogenates analysiert wurden, lagen die in den Fraktionen 4 - 8 detektierten L1-Moleküle als Monomere mit einem Molekulargewicht von 140 kDa bzw. 200 kDa vor. Die in den Fraktionen 12 - 14 detektierten L1-Moleküle wiesen basierend auf den verwendeten Markermolekülen ein Molekulargewicht von etwa 350 kDa auf, das mit dem Molekulargewicht eines Heterodimers bestehend aus den Molekülen L1-200 und L1-140 übereinstimmte. Auch in den Fraktionen 16 und 17 waren die Moleküle L1-200 und L1-140 nachweisbar. Die Fraktionen 16 und 17 enthielten Proteine oder auch Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von etwa 500 kDa. Die sich in diesen Fraktionen befindlichen L1-Fragmente scheinen in einem hochmolekularen Komplex vorzuliegen. Die Analyse des Gehirnhomogenates

mittels Dichtegradientenzentrifugation zeigte, dass die Moleküle L1-200 und L1-140 vor allem als Monomere, aber auch als Heterodimere und zum Teil auch als hochmolekulare Komplexe, möglicherweise in Assoziation mit anderen

**Abb. 4.21: Nachweis von L1-Fragmenten in den Fraktionen eines Dichtegradienten einer mit Triton-X 100 solubilisierten Gehirnhomogenatfraktion (A), einer mit Triton X-100 solubilisierten Membranfraktion (B) und einer mit löslichen Proteinen angereicherten Fraktion (C).** Die Ausgangsfraktionen wurden auf einen kontinuierlichen Sucrosegradienten geschichtet. Nach einer Zentrifugationszeit von 16 h wurde der Gradient von der Öffnung des Zentrifugenröhrchens bis zum Boden in Fraktionen eingeteilt (Fraktion 1 - 20) und die in den Fraktionen enthaltenen Proteine mit Hilfe der Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 555 untersucht. Eine densitometrische Auswertung der Banden der L1-Fragmente L1-200, L1-180 und L1-140 gibt das jeweilige Diagramm unterhalb des Immunoblots wieder. Die Position der verschiedenen L1-Fragmente ist durch Pfeile markiert. Die Lage der Molekulargewichtsmarker Rinderserumalbumin (BSA), Katalase, Apoferritin und Thyroglobulin sind unterhalb der Gradienten durch Pfeile dargestellt.



Proteinen, vorliegen können. Die densitometrische Auswertung der Banden L1-200 und L1-140 dargestellt in dem Diagramm in **Abb. 4.21 A** verdeutlichte dieses Ergebnis.

Die Analyse des Gehirnhomogenates durch Dichtegradientenzentrifugation ließ die Vermutung zu, dass das membranständige Molekül L1-200 und das lösliche

Fragment L1-140 als Heterodimer vorliegen können. Dies beantwortete jedoch nicht die Frage, ob das lösliche Fragment L1-140 mit dem membranständigen Fragment L1-200 dimerisiert, somit membranassoziiert bleibt und erst durch die Spaltung des L1-200 in der Nähe des Membranankers zusammen mit dem Fragment L1-180 von der Membran gelöst wird. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurden darüber hinaus eine mit Triton X-100 solubilisierete Membranfraktion (**Abb. 4.21 B**), sowie eine mit löslichen Proteinen angereicherte Fraktion (**Abb. 4.21 C**) mittels Dichtegradientenzentrifugation untersucht (s. 3.1.9).

Die densitometrische Auswertung der detektierbaren L1-Moleküle L1-200 und L1-140 der mittels Dichtegradientenzentrifugation analysierten Membranfraktion (**Abb. 4.21 B**) zeigte ein Maximum der Fragmente in den Fraktionen 12 - 14, die Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 350 kDa enthielten und somit dem zu erwartenden Heterodimer aus L1-200 und L1-140 entsprachen. Zusätzlich wurden die Moleküle in den Fraktionen 16 - 20 als hochmolekularer Komplex mit einem geschätzten Molekulargewicht von über 500 kDa nachgewiesen. Nur ein geringer Anteil der Moleküle L1-200 und L1-140 lag in monomerer Form vor, d. h. in den mit einem Molekulargewicht von etwa 150 kDa - 200 kDa korrespondierenden Fraktionen.

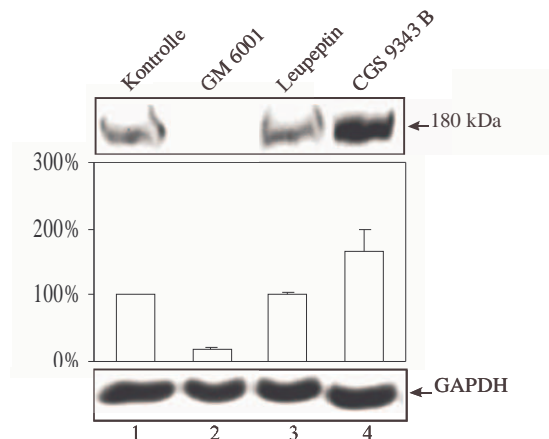
Die Analyse der mit löslichen Proteinen angereicherten Fraktion mittels Dichtegradientenzentrifugation zeigte ein konträres Ergebnis. Die löslichen Fragmente L1-180 und L1-140 waren nur in den Fraktionen 4 - 9 detektierbar, wie auch die densitometrische Auswertung der einzelnen L1-Banden eindeutig zeigte (**Abb. 4.21 C**). Daraus folgte, dass L1-Fragmente in der mit löslichen Proteinen angereicherten Fraktion als Monomere vorliegen.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich folgende Hypothese ableiten: Das lösliche Fragment L1-140 bildet mit einem membranständigen L1-Molekül ein Heterodimer. Das Fragment L1-140 ist daher nicht nur als lösliches, sondern auch als membranassoziiertes Fragment nachweisbar. Die Spaltung des L1-200 in der Nähe des Membranankers durch eine Metalloprotease führt zu der Freisetzung eines löslichen Fragmentes L1-180 und des bis dahin noch membranassoziierten Fragmentes L1-140. Möglicherweise bedingt durch eine Konformationsänderung

der Proteine nach der Spaltung des L1-200 in der Nähe des Membranankers wird die Bindung des L1-140 an den nun löslichen Bindungspartner, das Fragment L1-180 aufgehoben. Die beiden Bruchstücke liegen nach ihrer Freisetzung in die Umgebung der Zelle als Monomere vor.

#### 4.2.2.3 Die Regulation der Prozessierung von L1 durch Calmodulin

Die Ergebnisse des *in vitro* Proteolyseassays (s. 4.2.2.1) bestätigten die Vermutung, dass eine Metalloprotease an der Spaltung der extrazellulären Domäne des Moleküls und der Freisetzung des löslichen Fragment L1-180 beteiligt ist.



**Abb. 4.22: Nachweis löslicher L1-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.** Zellen der Zelllinie Neuro 2a wurden in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 (10  $\mu$ M, Spur 2), des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin (10  $\mu$ M, Spur 2) und des Calmodulininhibitors CGS 9343 B (10  $\mu$ M, Spur 3) inkubiert (s. 3.3.2). Im Anschluss wurden die in den Zellkulturüberständen mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 555 untersucht. Das Blockdiagramm zeigt eine densitometrische Auswertung dreier unabhängiger Experimente. Um auszuschließen, dass sich mögliche Unterschiede der in den Zellkulturüberständen detektierten Proteilmengen auf den Einfluss der Inhibitoren auf die Zellteilung und das Zellüberleben zurückzuführen sind, wurden die behandelten Zellen ebenfalls aufgearbeitet, gleiche Volumina mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-GAPDH-Antikörpers

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden in Zellkulturexperimenten *in vivo* *Inhibitorassays* (s. 3.3.2) in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren durchgeführt. Zellen der Neuroblastomazelllinie Neuro 2a dienten als geeignetes System, um die Spaltung der extrazellulären Domäne in

der Nähe des Membranankers näher zu untersuchen, da sie in der Lage sind, das lösliche Fragment L1-180, aber nicht das Fragment L1-140 zu generieren.

In Abwesenheit eines Proteaseinhibitors konnte ein lösliches Fragment mit einem Molekulargewicht von 180 kDa in den Zellkulturüberständen des *in vivo Inhibitorassays* nachgewiesen werden (**Abb. 4.22**, Spur 1). Der Serin- und Cysteinproteaseinhibitor Leupeptin zeigte keinen Einfluss auf die Freisetzung des löslichen Fragmentes L1-180 (**Abb. 4.22**, Spur 3), wohingegen in Anwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 die Spaltung des Moleküls L1 in der Nähe des Membranankers inhibiert war (**Abb. 4.22**, Spur 2). Das Ergebnis bekräftigte die Hypothese, dass eine Metalloprotease an der proteolytischen Spaltung des L1-Moleküls in der Nähe des Membranankers beteiligt ist.

Die Prozessierung zahlreicher Transmembranproteine, wie z. B. des *transforming growth factors- $\alpha$  receptors*, des *amyloid precursor proteins*, der *tyrosine receptor kinase A* oder des *L-selectins*, in der Nähe ihres Membranankers durch eine Metalloprotease wird unter dem Einfluss eines Calmodulininhibitors stimuliert (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000). Auch die Freisetzung des löslichen Fragmentes L1-180 wurde durch Calmodulin beeinflusst (**Abb. 4.22**, Spur 4). In Anwesenheit des Calmodulininhibitors CGS 9343 B wurde das Fragment L1-180 verstärkt in den Zellkulturüberstand abgegeben.

#### **4.2.2.4 Die Bedeutung löslicher L1-Fragmente für das L1-abhängige Neuritenwachstum**

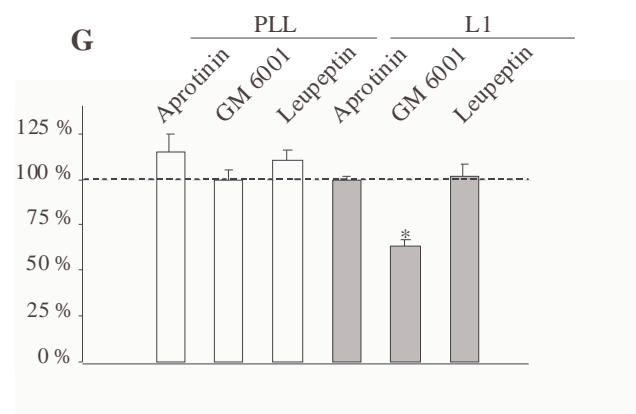
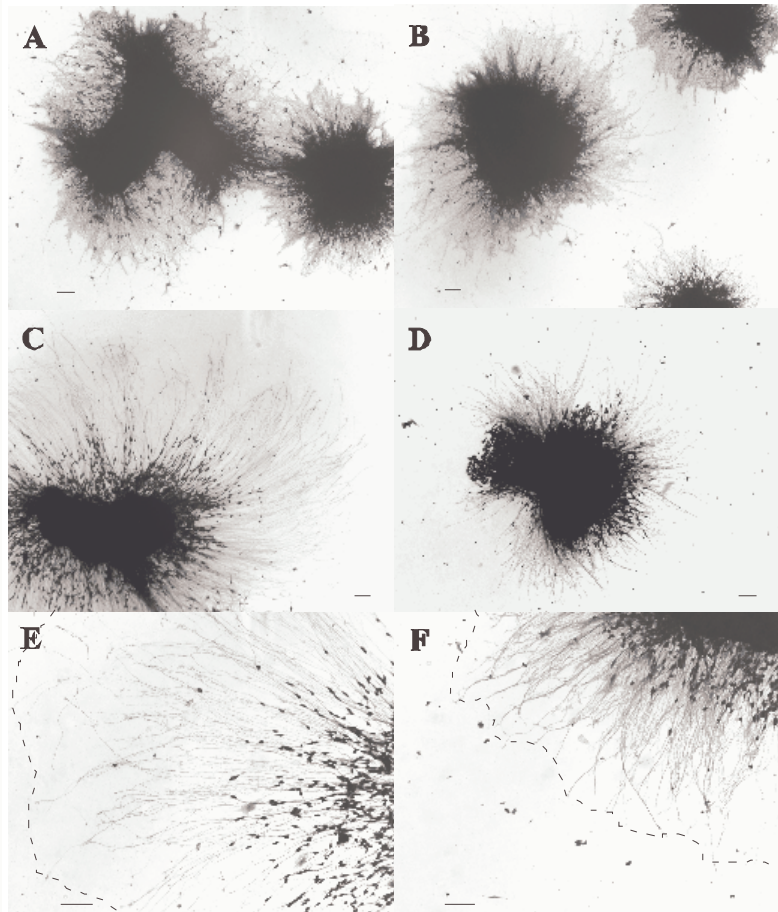
Kleinhirnneurone von L1-defizienten Mäusen zeigen im Vergleich zu Neuronen von Wildtyptieren auf dem Substrat L1 kein Neuritenwachstum. Daraus folgt, dass L1-abhängiges Neuritenwachstum durch eine homophile Interaktion von L1-Molekülen vermittelt wird (Lemmon *et al.* 1989). Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde der Effekt des Metalloproteaseinhibitors GM 6001, für den in vorhergehenden Experimenten (s. 4.2.2.1) eine inhibitorische Wirkung auf die Proteolyse von L1 nachgewiesen werden konnte, auf das L1-abhängige Neuritenwachstum und somit die Bedeutung der Proteolyse für eine der wichtigsten Funktionen des Moleküls L1 untersucht.

In An- und Abwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 wurden keine signifikanten Unterschiede in der Neuritenlänge von Explantaten auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin detektiert (**Abb. 4.23 A, B und G**). Der Inhibitor GM 6001 beeinflusste im Gegensatz dazu das L1-abhängige Neuritenwachstum

**Abb. 4.23: Effekt der Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin, sowie des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 auf L1-abhängiges Neuritenwachstum.**

Kleinhirnexplantate der Maus (s. 3.3.5.2) wurden auf poly-L-Lysin (A und B) bzw. auf, mit einer Kombination aus poly-L-Lysin und murinem L1 (C - F) beschichteten Deckgläschen in Ab- bzw. Anwesenheit der Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren Aprotinin (10  $\mu$ M, G) und Leupeptin (10  $\mu$ M, G), sowie dem Metalloproteaseinhibitor GM 6001 (10  $\mu$ M, B, D, F und G) kultiviert. Im Anschluß wurden die Zellen fixiert, gefärbt und das Neuritenwachstum am Mikroskop ausgewertet. Die durchschnittliche Neuritenlänge auf den Substraten poly-L-Lysin und L1 in Abwesenheit der Inhibitoren (Kontrollansatz) wurde als 100% festgelegt. Die durchschnittliche Neuritenlänge in Anwesenheit der Inhibitoren wurde auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.

\*\*  $p < 0,01$

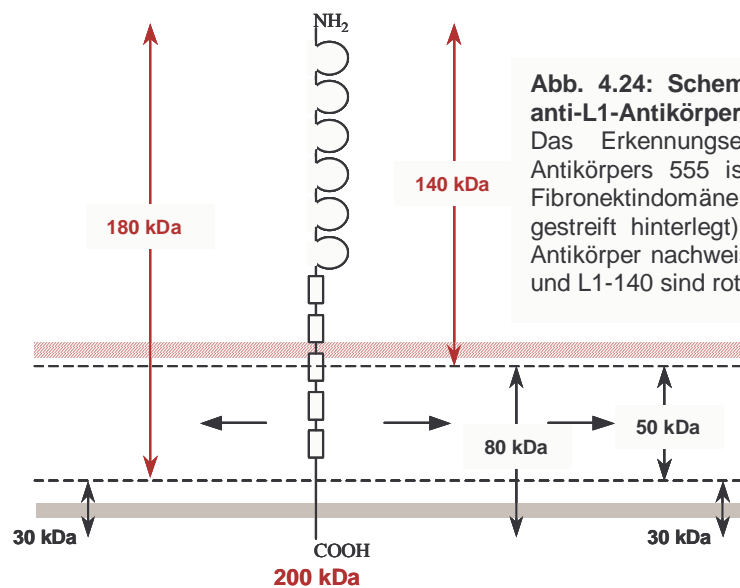


dahingehend, dass die durchschnittliche Neuritenlänge der Explantate auf weniger als 60 % des Kontrollansatzes in Abwesenheit des Inhibitors reduziert war (**Abb. 4.23 C, D und G**). Die Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren Aprotinin

und Leupeptin hatten keinen Einfluss auf das L1-abhängige oder das Neuritenwachstum auf einem Kontrollsubstrat (**Abb. 4.23 G**). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die Spaltung von L1 durch eine Metalloprotease für den Prozess des L1-abhängigen Neuritenwachstums von großer Bedeutung ist.

#### 4.2.3 Weitere Spaltprodukte des Zelladhäsionsmoleküls L1

Der unter anderem in dieser Arbeit verwendete anti-L1-Antikörper 555 erkennt ein Epitop zwischen der zweiten und dritten Fibronectindomäne des Moleküls L1 (Appel *et al.*, 1993). Der anti-L1-Antikörper 555 kann somit in der Immunoblot-Analyse für die Detektion des membranständigen L1-200, sowie der löslichen durch regulierte Prozessierung entstandenen Fragmente L1-180 und L1-140 eingesetzt werden (**Abb. 4.24**). Eine Detektion des membranständigen L1-80, des

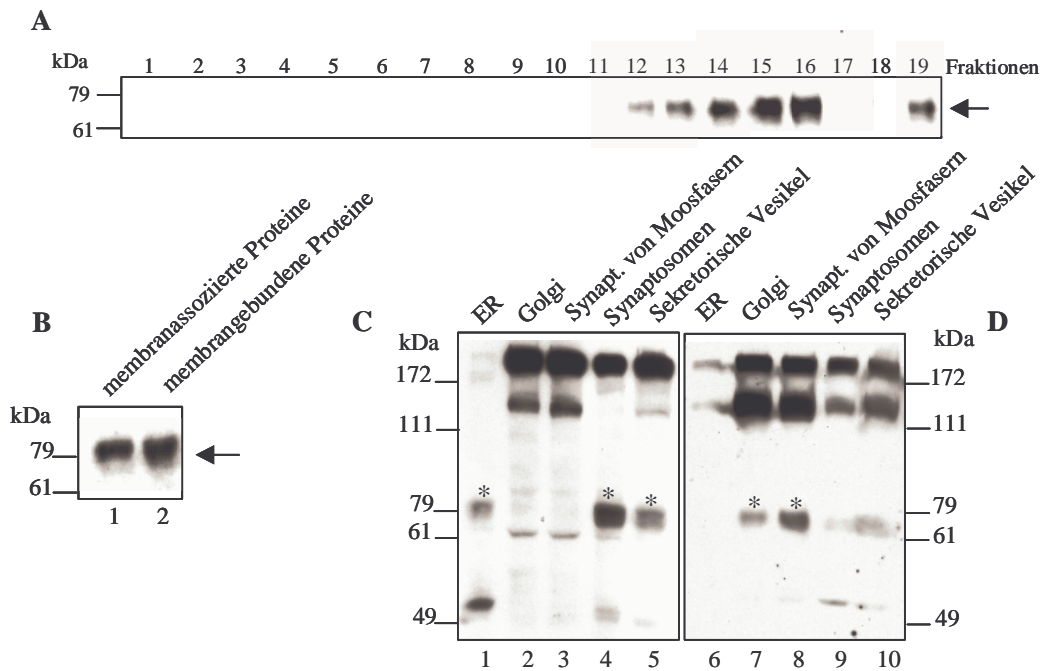


**Abb. 4.24: Schematische Darstellung der von dem anti-L1-Antikörper 555 detektierbaren L1-Fragmente.** Das Erkennungsepitop des monoklonalen anti-L1-Antikörpers 555 ist zwischen der zweiten und dritten Fibronectindomäne des L1-Moleküls lokalisiert (rot gestreift hinterlegt) (Appel *et al.*, 1993). Die von dem Antikörper nachweisbaren L1-Fragmente L1-200, L1-180 und L1-140 sind rot hervorgehoben.

Membranstumpfes L1-30 und des löslichen Fragmentes L1-50 ist mit Hilfe des anti-L1-Antikörpers 555 nicht möglich.

Die Analyse von mit Triton X-100 solubilisierten Fraktionen, die mit Golgi-Apparat (Daten nicht gezeigt) oder Endoplasmatischem Retikulum (ER) angereichert waren (s. 3.1.6.3), mittels Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.1.9) zeigte nach der Immunoblot-Analyse (s. 3.1.3) der Fraktionen unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 555 ein gegenteiliges Ergebnis (**Abb. 4.25 A**). In den Fraktionen

12 - 16 und der Fraktion 19 konnte ein Fragment mit einem Molekulargewicht von 80 kDa nachgewiesen werden. Ein Fragment des Moleküls L1 mit einem



**Abb. 4.25: Detektion eines membranassoziierten L1-Fragmentes mit einem Molekulargewicht von 80 kDa.** **A:** Eine mit ER angereicherte und mit Triton X-100 solubilisierte Fraktion wurde auf einen kontinuierlichen Sucrosgradienten geschichtet. Nach einer Zentrifugationszeit von 16 h wurde der Gradient von der Öffnung des Zentrifugenröhrchens bis zum Boden in Fraktionen eingeteilt (Fraktion 1 - 20), die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 555 untersucht. **B:** Isolierte Membranen einer mit ER angereicherten Fraktion wurden für 30 min mit 0,3 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 11,5 inkubiert und anschließend durch Zentrifugation in die membranassoziierten Proteine enthaltenen Überständen und die Sedimente getrennt (s. 3.1.6.4). Die Ansätze wurden mittels Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 555 untersucht. **C und D:** Die mit ER (Spur 1 und 6) und Golgi-Apparat (Spur 1 und 6), sowie mit Synaptosomen (Spur 1 und 6), Synaptosomen von Moosfasern (Spur 1 und 6) und sekretorischen Vesikeln angereicherten Fraktionen wurden mit Hilfe der Immunoblot-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers (C) und des anti-L1-Antikörpers 555 (D) untersucht. Die Position der verschiedenen L1-Fragmente ist durch Pfeile markiert.

Molekulargewicht von 80 kDa, das von dem anti-L1-Antikörper 555 in der Immunoblot-Analyse erkannt wird, schien nicht mit dem bereits bekannten membranständigen L1-80 identisch zu sein, dessen Aminoterminus von der in der dritten Fn-Domäne lokalisierten Aminosäure Arginin 845 gebildet wird und somit das Erkennungsmotiv des anti-L1-Antikörpers 555 ausschließt (**Abb. 4.24**). Zur weiteren Charakterisierung des in den Dichtegradientenzentrifugationsexperimenten detektierten L1-Fragmentes wurden isolierte Membranen einer mit ER angereicherten Fraktion in membranassoziierte und membrangebundene Proteine getrennt (s. 3.1.6.4) (**Abb. 4.25 B**). Das Ergebnis

zeigte, dass das mit dem anti-L1-Antikörpers 555 nachweisbare Fragment mit einem Molekulargewicht von 80 kDa als lösliches Fragment vorliegt, jedoch mit der Membran assoziiert sein kann.

Dies untermauerte die Vermutung, dass sich das mit dem anti-L1-Antikörper 555 detektierbare Fragment von 80 kDa von dem membranständigen durch Prozessierung in der dritten Fibronektindomäne entstandenen L1-80 unterscheidet. Diese Annahme wurde durch die Analyse der Verteilung der Fragmente L1-80 und des löslichen, mit Hilfe des anti-L1-Antikörpers 555 detektierbaren, Fragmentes in verschiedenen subzellulären Fraktionen unterstützt. Mit Hilfe des anti-L1-Antikörpers konnte ein 80 kDa-Fragment, das dem membranständigen Fragment L1-80 entsprach, ausschließlich in den Fraktionen des ERs, den Synaptosomen und den sekretorischen Vesikeln detektiert werden (**Abb. 4.25 C**, Spur 1, 4 und 5). Im Gegensatz dazu war das mit dem anti-L1-Antikörper 555 nachweisbare Fragment von 80 kDa nur in den mit Golgi-Apparat und Synaptosomen von Moosfasern angereicherten Fraktionen zu finden (**Abb. 4.25 D**, Spur 7 und 8). Die Verteilung der Fragmente L1-80 und des löslichen 80 kDa-Bruchstückes zeigte keine Übereinstimmung.

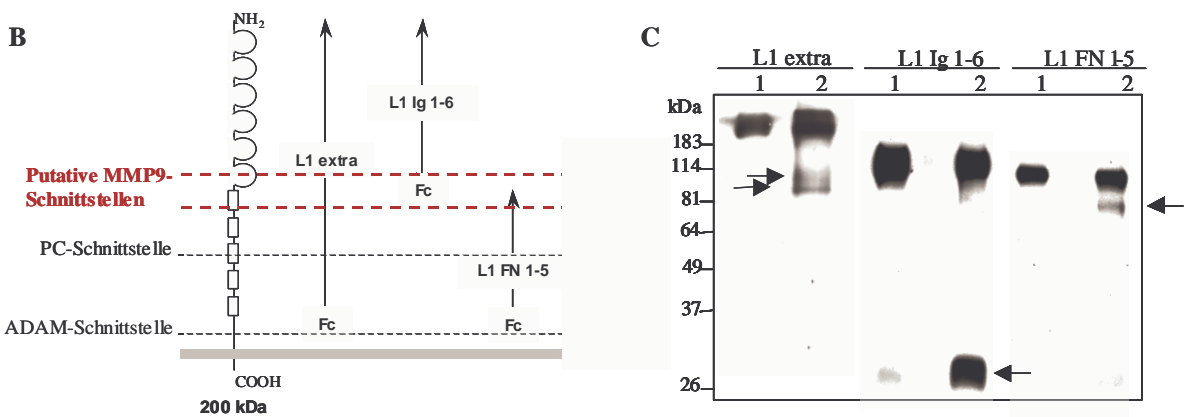
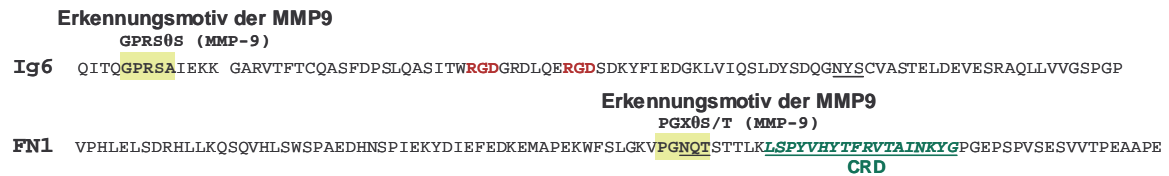
Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass das Molekül L1 über die bereits bekannten Schnittstellen in der dritten Fibronektindomäne und in der Nähe des Membranankers hinaus prozessiert werden kann. Es entsteht unter anderem ein lösliches Fragment mit einem Molekulargewicht von 80 kDa, das im Gegensatz zu dem membranständigen L1-80 das Erkennungsepitop des anti-L1-Antikörpers 555 trägt.

#### **4.2.3.1 Beteiligung der Protease MMP9?**

Sequenzvergleiche der extrazellulären Domäne des Moleküls L1 mit möglichen Proteaseerkennungsmotiven oder -schnittstellen führten zu dem Ergebnis, dass in der sechsten Immunglobulindomäne, sowie in der ersten Fibronektindomäne des L1-Moleküls ein putatives Erkennungsmotiv der Matrixmetalloprotease 9 (MMP9) lokalisiert ist (**Abb. 4.26 A**) (Kridel *et al.*, 2001).

Zur Beantwortung der Frage, ob die Protease MMP9 in der Lage ist, das Molekül L1 in der sechsten Ig-Domäne und / oder in der ersten Fn-Domäne zu spalten und die Spaltung zu der Entstehung von zusätzlichen L1-Bruchstücken führt, wurden

A



**Abb. 4.26: Die Spaltung des Moleküls L1 durch die Protease MMP9.** **A:** Sequenzvergleiche führten zu der Identifizierung von zwei putativen MMP-9 Schnittstellen in der sechsten Ig-Domäne und der ersten Fibronektindomäne des Moleküls L1 (gelb hinterlegt). In der sechsten Ig-Domäne lokalisierte Integrin-Bindungsmotive sind rot hervorgehoben. Carboxyterminal der putativen MMP9-Spaltstelle in der ersten Fibronektindomäne ist ein Zuckerbindungsmotiv lokalisiert (CRD = *carbohydrate recognition motif*, grün). **B:** Das Schema gibt einen Überblick über die Lage der in dem Versuch des *in vitro* Verdau mit der Protease MMP9 eingesetzten rekombinant hergestellten Fragmente des humanen L1 Proteins: die a) aus der extrazellulären Domäne des Moleküls (L1 extra), sowie den b) Domänen Ig 1 - 6 (L1 Ig 1 - 6) und c) Fn 1 - 5 (L1 Fn 1 - 5) bestehenden mit dem Fc-Protein verknüpften Fragmente. Die putativen in der sechsten Ig-Domäne und der ersten Fn-Domäne lokalisierten Schnittstellen der Protease MMP9 sind durch rot gestrichelte Linien gekennzeichnet. **C:** Die rekombinant hergestellten Fragmente des humanen L1-Proteins, „L1 extra“ (Spur 1 und 2), „L1 Ig 1 – 6“ (Spur 3 und 4) und „L1 Fn 1 – 5“ (Spur 5 und 6) wurden einem Verdau mit der Protease MMP9 unterzogen. Darüber hinaus wurde für jedes Fragment ein Kontrollansatz (Spur 2, 4 und 6) ohne Enzym bearbeitet. Im Anschluss an den Verdau wurden die Ansätze mit Hilfe der Immunoblot-Analyse unter Verwendung des polyklonalen anti-L1-Antikörpers untersucht. Die Position der generierten L1-Bruchstücke ist durch Pfeile markiert.

Fragmente des L1-Proteins (**Abb. 4.26 B**) einem *in vitro* Verdau mit der Protease MMP9 unterzogen (s. 3.1.12). Neben dem aus der extrazellulären Domäne des Moleküls L1 bestehenden Fragmentes „L1 extra“ wurden zusätzlich die die Domänen Ig 1 - 6 und Fn 1 - 5 enthaltenen Fragmente „L1 Ig 1 - 6“ und

„L1 Fn 1 - 5“ untersucht. Für jedes Fragment wurde ein Kontrollansatz in Abwesenheit des Enzyms analysiert.

Nach dem Verdau des Fragmentes „L1 extra“ waren im Vergleich zu dem Kontrollansatz zwei Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa und 100 kDa mit Hilfe des polyklonalen anti-L1-Antikörpers detektierbar (**Abb. 4.26 C**, Spur 2). Im Gegensatz dazu führte sowohl die Untersuchung der Ansätze mit Hilfe des anti-L1-Antikörpers 555, sowie dem anti-Fc-Antikörper zu der Detektion lediglich einer Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von etwa 90 kDa (Daten nicht gezeigt). Die Protease MMP9 scheint in der Lage zu sein, die extrazelluläre Domäne von L1 zu spalten, wodurch zwei Fragmente generiert werden: ein Fragment, das basierend auf den Immunoblot-Analysen sowohl durch einen Fc-Tag, als auch durch das Epitop des anti-L1-Antikörpers 555 charakterisiert wird und ein weiteres, das ausschließlich mit Hilfe des polyklonalen anti-L1-Antikörpers nachweisbar ist. Basierend auf diesen Ergebnissen und aufgrund der räumlichen Nähe der putativen Spaltstellen ist sowohl eine Spaltung in der sechsten Ig-Domäne als auch in der ersten Fibronektindomäne denkbar.

Für die differenziertere Lokalisierung der MMP9-Schnittstellen in der extrazellulären Domäne des Moleküls L1 wurden zusätzlich die Fragmente „L1 Ig 1 - 6“ und „L1 Fn 1 - 5“ einem Verdau mit der Protease MMP9 unterzogen. Nach dem Verdau des Fragmentes „L1 Ig 1 - 6“ mit der Protease MMP9 wurde eine Bande von etwa 30 kDa nachgewiesen (**Abb. 4.26 C**, Spur 4), die ebenfalls mit Hilfe des anti-Fc-Antikörpers detektierbar ist (Daten nicht gezeigt). Die in dem Kontrollansatz als minore Komponente detektierbare Bande von etwa 30 kDa, könnte auf die in dem für die Aktivierung der MMP9 verwendeten Puffer enthaltene Protease Trypsin zurückgeführt werden: Das Enzym MMP9 wird wie alle Mitglieder der Matrixmetalloproteasen als inaktive Vorläufer synthetisiert (s. 1.2.1.2), deren Aktivierung eine Abspaltung der Prodomäne durch eine Serinprotease vorausgeht. In diesem Experiment wurde für die Aktivierung der pro-MMP9 vor dem eigentlichen Verdau die Serinprotease Trypsin verwendet. Kommt es nach der Aktivierungsreaktion des pro-Enzyms nicht zu einer ausreichenden Inhibition des Enzyms Trypsin durch den eingesetzten Inhibitor

Aprotinin, sind nicht inhibierte Moleküle des Enzyms Trypsin in der Lage, ihre enzymatische Aktivität weiterhin auszuüben. Trypsin spaltet aminoterminal von basischen Aminosäuren, die unter anderem auch in dem putativen MMP9-Erkennungsmotiv in der sechsten Ig-Domäne des Moleküls L1 vorhanden sind. Die Protease Trypsin könnte allerdings mit einer viel geringeren enzymatischen Effizienz als das Enzym MMP9 die extrazelluläre Domäne von L1 vermutlich in der sechsten Ig-Domäne spalten und ebenso wie MMP9 die Entstehung eines Fragmentes mit einem Molekulargewicht von 30 kDa fördern.- Das zu dem detektierbaren 30 kDa Fragment komplementäre Spaltprodukt bestehend aus den Domänen Ig 1 - 6 konnte in dem Immunoblot allerdings nicht nachgewiesen werden. Basierend auf diesem Ergebnis ist eine eindeutige Aussage bezüglich des Vorkommens einer Schnittstelle der Protease MMP9 innerhalb der Ig-Domänen des Moleküls nicht möglich.

Nach dem Verdau des Fragmentes „L1 Fn 1 - 5“ konnte im Vergleich zu dem Kontrollansatz ein Fragment, das ein Molekulargewicht von etwa 75 kDa aufwies, detektiert werden (**Abb. 4.26 C**, Spur 6). Der Nachweis des aminoterminalen Anteils der ersten Fibronektindomäne war aufgrund des verwendeten Gelsystems nicht möglich. Eine Bestätigung, dass das 70 kDa Fragment sowohl einen Fc-Tag als auch das Epitop des anti-L1-Antikörpers 555 trägt, steht noch aus. Möglicherweise ist die Protease MMP9 in der Lage, L1 innerhalb der Fibronektindomänen Fn 1 - 5 zu spalten.

Der Versuch zeigte, dass die Protease MMP9 *in vitro* in der Lage ist, die extrazelluläre Domäne des Moleküls L1 an einer Stelle in den Fibronektindomänen 1 - 5 zu spalten. Hinweise dafür, dass die Spaltung des Moleküls L1 durch die Protease MMP9 auch *in vivo* von Bedeutung ist, stehen noch aus. Die Analyse der L1-Bruchstücke in Gehirnhomogenaten von MMP9-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren bestätigte die Ergebnisse des *in vitro* Verdauens der L1-Fragmente nicht. In den untersuchten Ansätzen der Mutanten wurden keine Unterschiede in dem L1-Bandenmuster im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die Gehirne von MMP9-defizienten Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren wurden von Dr. L.

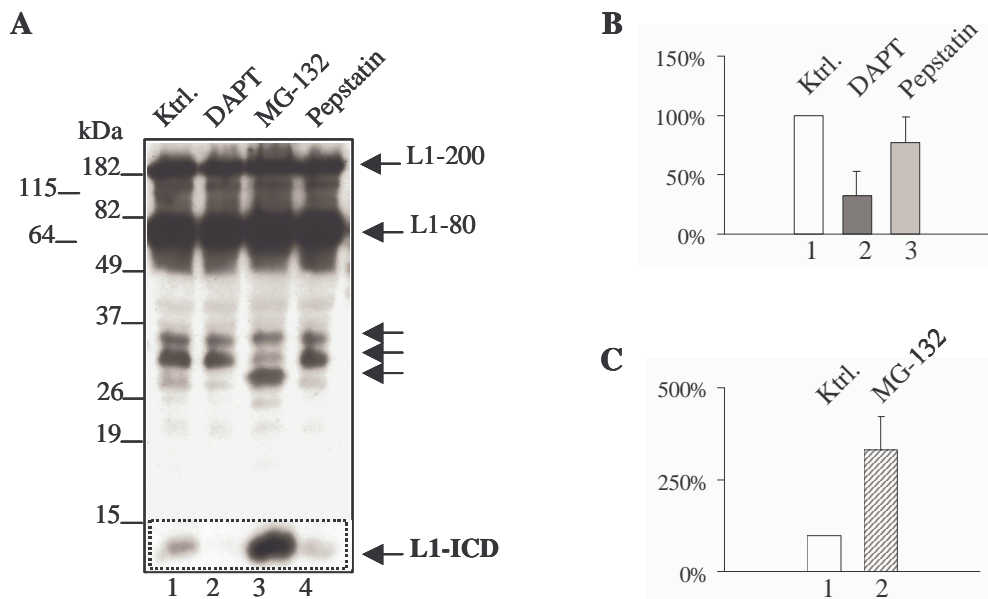
Kazcmarek (Department of Molecular and Cellular Neuroscience, Nencki Institute, Warschau, Polen) zur Verfügung gestellt.

#### 4.2.4 Die Spaltung von L1 in der Transmembrandomäne

Der nach der Abspaltung des extrazytosolischen – des luminalen oder extrazellulären - Proteinanteils eines Transmembranproteins entstandene Membranstumpf dient oftmals als Substrat für *intramembrane-cleaving proteases* (iCLiPs). Auch das Zelladhäsionsmolekül L1 wird durch eine Metalloprotease in der Nähe des Membranankers gespalten und ein Fragment von 180 kDa freigesetzt (s. 4.2.2). Es verbleibt ein dem L1-180 komplementärer Stumpf von etwa 30 kDa in der Membran, der die geeignete Voraussetzung für die Eigenschaft eines Substrates einer Transmembranprotease mit sich bringt. Um die Frage zu untersuchen, ob auch das Zelladhäsionsmolekül L1 in seiner Transmembrandomäne gespalten wird, wurden *in vitro* Proteolyseassays in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren durchgeführt (s. 3.1.10). Basierend auf der Tatsache, dass die an der Spaltung von Transmembranproteinen beteiligten Enzyme, die  $\gamma$ -Sekretasen, der Gruppe der Aspartylproteasen zugeordnet werden, wurde der unspezifische Aspartylproteaseinhibitor Pepstatin und der  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor DAPT für diesen Versuch eingesetzt. Der Nachweis der solubilisierten intrazellulären Domäne eines Transmembranproteins ist wie in dem Fall des *amyloid precursor proteins* oftmals dadurch erschwert, dass das intrazelluläre Fragment, sofern es nicht durch die Interaktion mit einem Bindungspartner stabilisiert wird, in der Zelle in sehr kurzer Zeit durch Enzyme des Proteasoms abgebaut wird. Dieser Vorgang kann durch den Einsatz des Proteasomeninhibitors MG-132 unterbunden werden. Wird auch das Molekül L1 in seiner Membrandomäne unter Beteiligung von Transmembranproteasen gespalten und die intrazelluläre Domäne [L1-ICD (*intracellular domain*)] freigesetzt, kann die Entstehung des Fragmentes durch den Einsatz der beschriebenen Inhibitoren moduliert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die intrazellulären Domänen der Moleküle der L1-Subfamilie hochkonserviert sind, ist der in diesem Versuch verwendete anti-L1-Antikörper 2c2 darüber hinaus

in der Lage, die intrazelluläre Domäne von CHL1 (*close homologue of L1*, s. 1.4.2) zu detektieren. Um eine Kreuzreaktion und somit eine Fehlinterpretation der Ergebnisse auszuschließen, wurden für diesen Versuch isolierte Membranen von CHL1-defizienten Mäusen eingesetzt.

In Abwesenheit eines Proteaseinhibitors konnte in den Sedimenten des *in vitro* Proteolyseassays zusätzlich zu dem L1-200, dem membranständigen Fragment



**Abb. 4.27: Nachweis von L1-Fragmenten in den Sedimenten des *in vitro* Proteolyseassays nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.** **A:** Isolierte Membranen wurden für 1 h bei 37 °C in An- bzw. Abwesenheit (Spur 1) der Proteaseinhibitoren DAPT (50 µM, A: Spur 2, B: Balken 2), MG-132 (5 µM, A: Spur 3, C: Balken 2) und Pepstatin (12,5 µM, A: Spur 4, B: Balken 3) inkubiert (s. 3.1.10). Im Anschluß wurden die Proben durch Zentrifugation in Überstände und Sedimente getrennt. Die in den Sedimenten enthaltenen Proteine wurden daraufhin Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 2c2 untersucht. Der umrandete Bereich zeigt einen Ausschnitt des Immunoblots nach längerer Expositionszeit. **B und C:** Die Balkendiagramme zeigen eine densitometrische Auswertung der Bande des Fragmentes L1-ICD dreier unabhängiger Experimente. Die Position der generierten L1-Bruchstücke ist durch Pfeile markiert.

L1-80 und drei Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kDa, die möglicherweise dem nach der Freisetzung der extrazellulären Domäne in der Membran verbleibenden Membranstumpf L1-30 entsprechen, ein Fragment mit einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa nachgewiesen werden. Das Fragment stimmte mit der errechneten Größe der intrazellulären Domäne des Moleküls L1 (L1-ICD) überein (**Abb. 4.27 A**, Spur 1). Im Gegensatz dazu zeigte der  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor DAPT einen negativen Einfluss auf die Entstehung des Fragmentes L1-ICD, dessen Menge in Anwesenheit des Inhibitors auf weniger als

60 % des Kontrollansatzes reduziert war (**Abb. 4.27 A**: Spur 2, **B**: Balken 2). Der Einsatz des Aspartylproteaseinhibitors Pepstatin führte ebenfalls zu einer verringerten Freisetzung des L1-ICD, obgleich nicht in dem drastischen Maße wie unter dem Einfluss des  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors DAPT (**Abb. 4.27 A**: Spur 4, **B**: Balken 3). Zusammenfassend ließen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass L1 zu den Substraten der iCLiPs zählt und in seiner Transmembrandomäne gespalten werden kann, was in der Entstehung eines 15 kDa-Fragmentes resultiert. Diese Hypothese wurde durch das folgende Ergebnis unterstützt: In Anwesenheit des Proteasomeninhibitors MG-132 war die in den Ansätzen enthaltene Menge des L1-ICD massiv erhöht (**Abb. 4.27 A**: Spur 3, **C**: Balken 2). Das durch die Spaltung in der Transmembrandomäne generierte Fragment L1-ICD scheint von Enzymen des Proteasoms abgebaut zu werden.

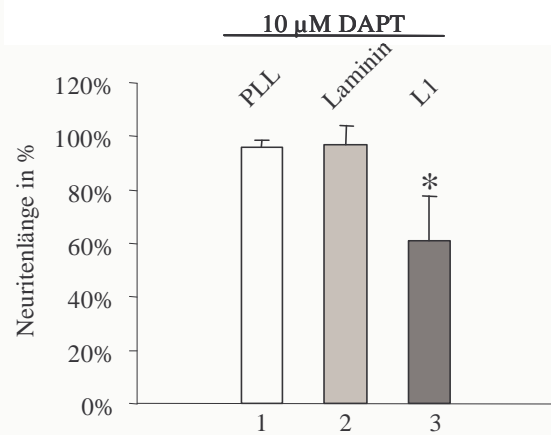
#### 4.2.4.1 Bedeutung für das L1-abhängige Neuritenwachstum

Es konnte in vorausgehenden Experimenten gezeigt werden, dass die Spaltung von L1 durch eine Metalloprotease in der Nähe des Membranankers für den Prozess des L1-abhängigen Neuritenwachstums von großer Bedeutung ist (s. 4.2.2.4). Der Schritt der Prozessierung der extrazellulären Domäne eines Moleküls ist die Voraussetzung für eine weitere Spaltung des Proteins innerhalb der Transmembrandomäne, die zu der Freisetzung der intrazellulären Domäne eines Moleküls in das Zytosol einer Zelle führt. Die intrazelluläre Domäne eines Proteins ist in ihrer Eigenschaft als lösliches Protein in der Lage, ohne die Beteiligung von *second messenger*-Molekülen, Signale aus der Umgebung an das Innere einer Zelle weiterzuleiten. Die Ergebnisse des *in vitro* Proteolyseassays (s. 4.2.4) ließen darauf schließen, dass das Molekül L1 in der Transmembrandomäne gespalten wird. Dies führte zu der Frage, ob das L1-abhängige Neuritenwachstum, initiiert durch die Prozessierung der extrazellulären Domäne des Proteins, durch die anschließende Spaltung des resultierenden Membranstumpfes und die Freisetzung der zytoplasmatischen Domäne vermittelt wird. Basierend auf der Tatsache, dass L1-abhängiges Neuritenwachstum durch eine homophile Interaktion von L1-Molekülen vermittelt wird (Lemmon *et al.*,

1989), wurde der Effekt des  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors DAPT, für den in vorhergehenden Experimenten (s. 4.2.4) eine inhibitorische Wirkung auf die Entstehung des L1-ICD nachgewiesen werden konnte, auf das L1-abhängige Neuritenwachstum untersucht.

**Abb. 4.28: Effekt des  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors DAPT auf das L1-abhängige Neuritenwachstum.**

Kleinhirnexplantate der Maus (s. 3.3.5.2) wurden auf poly-L-Lysin (Balken 1) bzw. auf, mit einer Kombination aus poly-L-Lysin und Laminin (Balken 2) bzw. murinem L1 (Balken 3) beschichteten Deckgläschen (s. 3.3.5.1) in Ab- bzw. Anwesenheit des Presenilininhibitors DAPT (10  $\mu$ M) kultiviert. Im Anschluß wurden die Zellen fixiert, gefärbt und das Neuritenwachstum am Mikroskop ausgewertet. Die durchschnittliche Neuritenlänge auf den Substraten poly-L-Lysin, Laminin und NCAM in Abwesenheit der Inhibitoren (Kontrollansatz) wurde als 100 % festgelegt. Die durchschnittliche Neuritenlänge in Anwesenheit der Inhibitoren wurde auf die jeweilige Kontrolle bezogen. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente.  
\*  $p < 0,05$



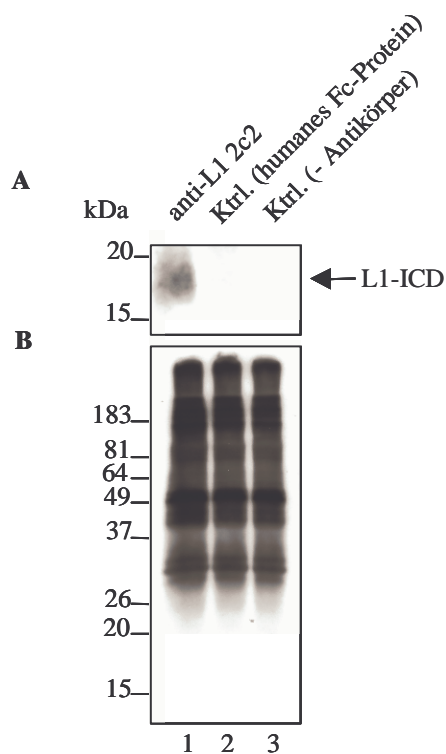
Auf dem Kontrollsubstrat poly-L-Lysin und dem Substrat Laminin konnten in An- und Abwesenheit des  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors DAPT keine signifikanten Unterschiede der Neuritenlängen detektiert werden (**Abb. 4.28**, Balken 1 und 2). Im Gegensatz dazu wurde in Anwesenheit des Inhibitors das L1-abhängige Neuritenwachstum negativ beeinflusst. Die durchschnittliche Neuritenlänge der Explantate war auf weniger als 65 % des Kontrollansatzes in Abwesenheit des Inhibitors reduziert (**Abb. 4.28**, Balken 3). Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass die Spaltung von L1 in der Transmembrandomäne für den Prozess des L1-abhängigen Neuritenwachstums von großer Bedeutung ist.

#### 4.2.4.2 Kernlokalisierung der intrazellulären Domäne von L1

Zelloberflächenrezeptoren wie Notch, APP oder ErbB-4 sind an Signaltransduktionprozessen beteiligt, die von der enzymatischen Aktivität von

Transmembranproteasen vermittelt werden. Die durch Spaltung in der Membran generierten löslichen intrazellulären Domänen dieser Moleküle werden in den Kern transportiert und sind dort an der Regulation der Transkription verschiedenster Gene beteiligt (Kimberly und Wolfe, 2003). Um zu überprüfen, ob auch L1 nach seiner Spaltung in der Transmembrandomäne als lösliches Fragment in den Kern transportiert wird, wurden Immunpräzipitationsexperimente (s. 3.1.8) unter Verwendung von Zellkernextrakten (s. 3.1.6.6) durchgeführt. Kontrollansätze mit ungekoppelten DYNA-Beads bzw. mit DYNA-Beads gekoppelt mit humanem Fc-Protein wurden parallel bearbeitet.

Die **Abb. 4.29** zeigt, dass mit Hilfe des anti-L1-Antikörpers 2c2 ein Fragment mit einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa aus Zellkernextrakten präzipitierbar ist (**Abb. 4.29**, Spur 1). Eine unspezifische Bindung des Fragmentes an DYNA-

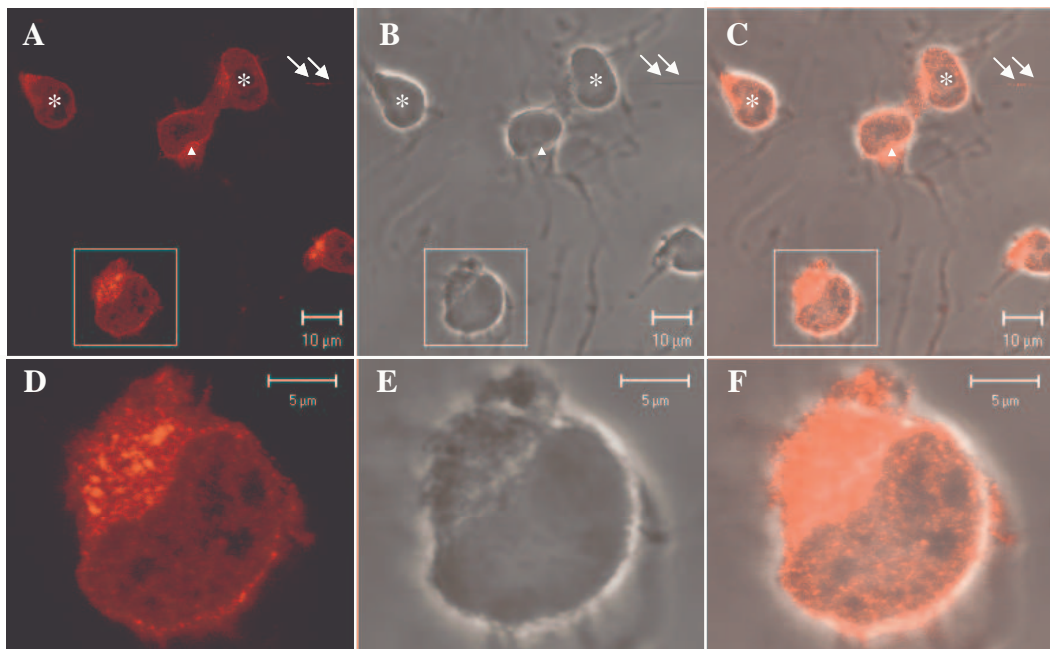


**Abb. 4.29: Nachweis der intrazellulären Domäne des Moleküls L1 in Immunpräzipitaten von Zellkernextrakten.** Kovalent mit anti-L1-Antikörper 2c2 (Spur 1), mit humanen Fc-Protein (Spur 2) verknüpfte bzw. ungekoppelte (Spur 3) Protein A Sepharose DYNA-Beads (s. 3.1.7), wurden mit Zellkernextrakt (s. 3.1.6.6) inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation wurde der Überstand abgenommen (**B**, Spur 1 - 3). Die in den Überständen enthaltenen Proteine wurden zusammen mit den in den Präzipitaten (**A**, Spur 1 - 3) befindlichen Proteinen mit Hilfe der Immunoblot-Analyse unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 2c2 untersucht. Die Lage des intrazellulären Fragmentes L1-ICD ist durch einen Pfeil markiert.

Beads bzw. die konstante Region des Antikörpers konnte dadurch ausgeschlossen werden, dass das Fragment L1-ICD in den Kontrollansätzen nicht nachweisbar war (**Abb. 4.29**, Spur 2 und 3). Die mittels Immunoblot-Analyse untersuchten Überstände der Ansätze nach der Immunpräzipitation verdeutlichten, dass das Ergebnis nicht auf unterschiedlich eingesetzte Proteinmengen in den einzelnen Ansätzen zurückgeführt werden konnte (**Abb. 4.29 B**, Spur 1 - 3). Auch in Immunpräzipitationsexperimenten unter

Verwendung von Zellkernextrakten, die aus den Gehirnhomogenaten von CHL1-defizienten Mäusen isoliert wurden, konnte das Ergebnis reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es aufgrund der Kreuzreaktion des anti-L1-Antikörpers 2c2 mit der intrazellulären Domäne von CHL-1 sich bei dem isolierten Fragment auch um die intrazelluläre Domäne des L1 verwandten Proteins CHL-1 handeln könnte.

Die Hypothese, dass die durch Spaltung in der Membran freigesetzte intrazelluläre Domäne des Moleküls möglicherweise in den Kern transportiert wird, wurde durch die immunhistochemische Analyse von Zellen der Neuroblastoma Zelllinie Neuro 2a unterstützt.



**Abb. 4.30: Immunhistochemischer Nachweis des Moleküls L1 in Zellen der Neuroblastoma Zelllinie Neuro 2a unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 2c2. A und D:** Zellen der Neuroblastoma Zelllinie Neuro 2a wurden auf mit poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät, nach der Inkubation für 24 h in serumfreiem Kulturmedium fixiert, permeabilisiert und die Lokalisierung der intrazellulären Domäne des Moleküls L1 unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 2c2 untersucht. **B und E:** Eine Transmissionsaufnahme der Zellen ist in den Bildern B und E gezeigt. **C und F:** Die Abb. C und F zeigt eine Überlagerung der Bilder A und B, sowie D und E. **D, E und F:** Eine Vergrößerung des in den Bildern A, B und C markierten Vierecks ist in den Bildern D, E und F dargestellt.

Die intrazelluläre Domäne des Moleküls L1, detektiert mit Hilfe des anti-L1-Antikörpers 2c2, konnte vor allem in den Neuriten [Abb. 4.30, A – C (Pfeile)], sowie in den Somata der Zellen nachgewiesen werden. Auffällig war eine

Akkumulation der intrazellulären Domäne in der Nähe des Zellkerns, die vermutlich auf die Neusynthese von L1-Molekülen innerhalb des Endoplasmatischen Retikulum und des Golgi-Apparates zurückzuführen ist [**Abb. 4.30**, A – C (Dreieck)]. Darüber hinaus zeigen die Bilder A - C in der **Abb. 4.30** (Sterne) eine schwache, aber eindeutige Kernfärbung. Mit diesem Versuch konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem im Zellkern detektierten Antigen ausschließlich um die intrazelluläre Domäne von L1 und nicht die CHL1-ICD handelte.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitationsexperimente und der immunhistochemischen Lokalisierung der intrazellulären Domäne des Moleküls L1 in Zellen der Neuroblastoma-Zelllinie Neuro 2a unterstützten die Vermutung, dass die durch Spaltung in der Transmembrandomäne solubilisierte intrazelluläre Domäne des Moleküls L1 von ihrem Ursprungsort der Plasmamembran in den Zellkern transportiert wird.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die regulierte Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM

Neben den membranständigen NCAM-Isoformen NCAM180, NCAM140 und NCAM120 wurden bereits in zahlreichen Studien lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls nachgewiesen (s. 1.4.1.1), deren Entstehung und Bedeutung für das Zentrale Nervensystem bisher nur partiell aufgeklärt werden konnte. Nicht nur unter physiologischen Bedingungen spielen lösliche NCAM-Formen eine Rolle, sie scheinen auch in die Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie altersbedingter Demenz und Schizophrenie involviert zu sein (Poltorak *et al.*, 1995). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Mechanismus der Entstehung löslicher NCAM-Fragmente aufzuklären, darüber hinaus die für die Freisetzung löslicher Bruchstücke verantwortlichen Regulationsmechanismen zu untersuchen, sowie die Funktion und Bedeutung der löslichen Fragmente für das Zentrale Nervensystem zu erarbeiten. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Proteolyseassays unterstützten die bisherige Hypothese, dass lösliche NCAM-Fragmente durch die Spaltung membranständiger Isoformen entstehen, wobei das Glykosylierungsmuster der Proteine keinen Einfluss auf die regulierte Prozessierung ausübt (s. 4.1.1.1, 4.1.1.2). In die Spaltung der Isoformen NCAM140 und NCAM180 ist die den ADAMs (s. 1.2.1.1) zugehörige Metalloprotease ADAM17 / TACE involviert, wohingegen die Freisetzung der extrazellulären Domäne des GPI-verankerten Proteins NCAM120 über einen anderen Prozess reguliert wird (s. 4.1.1.3, 4.1.1.4 und 4.1.1.5). Die Proteolyse der mit dem Molekül Calmodulin intrazellulär interagierenden NCAM-Isoformen NCAM140 und NCAM180 wird von Calmodulininhibitoren positiv beeinflusst (s. 4.1.2.1, 4.1.2.2). Darüber hinaus führt eine Modulation des Aktinzytoskeletts zu einer erhöhten Freisetzung löslicher NCAM-Fragmente (s. 4.1.3.1). Weiterhin sind sowohl die regulierte Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls, als auch

das Molekül Calmodulin essentiell für den Zytoskelett-vermittelten Mechanismus des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums (s. 4.1.3.3, 4.1.3.2).

**Lösliche Fragmente des Moleküls NCAM entstehen durch die regulierte Prozessierung der membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180 unter Beteiligung der Protease ADAM17 / TACE.** Zahlreiche membrangebundene Proteine existieren nicht nur als Transmembranproteine, sondern können auch in löslicher Form nachgewiesen werden. Lösliche Formen von membranständigen Proteinen werden durch die regulierte Spaltung des Moleküls in der Nähe des Membranankers in die Umgebung einer Zelle freigesetzt; ein Vorgang der von Proteasen katalysiert wird, die zu der Gruppe der *Secretases* oder *Sheddases* zusammengefasst werden (s. 1.2, 1.2.1.1) (Hooper *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in vitro* und *in vivo* *Proteolyseassays* zeigten (s. 4.1.1.1, 4.1.1.3), dass auch lösliche NCAM-Formen durch die regulierte Prozessierung der membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180 unter Beteiligung einer Metalloprotease entstehen (s. 4.1.1.4). Die Freisetzung löslicher Fragmente des GPI-verankerten NCAM120 basiert auf einem anderen Mechanismus (s. 4.1.1.4). An der regulierten Prozessierung von Membranproteinen sind in Abhängigkeit der Verankerung des Proteins in der Membran sowohl Phospholipasen, als auch Proteasen beteiligt. Die Isoformen NCAM180 und NCAM140 sind Transmembranproteine, wohingegen NCAM120 über einen GPI-Rest in der Membran verankert ist (s. 1.4.1). Im Gegensatz zu der Freisetzung der extrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 sind an der Spaltung des GPI-verankerten NCAM120 keine Proteasen beteiligt. So liegt die Vermutung nah, dass NCAM120 durch die Spaltung des Lipidankers, katalysiert durch die enzymatische Aktivität einer Phospholipase, von der Membran gelöst wird.

Lösliche NCAM-Fragmente zeichnen sich durch eine extreme Vielfalt ihrer Molekulargewichte - von 110 kDa bis zu 190 kDa - aus. Das Molekulargewicht der extrazellulären Domäne des Moleküls NCAM, die durch regulierte Prozessierung von der Zelloberfläche gespalten werden kann, kann durch eine Verknüpfung mit Sialinsäureketten, die aus mehr als hundert Zuckermonomeren bestehen können, dramatisch verändert werden (Kiss und Rougon, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit

konnte gezeigt werden, dass lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM mit einem Molekulargewicht von größer als 110 kDa durch die Spaltung membranständiger glykosylierter, speziell PSA-tragender Isoformen entstehen. (s. 4.1.1.1, 4.1.1.2). Extreme Schwankungen in den Molekulargewichten löslicher NCAM-Fragmente sind daher durch Modifikationen des Glykosylierungsmusters des Zelladhäsionsmoleküls zu erklären.

Dem Zelladhäsionsmolekül NCAM im allgemeinen und PSA-NCAM im speziellen wird eine große Rolle in der Entwicklung des Nervensystems zugeschrieben (s. 1.4.1). Das Zuckerepitop fördert durch eine Aufhebung der Interaktion zwischen benachbarten Zellen nicht nur die Migration, sondern ist auch an der Defaszikulierung von Neuronen bei einem Neuarrangement von Axontrakten beteiligt (Durbec und Cremer, 2001). Möglicherweise spielen Proteasen bei der Vermittlung dieser Vorgänge eine bedeutende Rolle, die durch die regulierte Prozessierung des Moleküls NCAM bestehende Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen aufheben. Im adulten Nervensystem wird PSA-NCAM im Gegensatz zu NCAM, das an der Stabilisierung bestehender Strukturen beteiligt ist, eine Funktion bei regenerativen Prozessen und der synaptischen Plastizität zugeordnet (Doherty *et al.*, 1995; Fox *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 1996; Eckhardt *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2000). Die in dem Hippocampus durch den Prozess der Langzeitpotenzierung charakterisierte synaptische Plastizität wird mit aktivitätsabhängigen Veränderungen von Molekülen des synaptischen Spaltes erklärt. Lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM können nach der Stimulation von LTP in Maus-Hippocampi nachgewiesen werden (Fazeli *et al.*, 1994; Hoffman *et al.*, 1998; Hoffman, 1998). Möglicherweise werden die von NCAM bzw. PSA-NCAM vermittelten Funktionen der synaptischen Plastizität unter anderem durch die regulierte Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls moduliert.

Für die Spaltung von Membranproteinen sind unter anderem Metalloproteasen der ADAM-Familie verantwortlich (s. 1.2.1.1). Eines der am besten untersuchten Mitglieder der ADAMs ist die Protease TACE (*TNF $\alpha$  converting enzyme*). TACE-defiziente Mäuse zeigen einen massiven Phänotyp. Die Mehrheit der Mutanten stirbt in dem Zeitraum von Tag 17 des Embryonalstadiums bis zu einem Tag nach der Geburt. Die wenigen überlebenden Mutanten weisen eine starke

Degeneration des Auges, schwere Defekte der Haut und in der Reifung epithelialer Zellen und deren Organisation auf, die die Funktion zahlreicher Organe wie des Darms, der Lunge, des Magens, der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse und der Speicheldrüsen negativ beeinflussen. Dieser dramatische Phänotyp der TACE-defizienten Mäuse ist nicht nur auf eine fehlende Prozessierung des namensgebenden Substrates der Protease, des *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) zurückzuführen. Die Protease scheint über die Spaltung des TNF $\alpha$  hinaus an der Prozessierung weiterer Transmembranproteine beteiligt zu sein, die vor allem eine bedeutende Rolle in der Entwicklung des Organismus spielen und so den massiven Effekt des Fehlens des Proteins TACE erklären könnten (Peschon *et al.*, 1998). In zahlreichen Studien konnten bereits weitere Substrate der Protease TACE identifiziert werden, zu denen unter anderem *L-Selectin* (Goddard *et al.*, 2001), p75 TNF-Rezeptor (Peschon *et al.*, 1998) und das *amyloid precursor protein* (Buxbaum *et al.*, 1998) zählen (s. auch 1.2.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Transfektionsexperimente mit Expressionskonstrukten kodierend für die Protease TACE und eine, in der proteolytischen Aktivität defizienten Form des Enzyms dTACE zeigten, dass die Protease auch an der Freisetzung löslicher Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM beteiligt ist (s. 4.1.1.5). Die Gruppe von Proteinen, die zu den Substraten der Protease TACE zählen, kann somit um ein zusätzliches Protein, das Zelladhäsionsmolekül NCAM, erweitert werden.

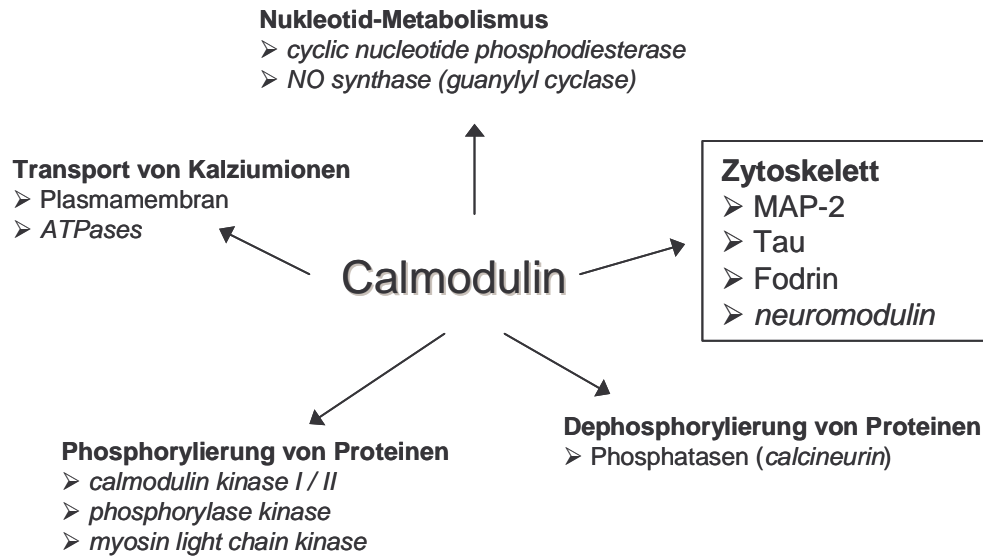
Die physiologische Bedeutung der Protease TACE für das sich entwickelnde und adulte Nervensystem konnte bisher nur partiell aufgeklärt werden. Eine histochemische Analyse der zellulären Lokalisierung des Proteins im adulten Zentralen Nervensystem zeigt eine ausschließliche Verteilung der Protease in den Gehirnregionen des Hippocampus, des Kleinhirns, des Mesencephalons und der Brücke (Pons) (Karkkainen *et al.*, 2000; Skovronsky *et al.*, 2001). Im Hippocampus scheint die Protease TACE an der Vermittlung der synaptischen Plastizität beteiligt zu sein, die unter anderem auch durch lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM moduliert wird (Luthi *et al.*, 1994; Fazeli *et al.*, 1994). Neben einer Beteiligung an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose ist TACE darüber hinaus als

$\alpha$ -Sekretase in der Lage, die Entstehung des für die Erkrankung Morbus Alzheimer charakteristischen Peptids *amyloid  $\beta$*  zu verhindern (s. 1.3) (Hohnoki *et al.*, 1998).

Die Beteiligung von Proteasen an der Entstehung löslicher Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM erklärt möglicherweise deren Vorkommen in zahlreichen pathologischen Situationen. So sind lösliche NCAM-Fragmente im Serum von Lungenkrebspatienten nachweisbar (Jaques *et al.*, 1993; Takamatsu *et al.*, 1994). Darüber hinaus scheinen sie in die Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen wie altersbedingter Demenz und Schizophrenie involviert zu sein (Poltorak *et al.*, 1995). Proteasen sind Enzyme, die nicht nur auf Transkriptionsebene, sondern auch nach ihrer Reifung zu einem funktionellen Protein durch zahlreiche Mechanismen reguliert werden können (s. 1.1). Unter pathologischen Bedingungen gerät die Balance zwischen verantwortlichen Proteasen und ihren endogenen Regulationssystemen oftmals aus dem Gleichgewicht, was in einer unkontrollierten Spaltung der Substrate resultiert. Positive Eigenschaften kehren sich in negative um (s. 1.3): So erscheint die Protease-geförderte Migration von Zellen in der Entwicklung eines Organismus unter pathologischen Bedingungen, die dann unter anderem für die Metastasierung von Tumorzellen verantwortlich sein kann, in einem völlig neuen Licht.

**Der Kalziumsensor Calmodulin, der die regulierte Prozessierung membranständiger NCAM-Isoformen negativ beeinflusst, interagiert mit der intrazellulären Domäne der membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180.** Das hochkonservierte und der EF-Hand-Familie zugehörige Protein Calmodulin zählt neben seiner in dem Skelettmuskel vorkommenden Isoform Troponin C zu den Hauptkalziumsensoren der eukaryotischen Zelle. Calmodulin besteht aus zwei globulären „Lappen“, die durch eine lange  $\alpha$ -Helix miteinander verbunden sind. Jeder „Lappen“ wird von zwei EF-Hand-Strukturen gebildet, so dass Calmodulin vier Bindungsstellen für Kalziumionen besitzt. In Abwesenheit von Kalziumionen sind die für die Bindung mit verschiedenen Zielproteinen verantwortlichen negativ geladenen und von hydrophoben Bereichen umgebenden Regionen des Proteins maskiert. Die Bindung von Kalziumionen hat

eine Konformationsänderung zur Folge, die eine Interaktion mit Zielproteinen ermöglicht. Calmodulin ist so in der Lage, mit positiv geladenen, amphiphatischen



**Abb. 5.1:** Calmodulin ist in die Regulation von zahlreichen Signaltransduktionswegen involviert. Eine Bindung von Kalziumionen an Calmodulin führt zu der Aktivierung von zahlreichen Enzymen und Proteinkomplexen, die die Modulation und Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse ermöglichen.

$\alpha$ -Helices, die in der Aminosäuresequenz seiner Zielproteine lokalisiert sind, zu interagieren. Mehr als hundert Enzyme können von dem Molekül Calmodulin reguliert werden (**Abb. 5.1**). Diaz-Rodriguez *et al.* konnten zeigen, dass Calmodulin auch an der Regulation des *Ectodomain Sheddings* der Transmembranproteine des *transforming growth factor- $\alpha$  receptors*, des *amyloid precursor proteins*, der *tyrosine receptor kinase A* oder des *L-selectins* beteiligt ist (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000). *In vivo Inhibitorassays* in An- bzw. Abwesenheit des Calmodulininhibitors CGS 9343 B zeigten, dass auch die regulierte Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls NCAM negativ von dem Kalziumsensor Calmodulin beeinflusst wird (s. 4.1.2.1). Bisher konnte der Mechanismus des Einflusses von Calmodulin auf die regulierte Proteolyse von Transmembranproteinen nur in wenigen Fällen aufgeklärt werden. So konnte für das Protein *L-selectin* nachgewiesen werden, dass die Modulation der Prozessierung des Proteins von einer direkten Interaktion mit dem Kalziumsensor Calmodulin abhängig ist (Matala *et al.*, 2001). Für viele prozessierte Transmembranproteine fehlt jedoch der Nachweis einer direkten Interaktion mit dem Protein Calmodulin, so dass auch ein indirekter Mechanismus als Problemlösung in betracht gezogen werden muß. Der

Einfluss von Calmodulin auf die regulierte Prozessierung von NCAM kann daher auf der einen Seite indirekt, möglicherweise über eine Regulation der verantwortlichen Protease, vermittelt werden, auf der anderen Seite aber auch auf einer direkten Interaktion von Calmodulin mit dem Protein NCAM basieren. So stellte sich die Frage, ob NCAM möglicherweise in der Lage ist, mit dem Kalziumsensor Calmodulin zu interagieren. Überraschenderweise führten Sequenzvergleiche zu der Identifizierung eines möglichen invertierten Calmodulinbindungsmotivs („1-5-8-14“- Motiv) in Membrannähe der, in diesem Abschnitt identischen, intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 (**Abb. 4.10**). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte ELISA-Studien zeigten, dass Calmodulin in der Tat in der Lage ist, konzentrationsabhängig an die intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 zu binden (s. 4.1.2.2). Die intrazelluläre Domäne von NCAM180 zeigte im Vergleich zu NCAM140-ICD eine stärkere Interaktion mit dem Protein Calmodulin. Ein Einfluss der ausschließlich in der ICD von NCAM180 vorkommenden, von dem Exon 18 kodierten, Aminosäuresequenz an der Vermittlung der Bindung an Calmodulin liegt nah. Die Interaktion der beiden Moleküle konnte mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimenten und *surface plasmon resonance* - Analysen verifiziert werden (Bohrmann, 2001). Kompetitionsstudien zur genaueren Lokalisierung der Calmodulinbindungsstelle unter Verwendung von Peptiden, die unter anderem die putative Calmodulinbindungsstelle mimikrierten, bestätigten, dass die Interaktion der Proteine über einen membrannahen Abschnitt der zytoplasmatischen Domäne, der das mögliche Calmodulinbindungsmotiv aufweist, vermittelt wird (s. 4.1.2.2). Dennoch bestand die Möglichkeit, dass die Competition durch das Peptid, das die putative Bindungsstelle mimikrierte, indirekt, eventuell über eine Interaktion mit der ICD des NCAM140 bzw. NCAM180 und einer daraus resultierenden Konformationsänderung, vermittelt wird. Weitere ELISA-Studien in Anwesenheit steigender Konzentrationen der intrazellulären Domäne von NCAM140 und konstanten Mengen des die Bindungsstelle mimikrierenden Peptids zeigten jedoch eine Competition der konzentrationsabhängigen und sättigbaren Bindung der beiden Proteine, die in einem niedrigeren Plateauwert endete (s. 4.1.2.2). Würde die Competition des Peptids nicht auf einer direkten

Bindung an das Protein Calmodulin basieren, würde sich der Effekt bei steigenden Konzentrationen der NCAM140-ICD verringern und die Bindungskurve bei einer definierten Konzentration das Plateau der Kontrollkurve erreichen. Für die intrazelluläre Domäne von NCAM180 konnte dieser Effekt lediglich in Anwesenheit geringer Konzentrationen der NCAM180-ICD festgestellt werden (s. 4.1.2.2). Höhere Konzentrationen des Interaktionspartners NCAM180-ICD führten in Anwesenheit des kompetierenden Peptids zu einem linearen Anstieg der Bindungskurve, was möglicherweise durch eine Überlagerung zweier Mechanismen zu erklären ist. Es besteht die Möglichkeit, dass der Einsatz des kompetierenden Peptides bei Konzentrationen der NCAM180-ICD über 10 µg/ml zu einer Zusammenlagerung einzelner Moleküle führt, die dennoch an Calmodulin binden können und zu einer erhöhten gemessenen Absorption führen. Dieser massive Effekt trat in den Vordergrund und machte eine Auswertung des Einflusses des kompetierenden Peptids in Anwesenheit höherer Konzentrationen des NCAM180-ICD unmöglich (s. 4.1.2.2).

Basierend auf diesen Ergebnissen lag die Vermutung nah, dass die Modulation der regulierten Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM durch den Kalziumsensor Calmodulin über eine direkte Interaktion der beiden Proteine vermittelt werden könnte, wie es bereits für das in die Leukodiapedese involvierte Protein *L-selectin* gezeigt werden konnte. In dem Fall von *L-selectin* interagiert das Protein Calmodulin konstitutiv mit der intrazellulären Domäne des *L-selectins* in „ruhenden“ Leukozyten (Matala *et al.*, 2001). Die Spaltung der extrazellulären Domäne von *L-selectin* wird durch verschiedenste Einflüsse wie Entzündungsvorgänge (Kishimoto *et al.*, 1989), osmotischen Stress (Rizoli *et al.*, 1999) und bakteriellen Superantigenen oder Toxinen (Miethke *et al.*, 1993; Walev *et al.*, 2000) stimuliert. An der Freisetzung der extrazellulären Domäne des Moleküls *L-selectin* ist die auch in die Spaltung membranständiger NCAM-Isoformen involvierte Metalloprotease ADAM 17 / TACE beteiligt (Peschon *et al.*, 1998). Es wird vermutet, dass eine Aktivierung der Leukozyten zu einer Aufhebung der Interaktion zwischen Calmodulin und *L-selectin* führt, die eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne einhergehend mit einer Präsentation der Spaltstelle zur Folge hat (Kahn *et al.*, 1998; Fors *et al.*, 2001).

Die Interaktion von Calmodulin mit seinen Zielproteinen kann nicht nur durch variierende Konzentrationen von Kalziumionen und damit einhergehenden Konformationsänderungen des Calmodulins reguliert werden. Die Zelle bedient sich unter anderem des Mechanismus der Phosphorylierung von Aminosäureresten, die in der Calmodulinbindungsstelle der intrazellulären Domäne der Zielproteine lokalisiert sind. In der zytoplasmatischen Domäne der Proteine MARCKS, *neurogranin* und *neuromodulin* befinden sich Serinreste, die nach ihrer Verknüpfung mit einem Phosphatrest die Interaktion mit dem Molekül Calmodulin verhindern (Alexander *et al.*, 1987; Hartwig *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1993). In dem Bereich des putativen in Membrannähe lokalisierten Calmodulinbindungsmotiv in den intrazellulären Domänen der Isoformen



**Abb. 5.2: Lokalisierung des putativen Calmodulinbindungsmotivs in den intrazellulären Domänen von NCAM 140 und NCAM 180.** Sequenzvergleiche führten zu der Identifizierung eines putativen invertierten „1-5-8-14“-Calmodulinbindungsmotivs (grün hinterlegt) in der intrazellulären Domäne von NCAM140 und NCAM180. Die Lage der möglichen Palmitoylierungsstellen ist blau hervorgehoben.

NCAM140 und NCAM180 sind keine Phosphorylierungsstellen zu finden. Jedoch überlappt das Bindungsmotiv mit vier potentiellen Palmitoylierungsstellen, die durch die Aminosäure Cystein charakterisiert werden (**Abb. 5.2**). Die Verknüpfung eines Palmitinsäurerestes mit der Aminosäure Cystein führt zu einer Insertion des NCAM140 in *lipid rafts*, die in einer Aktivierung des für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum essentiellen *non-receptor tyrosine kinase pathways* resultiert (Niethammer *et al.*, 2002). Möglicherweise beeinflusst auch die Modifikation der intrazellulären Domäne der Isoformen NCAM140 und NCAM180 durch Palmitoylierung, ähnlich wie die Phosphorylierung der Proteine MARCKS, *neurogranin* oder *neuromodulin*, die Interaktion mit dem Molekül Calmodulin. Daraus resultiert folgende Hypothese: Ähnlich wie in dem Fall des *L-selectins* interagiert NCAM konstitutiv mit dem Protein Calmodulin und verhindert so durch eine Maskierung der Cysteine eine Palmitoylierung der intrazellulären Domäne. Die ADAM-Schnittstelle in der extrazellulären Domäne des Moleküls ist für die Protease nicht zugänglich. Die Aktivierung einer Zelle führt zu einer Ablösung des

Calmodulins von seinem Interaktionspartner NCAM, was in einer Konformationsänderung der extrazellulären Domäne des Membranproteins resultiert, die eine Freilegung der Schnittstelle zur Folge hat. Auf der einen Seite kann die Spaltung des Proteins direkt nach Demaskierung der Schnittstelle erfolgen, andererseits werden das Substrat und sein Enzym möglicherweise erst durch eine Palmytylierung und einer damit einhergehenden Insertion in *lipid rafts* zusammengeführt. Wie bereits erwähnt, stellt die Insertion des NCAM140 in Membranmikrodomänen eine bedeutende Rolle für den Prozess des NCAM-abhängigen Neuritenwachstums dar, der unter anderem durch eine ständige Modulation von Zell-Zell- und Zellmatrixinteraktionen und massiven Umstrukturierungen des Zytoskeletts charakterisiert wird. Dies implizierte die Frage, welche Funktionen durch die regulierte Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM moduliert werden und welche Rolle dabei der Kalziumsensor Calmodulin spielt. Ist die regulierte Prozessierung von NCAM möglicherweise in das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum involviert?

**Die regulierte Prozessierung der membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180 und der Interaktionspartner Calmodulin spielen eine essentielle Rolle für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum.** Erste Antworten auf diese Frage gaben *in vivo* *Proteolyseassays* zur Untersuchung des Einflusses Zytoskelett-stabilisierender und -destabilisierender Substanzen auf die regulierte Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls NCAM. Die Versuche zeigten, dass lediglich die Modulation des Aktinzytoskeletts zu einer verstärkten Freisetzung der extrazellulären Domäne des Moleküls NCAM führt, wohingegen Tubulin-modulierende Agentien die Spaltung nicht beeinflussen (s. 4.1.3.1). Bereits in zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass das Aktinzytoskelett und nicht Mikrotubuli an der Regulation des *Ectodomain Sheddings* von Transmembranproteinen beteiligt ist. So führt die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch die Substanz Cytochalasin D zu einer Reduktion der Freisetzung des Proteins CD44 (Shi *et al.*, 2001). Eine verstärkte Aktinpolymerisation induziert die Spaltung der Proteine Fcγ-Rezeptor III, CD 43 und *L-selectin* (Middelhoven *et al.*, 1999). Auch an der regulierten Spaltung der MT1-MMP ist das Aktinzytoskelett beteiligt. Eine Zerstörung von

Aktinfilamenten durch die Aktin-destabilisierenden Substanzen Concanavalin A und Cytochalasin D resultiert in einer verstärkten Prozessierung der Metalloprotease (Annabi *et al.*, 2001).

In der Entwicklung und der Regeneration des Zentralen Nervensystems wird vor allem der Prozess des Neuritenwachstums, der unter anderem auch von dem Zelladhäsionsmolekül NCAM beeinflusst wird, durch Modulationen des Zytoskeletts reguliert. Der Vorgang des Neuritenwachstums setzt sich aus zwei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen: Zunächst bildet eine Zelle Filopodien aus, deren Entstehung ausschließlich auf einem auf dem Aktinzytoskelett-vermittelten Treitmühlenartigen Mechanismus basieren. Dieser Vorgang resultiert in einer gerichteten Vorwärtsbewegung des Wachstumskegels, der die Spitze eines auswachsenden Neuriten bildet. Im folgenden kommt der zweite Prozess zu tragen, der zu einer Verlängerung des Neuriten führt, die durch Mikrotubuli und nicht durch das Aktinzytoskelett vermittelt wird. Für das Protein NCAM konnte eine Beteiligung an dem durch das Aktinzytoskelett vermittelten und gerichteten Auswachsen des Wachstumskegels nachgewiesen werden (Takei *et al.*, 1999). Dies implizierte die Frage, ob die durch eine Modulation des Aktinzytoskeletts regulierte Freisetzung der extrazellulären Domäne des Moleküls NCAM eine Rolle für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum spielt. Die Analyse der Neuritenlängen von Kleinhirnexplantaten in An- bzw. Abwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001, der in der Lage ist, die Freisetzung der extrazellulären Domäne des Moleküls NCAM zu inhibieren (s. 4.1.1, 4.1.1.3), zeigte, dass in der Tat die regulierte Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls NCAM von essentieller Bedeutung für das NCAM-abhängige Neuritenwachstum ist (s. 4.1.3.2).

Die Vorwärtsbewegung eines Wachstumskegels erfordert ein angemessenes Substrat zur Verankerung und Stabilisierung des Axons in der neu eingenommenen Umgebung. Zelloberflächenrezeptoren wie die Zelladhäsionsmoleküle NCAM oder L1 interagieren mit *Guidance*-Moleküle der extrazellulären Matrix. Einige dieser Rezeptoren liegen nicht nur in membranverankerter Form vor, sondern können auch durch regulierte Proteolyse von der Membran gelöst und in die EZM integriert werden, wo sie möglicherweise

eine Funktion als attraktives oder repulsives Substrat ausüben. Auch das Zelladhäsionsmolekül NCAM ist in der Lage, sowohl in seiner Funktion als membrangebundener Rezeptor als auch als immobilisiertes Substrat der EZM NCAM-abhängiges Neuritenwachstum zu stimulieren (Ronn *et al.*, 2002). Möglicherweise werden Interaktionen im Bereich des Wachstumskegels, die durch das Molekül NCAM vermittelt werden, von dem, durch das Aktinzytoskelett regulierten, Prozess des *Ectodomain Sheddings* beeinflusst. Carenini *et al.* konnten zeigen, dass die Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch Cytochalasin D zu einer massiven Reduktion von NCAM-vermittelten Zell-Zellkontakten führt (Carenini *et al.*, 1998). Es liegt die Vermutung nah, dass der Abbau des Aktinzytoskeletts eine verstärkte Prozessierung des Moleküls NCAM zur Folge hat, die in einer Aufhebung von Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen resultiert. Dies ermöglicht einem wachsenden Neuriten in Abhängigkeit von attraktiven oder repulsiven Stimuli neue Wege einzuschlagen, mit anderen Nervenbahnen und Axontrakten zu assoziieren und somit die Entwicklung des Nervensystems in einem besonderen Maße zu beeinflussen.

So blieb die Frage zu klären, welchen Einfluss der mit den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180 interagierende und die regulierte Proteolyse von NCAM negativ beeinflussende Kalziumsensor Calmodulin auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum ausübt. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass nicht nur die regulierte Proteolyse von NCAM, sondern darüber hinaus auch das Molekül Calmodulin eine bedeutende Rolle für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum spielt. Der Einsatz des Calmodulininhibitors CGS 9343 B führte zu einer massiven Reduktion des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums (s. 4.1.3.3), wohingegen PLL-, Laminin- oder L1-abhängiges Neuritenwachstum von dem Inhibitor nicht beeinflusst wurde. Möglicherweise spielt für den Prozess des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums die direkte Interaktion der Proteine NCAM und Calmodulin eine besondere Rolle. Diese Frage bleibt offen, doch lassen sich folgende Überlegungen anschließen: Die Stimulation von NCAM-vermittelten Neuritenwachstum führt über verschiedene Signaltransduktionswege zu einer Mobilisierung von Kalziumionen sowohl aus der Umgebung der Zelle, als auch aus intrazellulären

Kalziumspeichern (s. 1.4.1). Erhöhte Kalziummengen in dem Inneren einer Zelle können unter anderem die Bindungseigenschaften des Kalziumsensors Calmodulin beeinflussen. Neben der Regulation der Aktivität von zahlreichen Enzymen (**Abb. 5.1**), moduliert Calmodulin über eine Interaktion mit Proteinen wie *spectrin* (Stromqvist *et al.*, 1988; Steiner *et al.*, 1989),  *$\beta$ -adducin* (Scaramuzzino und Morrow, 1993) oder *caldesmon* (Ikebe *et al.*, 1990; Marston *et al.*, 1994) zahlreiche von dem Zytoskelett vermittelte Vorgänge. *Spectrin*,  *$\beta$ -adducin* und *caldesmon* übernehmen die Rolle von *linker* Proteinen, die eine Brücke zwischen Zelladhäsionsmolekülen und dem Zytoskelett bilden und so über eine Bindung von Komponenten der EZM eine Verankerung der Zelle in ihrer Umgebung ermöglichen. Das Protein *spectrin* zählt zu den Interaktionspartnern des Moleküls NCAM. So ist denkbar, dass Calmodulin durch eine direkte Bindung an das Molekül NCAM die durch das Protein *spectrin* vermittelte Interaktion mit dem Aktinzytoskelett aufhebt. In ähnlicher Weise wirkt Calmodulin als eine Art Antagonist auf die Interaktion des NMDA-Rezeptors mit dem Zytoskelett assoziierten Protein  *$\alpha$ -actinin* (Wyszynski *et al.*, 1997). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Calmodulin indirekt, vermittelt durch eine Spaltung des Linkerproteins *spectrin* unter Beteiligung von Proteasen der Calpaine, die Fähigkeit des *spectrins*, an das Aktinzytoskelett zu binden, verhindert (Harris und Morrow, 1988; Harris und Morrow, 1990). Eine Aufhebung der Interaktion von NCAM mit dem Aktinzytoskelett würde die Stabilität von Zellkontakten, aber auch Zell-Matrixinteraktionen und die damit verknüpfte Verankerung einer Zelle in ihrer Umgebung massiv beeinflussen. Die darüber hinaus durch das Aktinzytoskelett und das Protein Calmodulin beeinflusste regulierte Proteolyse des Zelladhäsionsmoleküls ermöglicht in ihrer Eigenschaft eines kurzfristig einsetzbaren Mechanismus die Aufhebung der Verankerung des richtungsweisenden Wachstumskegels eines auswachsenden Neuriten. Eine Zelle ist so in der Lage, ausgelöst durch Signaltransduktionsprozesse sehr schnell auf richtungsweisende Stimuli in der Umgebung einer Zelle zu reagieren.

## 5.2 Die regulierte Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls L1

Nicht nur für das Protein NCAM, sondern auch in dem Fall des Zelladhäsionsmoleküls L1 wurden bereits in sehr frühen Studien lösliche Fragmente in den Überständen von Gehirnhomogenaten (Rathjen und Schachner, 1984; Faissner *et al.*, 1985; Sadoul *et al.*, 1988; Liljelund *et al.*, 1994) nachgewiesen. Ebenso wie Fragmente des NCAMs scheinen sie nicht nur an physiologischen Prozessen, sondern auch an der Pathogenese zahlreicher Tumorerkrankungen und neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Nybroe *et al.*, 1989; Meli *et al.*, 1999) beteiligt zu sein. Trotz intensiver Forschung konnte die Entstehung sowie die Bedeutung der löslichen Fragmente des Moleküls L1 bisher nur partiell aufgeklärt werden. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die für die Freisetzung löslicher Fragmente verantwortliche Protease zu identifizieren, darüber hinaus die der Prozessierung des Moleküls L1 zugrunde liegenden Regulationsmechanismen aufzuklären und die Funktion der löslichen Fragmente im Zentralen Nervensystem zu untersuchen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass an der Entstehung des löslichen Fragmentes L1-140, das zunächst über die Ausbildung eines Heterodimers mit einem membranständigen L1-Molekül membranassoziiert bleibt (s. 4.2.1.3) und erst durch eine Spaltung des L1-200 unter Beteiligung einer Metalloprotease von der Membran gelöst wird (s. 4.2.2.1, 4.2.2.2), die Prohormonkonvertasen PC5A und Furin beteiligt sind (s. 4.2.1.1). Das Fragment L1-180, dessen Entstehung durch das Molekül Calmodulin negativ beeinflusst wird (s. 4.2.2.3), spielt eine bedeutende Rolle für das L1-abhängige Neuritenwachstum (s. 4.2.2.4). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Molekül L1 zusätzlich zu den bereits bekannten Spaltstellen in der dritten Fibronektindomäne und in der Nähe des Membranankers an weiteren Stellen innerhalb der extrazellulären Domäne prozessiert wird. Die Protease MMP9 scheint in diesen Prozess involviert zu sein (s. 4.2.3). Darüber hinaus erfolgt eine Spaltung des Moleküls L1 in der Transmembrandomäne, die für das L1-abhängige Neuritenwachstum essentiell ist (s. 4.2.4, 4.2.4.1) und zu der

Solubilisierung und dem Transport der intrazellulären Domäne L1-ICD in den Zellkern führt (s. 4.2.4.2).

**Das Fragment L1-140 entsteht durch die Spaltung der extrazellulären Domäne des Moleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne unter Beteiligung der Prohormonkonvertase PC5A.** Zahlreiche Funktionen des Zelladhäsionsmoleküls L1 werden über die dritte Fibronektindomäne des extrazellulären Anteils vermittelt. In der Aminosäuresequenz der Domäne wurden zwei RGD-unabhängige Integrin-Bindungsmotive lokalisiert (**Abb. 5.3 A**). Eine Spaltung des Moleküls führt zu einer Zerstörung des Bindungsmotivs und hebt die Interaktion mit Integrinen auf (Silletti *et al.*, 2000). Weiterhin konnte dieser Domäne eine Beteiligung an der Multimerisierung und der homophilen Interaktion von L1-Molekülen nachgewiesen werden (Silletti *et al.*, 2000). Appel *et al.* konnten zeigen, dass die dritte Fibronektindomäne eine essentielle Rolle für das durch die homophile Interaktion von L1-Molekülen initiierte L1-abhängige Neuritenwachstum spielt (Appel *et al.*, 1993; Appel *et al.*, 1995; Stallcup, 2000). Die Bedeutung der Integrität dieser Domäne für zahlreiche Funktionen des L1-Moleküls verdeutlicht von welcher großen Bedeutung die Suche nach der verantwortlichen Protease und die Analyse der regulierten Entstehung des Fragmentes L1-140 für das Verständnis der Funktion des L1-Moleküls im Zentralen Nervensystem ist. Die aminoternale Sequenzierung des membranständigen zu L1-140 komplementären L1-80 führte zu dem Ergebnis, dass die Spaltung des Moleküls in der dritten Fibronektindomäne carboxyterminal der Aminosäure Arginin 845 erfolgt (**Abb. 5.3 A**). Das Fragment L1-140 kann *in vitro* durch die Serinproteasen Plasmin und Trypsin generiert werden (Sadoul *et al.*, 1988; Silletti *et al.*, 2000). Die durch Plasmin generierten Fragmente zeigen jedoch keine Übereinstimmungen mit dem durch N-terminale Sequenzierung ermittelten Aminoterminus des endogenen Fragmentes L1-80 (Silletti *et al.*, 2000) (**Abb. 5.3 A**). Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass für die Prozessierung von L1 *in vivo* eine andere Protease verantwortlich ist. Die ersten im Rahmen dieses Teilprojektes durchgeführten Experimente hatten zum Ziel, die für die Entstehung des Fragmentes L1-140 *in vivo* verantwortliche Protease zu identifizieren. Sequenzvergleiche der Schnittstelle ergaben, dass aminoterminal



mehr von der Prohormonkonvertase PC5A als Substrat erkannt wird (Schnegelsberg, 2001). Eine Beteiligung der Prohormonkonvertasen PC1, PC2, PC4, PACE4 und PC7 konnte ausgeschlossen werden (s. 4.2.1.1).

Nicht nur für das Molekül L1, sondern auch für einige Integrin pro- $\alpha$ -Untereinheiten (Lissitzky *et al.*, 2000; Stawowy *et al.*, 2003; Bergeron *et al.*, 2003) und Proteine der *transforming growth factor receptor*  $\beta$ - Superfamilie (Ulloa *et al.*, 2001) konnten die Protease PC5A und mit einer geringeren Effizienz auch Furin als verantwortliche Enzyme für die regulierte Prozessierung dieser Proteine identifiziert werden. Die im Vergleich zu PC5A geringere Aktivität der Protease Furin gegenüber Molekülen wie L1 liegt vermutlich in der von Furin bevorzugten Erkennungs- und Spaltsequenz „RXXR↓“ bzw. „RX(R/K)R↓“ begründet (Thomas, 2002). Das in der dritten Fn-Domäne des Moleküls L1 identifizierte PC-Erkennungsmotiv unterscheidet sich von dem charakteristischen Furin-Spaltmotiv (**Abb. 5.3 B**). Dies führte zu der Vermutung, dass für die Spaltung der dritten Fn-Domäne *in vivo* die Protease PC5A und nicht Furin verantwortlich ist.

Ein weiteres Argument für den Ausschluss der Konvertase Furin an der Prozessierung des Moleküls L1 lieferte eine Analyse der Verteilung des Bruchstückes L1-140 in verschiedenen Regionen des Gehirns. Die Expression der Prohormonkonvertase PC5A im Zentralen Nervensystem zeigt eine gewebsspezifische Verteilung, die auf Neuropeptid-reiche Regionen wie den Kortex, den Hippocampus und den Hypothalamus beschränkt bleibt, wohingegen die Protease Furin ubiquitär in allen Bereichen des Gehirns exprimiert wird (Schafer *et al.*, 1993). Basierend auf diesen Informationen, wurden exemplarisch die Region des Hippocampus und des Kleinhirns nach dem Vorkommen des Bruchstückes L1-140 untersucht. Der Nachweis des löslichen Fragmentes in der Region des Hippocampus, jedoch nicht des Kleinhirns (s. 4.2.1.2) lieferte einen weiteren Beweis gegen die Beteiligung der Konvertase Furin und für die Verantwortlichkeit der Protease PC5A an der Prozessierung des Moleküls L1 *in vivo*.

Im Zentralen Nervensystem gehört der Hippocampus zu den Orten synaptischer Veränderungen. Proteolytische Modifikationen von Proteinen des synaptischen Spaltes sind ein Bestandteil des Regulationssystems des Prozesses der

Langzeitpotenzierung, der durch synaptische Plastizität charakterisiert wird. Auch das Zelladhäsionsmolekül L1, das in den Vorgang der synaptischen Plastizität involviert zu sein scheint (Luthi *et al.*, 1996), konnte im synaptischen Spalt lokalisiert werden (Matsumoto-Miyai *et al.* 2003). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne durch die Protease PC5A zu einer aktivitätsabhängigen Modulation des synaptischen Spaltes führen und sie somit für das mit dem Hippocampus verknüpfte räumliche Lernen eine essentielle Rolle spielen könnte. So scheint die Spaltung des Moleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne nicht nur die von den RGD-unabhängigen Bindungsmotiven vermittelten Funktionen negativ zu beeinflussen, sondern eröffnet dem Fragment L1-140 darüber hinaus die Möglichkeit in seiner Eigenschaft als lösliches Protein, in andere, bisher noch unbekannte, Funktionen einzugreifen und diese zu modulieren.

Darüber hinaus ist eine Bedeutung der Prozessierung von L1 durch die Protease PC5A für Verletzungen des peripheren Nervensystems und dem damit verbundenen Regenerationsprozess denkbar: Sowohl für das Molekül L1, für das bereits in zahlreichen Studien eine Beteiligung an dem Prozess der Regeneration gezeigt werden konnte (Zhang *et al.*, 2000), als auch für die Protease PC5A konnte eine verstärkte Expression in posttraumatischen Situationen nachgewiesen werden (Marcinkiewicz *et al.*, 1998).

Eine Beteiligung weiterer Proteasen an der Spaltung des Moleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne kann nicht ausgeschlossen werden. So sind in der Regel mehrere Proteasen in der Lage, ein einziges Substrat zu spalten, um einen möglichen Verlust des verantwortlichen Enzyms zu kompensieren.

**Die extrazelluläre Domäne des Moleküls L1 wird durch proteolytische Prozessierung in der Nähe des Membranankers gespalten, was zu der Entstehung des löslichen Fragmentes L1-180 führt.** Beer *et al.* konnten zeigen, dass in verschiedenen Tumorzelllinien eine Metalloprotease der ADAM-Familie an der Entstehung des Fragmentes L1-180 beteiligt ist (Beer *et al.*, 1999; Gutwein *et al.*, 2000). In weiterführenden Studien wurde die Protease ADAM 10 (s. 1.2.1.1) als für die Solubilisierung des Fragmentes L1-180 verantwortliche Protease identifiziert (Gutwein *et al.*, 2003). Sowohl die im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführten *in vitro* Proteolyseassays (s. 4.2.2.1), als auch die *in vivo* Inhibitorassays bestätigten (s. 4.2.2.3), dass auch im Zentralen Nervensystem eine Metalloprotease in die Freisetzung des Fragmentes L1-180 involviert ist. Eine Beteiligung von Serin- oder Cysteinproteasen an dem Vorgang des *Ectodomain Sheddings* konnte ausgeschlossen werden (s. 4.2.2.1, 4.2.2.3).

Die Freisetzung des löslichen Fragmentes L1-180 und dessen Integration in die EZM fördert die L1-abhängige Migration von Zellen (Mechtersheimer *et al.*, 2001). Der Prozess der Zellmigration wird vermutlich über eine Interaktion mit dem L1-Bindungspartner, der EZM-Komponente Neurocan (s. 1.4.2) vermittelt, die in einer Einbettung von L1-Bruchstücken in die EZM resultiert. In der EZM immobilisiertes L1 ist in der Lage an Integrine auf der Zelloberfläche von migrierenden Zellen zu binden und als attraktives Substrat zu dienen (Montgomery *et al.*, 1996; Mechtersheimer *et al.*, 2001). Nicht nur für physiologische Prozesse, sondern auch für pathologische Vorgänge wie der Metastasierung scheint die durch das Fragment L1-180 stimulierte Zellmigration von großer Bedeutung zu sein. Die Spaltung von membrangebundenen L1-Molekülen reduziert die Aggregation von Tumorzellen und erhöht so die Möglichkeit der Metastasierung (Rathjen und Schachner, 1984; Kowitz *et al.*, 1993). Wiederum ein Beispiel das verdeutlicht, wie wichtig die endogenen Regulationsmechanismen der für die Prozessierung von Transmembranproteinen verantwortlichen Proteasen sind. Eine Disregulation der Enzyme führt ebenso wie in dem Fall von NCAM zu einer unkontrollierten Spaltung des Zelladhäsionsmoleküls L1, die die Integrität eines Organismus massiv bedrohen kann.

Wie bereits für zahlreiche Transmembranproteine wie dem *pro-transforming growth factor* TGF $\alpha$ , *L-selectin*, *pro-neuregulin-alpha 2c*, der *receptor tyrosine kinase A*, des *amyloid precursor proteins* und NCAM (s. 4.1.2.1) gezeigt werden konnte, stimulieren Calmodulininhibitoren das *Ectodomain Shedding* dieser Proteine (Diaz-Rodriguez *et al.*, 2000; Annabi *et al.*, 2001). Auch die Prozessierung des Moleküls L1 und die Entstehung des Fragmentes L1-180 wird von dem Kalziumsensor Calmodulin negativ beeinflusst (s. 4.2.2.3). So scheint die regulierte Spaltung von Transmembranproteinen im allgemeinen durch kalziumionenvermittelte intrazelluläre Signaltransduktionsvorgänge moduliert zu

werden. Das Neuritenwachstum zählt zu den von L1-vermittelten Funktionen, für die Kalziumionen essentiell sind. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Prozessierung der extrazellulären Domäne des Moleküls und deren Freisetzung essentiell für das L1-abhängige Neuritenwachstum ist. In Anwesenheit des Metalloproteaseinhibitors GM 6001, der eine inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung des Fragmentes L1-180 ausübt (s. 4.2.2), konnte eine Reduktion des L1-induzierten Neuritenwachstums um mehr als 40 % nachgewiesen werden (s. 4.2.2.4). Die Prozessierung neuraler Zelladhäsionsmoleküle scheint für den Prozess des Neuritenwachstums von essentieller Bedeutung zu sein. Nicht nur die Prozessierung des Zelladhäsionsmoleküls NCAM (s. 4.1.3.2), sondern auch lösliche Fragmente des Moleküls CHL-1 (Naus *et al.*, 2004) und des Proteins DCC (Galko und Tessier-Lavigne, 2000) sind in den Prozess des Neuritenwachstums involviert. Der posttranslationale Mechanismus der regulierten Prozessierung eröffnet einer Nervenzelle die Möglichkeit, die für den Prozess des Neuritenwachstums charakteristischen massiven und sehr kurzfristigen Modulationen von Zelloberflächenproteinen zu gewährleisten.

**Die Spaltung des Fragmentes L1-180 fördert die Freisetzung des löslichen, jedoch weiterhin membranassoziierten Fragmentes L1-140.** In *in vitro* *Proteolyseassays* führte die Inhibition der Spaltung der extrazellulären Domäne des Moleküls L1 auch zu einer reduzierten Freisetzung des löslichen Fragmentes L1-140 (s. 4.2.2.1). Die Spaltung des L1-200 in der Nähe des Membranankers schien die Freisetzung des Bruchstückes L1-140 positiv zu beeinflussen. Dies führte zu der Hypothese, dass das lösliche Fragment L1-140 über die Bildung eines Heterodimers mit einem membranständigen L1-Molekül zunächst mit der Membran assoziiert bleibt. Erst durch die Spaltung des L1-200 in ein lösliches Fragment L1-180 und einen komplementären Membranstumpf wird es möglicherweise von der Membran gelöst.

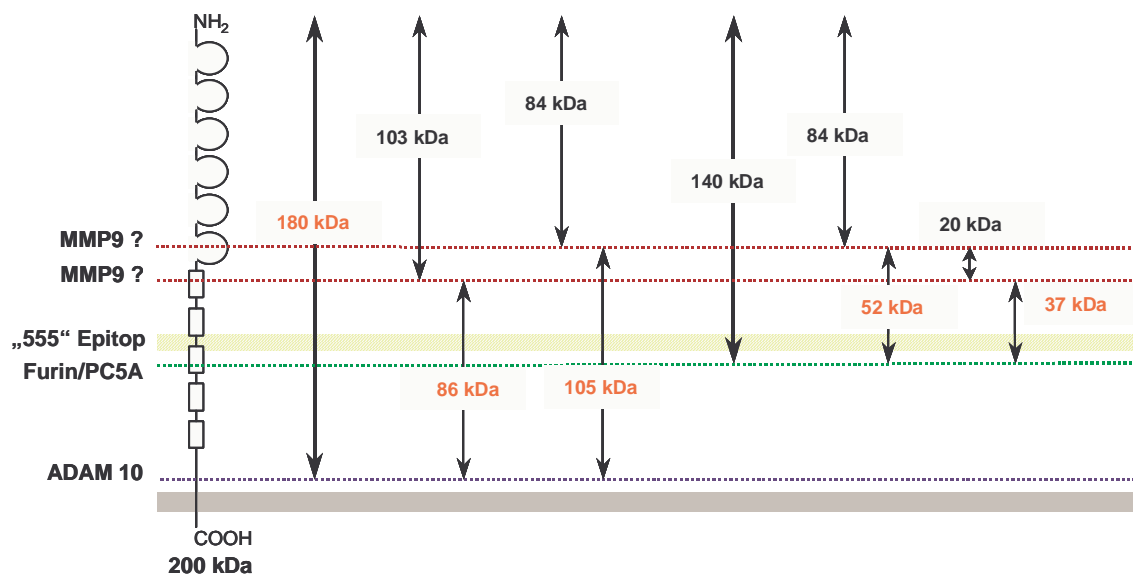
In Dichtegradientenzentrifugationsstudien wurde bestätigt, dass das Molekül L1 in der Membran in der Regel als Homo- bzw. Heterodimer bestehend aus L1-200 und L1-140 vorliegt. Nach der Spaltung des membranständigen L1-200 zerfällt der Komplex des Heterodimers. Die Fragmente L1-180 und L1-140 konnten in der

untersuchten „löslichen“ Fraktion als Monomere nachgewiesen werden (s. 4.2.2.2).

Die Dimerisierung von Zelladhäsionsmolekülen dient oftmals zur Regulation der von ihnen vermittelten Funktionen und konnte bereits für zahlreiche Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (s. 1.4) wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) (Jun *et al.*, 2001), Tractin (Jie *et al.*, 2000), JAM (*junctional adhesion molecule*) (Kostrewa *et al.*, 2001) und C-CAM (*cell-cell adhesion molecule*) (Hunter *et al.*, 1996) gezeigt werden. Vergleichbar mit L1 wird auch das Zelladhäsionsmolekül Tractin sowohl innerhalb der extrazellulären Domäne als auch in der Nähe des Membranankers gespalten. Die resultierenden löslichen Fragmente, sowie die in der Membran verbleibenden Proteinstümpfe können als Dimere nachgewiesen werden (Jie *et al.*, 2000). Auch das JAM existiert in Form eines Dimers, das über eine trans-Interaktion mit zwei weiteren JAM-Molekülen einer gegenüberliegenden Zelle die homophile Interaktion der Proteine reguliert. In dem Fall von ICAM-1 fördert die Dimerisierung die Interaktion mit einem Bestandteil der EZM, den Integrinen (Jun *et al.*, 2001). Nicht nur bei der Regulation der Prozessierung, sondern auch bei der Bildung von Dimeren spielen Kalziumionen und der Kalziumsensor Calmodulin eine große Rolle. So beeinflussen Kalziumionen und Calmodulin die Dimerisierung des Proteins C-CAM (Hunter *et al.* 1996).

**Das Zelladhäsionsmolekül L1 scheint über die bereits bekannten Schnittstellen hinaus zusätzlich prozessiert zu werden.** Überraschenderweise konnten im Rahmen dieser Arbeit weitere lösliche Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls L1 nachgewiesen werden, zu denen unter anderem ein lösliches Fragment mit einem Molekulargewicht von 80 kDa zählt (s. 4.2.3). Das Molekül L1 scheint über eine Spaltung in der dritten Fibronektindomäne und in der Nähe des Membranankers hinaus, an weiteren Stellen innerhalb seiner extrazellulären Domäne gespalten zu werden. Sequenzvergleiche mit möglichen putativen Proteaseerkennungsmotiven und -spaltstellen führten zu der Identifizierung von zwei, in der sechsten sowie in der ersten Fibronektindomäne, lokalisierten Erkennungsmotiven der Matrixmetalloprotease MMP9 (s. 1.2.1.2) (**Abb. 5.4**, 4.2.3.1). *In vitro* Proteolyseassays rekombinanter L1-Fragmente in

Anwesenheit der Protease MMP9 zeigten, dass die Protease vermutlich in der Lage ist, das Molekül L1 in der ersten Fibronektindomäne, jedoch nicht in der, in den Ig-Domänen 1 - 6 lokalisierten, zweiten putativen MMP9-Schnittstelle zu spalten. Die Bedeutung der Protease MMP9 für die Prozessierung von L1 *in vivo* konnte bisher nicht gezeigt werden. Ein Vergleich der in Gehirnhomogenaten von MMP9-defizienten Mäusen und Wildtyptieren vorkommenden L1-Fragmente führte zu keinem Ergebnis.



**Abb. 5.4:** Übersicht über die durch Prozessierung des Moleküls L1 in der sechsten Ig-Domäne und ersten Fn-Domäne von der Protease MMP9 generierten putativen löslichen L1-Fragmente. Die Spaltung des Fragmentes L1-180 in der ersten Fibronektindomäne führt zu der Generierung eines löslichen Bruchstückes mit einem Molekulargewicht von 80 kDa.

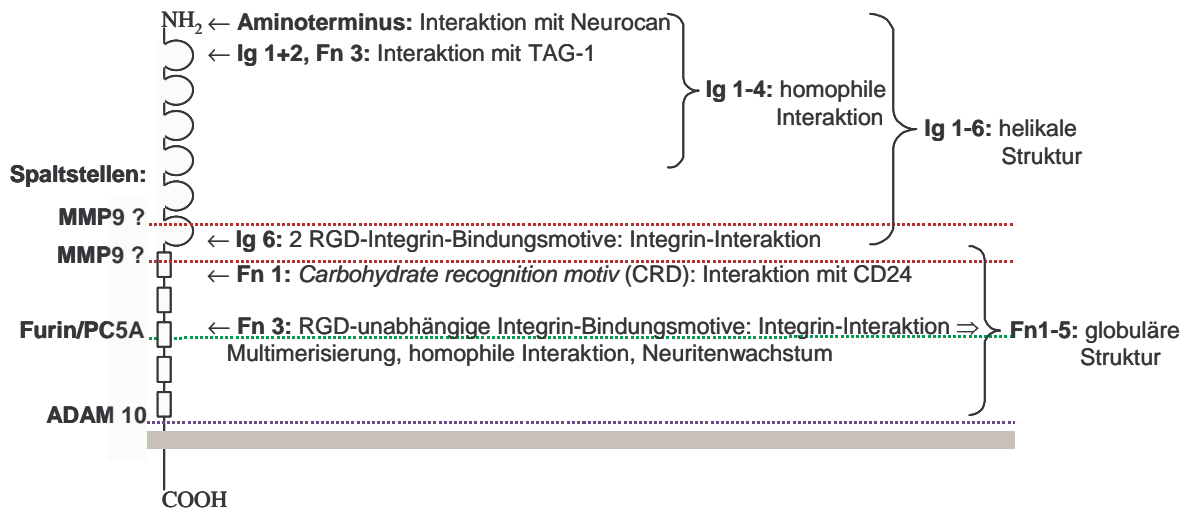
Die Matrixmetalloprotease MMP9, auch als Gelatinase-B bezeichnet, rückte zunächst durch ihre Beteiligung an der neurodegenerativen Erkrankung der Multiplen Sklerose in den Blickpunkt der Forschung (s. 1.3) (Cossins *et al.*, 1997). MMP9 ist jedoch nicht nur in pathologische Prozesse, sondern auch in die Entwicklung des Nervensystems involviert. So konnten Oh *et al.* zeigen, dass MMP9 für die Ausbildung von Fortsätzen durch Oligodendrozyten, die einen initiiierenden Schritt bei der Myelinisierung von Neuronen darstellt, essentiell ist (Oh *et al.*, 1999). Darüber hinaus fördert die Protease durch den Abbau von Bestandteilen der extrazellulären Matrix die Migration von Vorläuferzellen (Maidment *et al.*, 1997), was sich unter pathologischen Bedingungen durch eine Disregulation der Protease in einen negativen Effekt, der sich z.B. durch die Metastasierung von Tumorzellen äußert, umkehren kann. Im adulten Organismus

wird der Protease MMP9 eine Beteiligung an der aktivitätsabhängigen Modulation von Proteinen des synaptischen Spaltes in der Region des Hippocampus zugeordnet (Szklarczyk *et al.*, 2002). Weiterhin ist die Protease MMP9 in der Lage das in die EZM sezernierte neurotoxische Fragment des Proteins APP *amyloid- $\beta$*  zu spalten (Backstrom *et al.*, 1996). MMP9 spielt darüber hinaus eine Rolle bei der Regeneration des peripheren Nervensystems durch den Abbau inhibitorischer Substanzen in der Umgebung des geschädigten Gewebes (Ferguson und Muir, 2000). Die Prozessierung der extrazellulären Domäne von L1 durch die Protease MMP9 ist vermutlich ein stark regulierter Prozess, der auf die Entwicklung des Nervensystems, aktivitätsabhängige Vorgänge wie der synaptischen Plastizität oder die Regeneration des Nervensystems beschränkt bleibt. Ein Nachweis der von der Protease MMP9 generierten L1-Fragmente ist somit in adulten und gesunden MMP9-defizienten Tieren kaum möglich.

**Das Zelladhäsionsmolekül L1: ein Multidomänenprotein, dessen Funktionen durch regulierte Prozessierung moduliert werden können.** L1 ist in zahlreiche Prozesse des sich entwickelnden und adulten Nervensystems involviert (s. 1.4.2) Diese Funktionen werden über verschiedenste Domänen des Moleküls und deren Interaktionspartner vermittelt (**Abb. 5.5**). Die Prozessierung der extrazellulären Domäne des Proteins führt zu der Generation von L1-Fragmenten, die charakterisiert durch ihre Aminosäuresequenz und den damit verbundenen funktionellen Domänen das Potential tragen, voneinander verschiedene Funktionen ausüben zu können. So kann auf der einen Seite die Spaltung des Moleküls, wie es für die dritte Fibronektindomäne gezeigt werden konnte (Silletti *et al.*, 2000), zu der Zerstörung eines funktionellen Motivs, in diesem Fall des RGD-unabhängigen Integrinbindungsmotivs, und somit zu einer negativen Regulation der von der Domäne ausgeübten Funktion führen. Auf der anderen Seite kann die Prozessierung des extrazellulären Anteils eine Konformationsänderung einzelner Domänen des Proteins zur Folge haben, die in einer Freilegung, aber auch in der Maskierung möglicher Bindungsstellen für Interaktionspartner resultiert.

Die durch regulierte Prozessierung entstandenen Fragmente L1-180 und L1-140 gewinnen als lösliche, aber auch in die extrazelluläre Matrix integrierte Proteine

eine neue Bedeutung. Auf der einen Seite ermöglicht die Abspaltung der extrazellulären Domäne des Zelladhäsionsmoleküls die Lösung einer verankerten Zelle aus einem Zellverband und bietet somit die Voraussetzung für den Prozess der Zellmigration. Auf der anderen Seite ist das lösliche Fragment in der Lage,



**Abb. 5.5: Das Molekül L1 und seine verschiedenen funktionellen Domänen.** In der sechsten Ig-Domäne des Moleküls befinden sich zwei RGD-Bindungsmotive, die eine Bindung mit Integrinen vermitteln (Montgomery *et al.*, 1996). Darüber hinaus ist L1 in der Lage, auch über die dritte Fibronektindomäne über zwei RGD-unabhängige Integrin-Bindungsmotive mit Integrinen zu interagieren (Silletti *et al.*, 2000). Weiterhin ist in der ersten Fibronektindomäne ein *carbohydrate recognition motif* (CRD) lokalisiert, das eine Interaktion mit dem Protein CD24 ermöglicht (Kleene *et al.*, 2001). Die Interaktion mit dem Molekül Neurocan wird über die ersten Ig-Domänen vermittelt (Oleszewski *et al.*, 2000), wohingegen an der Bindung an TAG-1 zusätzlich die dritte Fibronektindomäne beteiligt ist (Kunz *et al.*, 1998).

durch die Ausbildung von attraktiven Gradienten als eine Art Chemokin oder *Guidance*-Molekül zu fungieren und als richtungsweisendes EZM-Molekül das Neuritenwachstum sowie die Zellmigration zu beeinflussen. Durch die Interaktion mit einem der zahlreichen Bindungspartner von L1 auf der Zelloberfläche von migrierenden Zellen, können Signaltransduktionswege aktiviert und moduliert werden. Die Spaltung des Moleküls L1 ist nicht nur abhängig von verschiedenen Regionen des Gehirns, sondern scheint möglicherweise auch auf der Oberfläche einer einzigen Zelle differentiell und in Abhängigkeit der jeweiligen funktionellen Anforderungen reguliert zu sein.

Die Prozessierung von Zelladhäsionsmolekülen im allgemeinen und die des Moleküls L1 im besonderen, ermöglicht in einem sehr hohen Maße die Modulation der Funktion des Proteins, das durch diese posttranslationale Modifikation von

einem Zelladhäsionsmolekül mit einem „auto-,“ oder „parakrinen“ Wirkungsmechanismus in ein Bestandteil der EZM mit weitreichenden und nicht nur auf eine einzige Zelle und ihre Umgebung beschränkten Einfluss umgewandelt werden kann.

**Die intrazelluläre Domäne des Zelladhäsionsmoleküls L1 wird durch Spaltung in der Transmembrandomäne solubilisiert und in den Zellkern transportiert.** In den vergangenen Jahren gewann ein neuer Mechanismus der Weiterleitung von Signalen aus der Umgebung an das Innere einer Zelle zunehmend an Bedeutung. Im Gegensatz zu der bisherigen Hypothese, dass die Übertragung von Einflüssen und Stimuli aus dem Umfeld einer Zelle über Rezeptoren in der Plasmamembran und die Weitergabe an das Innere einer Zelle mittels *second messenger*-Systemen erfolgt, werden die von aktivierten Membranrezeptoren aufgenommenen Signale durch die regulierte Proteolyse des Rezeptormoleküls in der Transmembrandomäne weitergeleitet. Der auch als *regulated intramembrane proteolysis*, kurz RIP, bezeichnete Vorgang führt zu der Entstehung intrazellulärer von der Membran gelöster bioaktiver Fragmente (Brown *et al.*, 2000) und stellt eine völlig neue Dimension der Signaltransduktion dar.

Der nach der Abspaltung des extrazytosolischen - des luminalen oder extrazellulären - Proteinanteils eines Transmembranproteins entstandene Membranstumpf dient als Substrat für *intramembrane-cleaving proteases* (iCLiPs). Als an der regulierten Spaltung von Proteinen in der Transmembrandomäne beteiligte Proteasen konnten sowohl Aspartyl-, Metallo- und Serinproteasen identifiziert werden (Kopan und Ilagan, 2004). Für die Spaltung von Membranproteinen des Typs 1 wie z.B. Notch (Annaert und De Strooper, 1999; Chan und Jan, 1999) und APP (Ho und Sudhof, 2004; Cao und Sudhof, 2001) ist die sogenannte, den Aspartylproteasen zugehörige,  $\gamma$ -Sekretase verantwortlich. ErbB-4 (Lee *et al.*, 2002), *Syndecan 3* (Schulz *et al.*, 2003), *E-cadherin* (Marambaud *et al.*, 2002), CD 44 (Murakami *et al.*, 2003), *p75 neurotrophin receptor* (Jung *et al.*, 2003) und *nectin 1 $\alpha$*  (Kim *et al.*, 2002) können als weitere Substrate der  $\gamma$ -Sekretase angeführt werden.

Das Zelladhäsionsmolekül L1 zählt ebenfalls zu der Gruppe der Typ 1 Membranproteine und wird durch die Spaltung seiner extrazellulären Domäne in der Nähe des Membranankers moduliert. Dies implizierte die Überlegung, ob möglicherweise auch der durch *Ectodomain Shedding* resultierende Membranstumpf des Moleküls L1 von einer Transmembranprotease gespalten werden kann. Zur Beantwortung dieser Frage, wurden *in vitro Proteolyseassays* durchgeführt, die zeigten, dass in Anwesenheit eines Aspartylproteaseinhibitors und des spezifischen  $\gamma$ -Sekretaseinhibitors DAPT die Entstehung eines löslichen Fragmentes von 15 kDa, das mit dem berechneten Molekulargewicht der intrazellulären Domäne des L1-Moleküls übereinstimmt, inhibiert werden kann (s. 4.2.4). Daraus folgte, dass das Molekül L1 vermutlich in der Transmembrandomäne gespalten wird, was in einer Freisetzung eines Fragmentes von etwa 15 kDa resultiert.- Der Nachweis der solubilisierten intrazellulären Domäne eines Transmembranproteins ist, wie in dem Fall des *amyloid precursor proteins*, oftmals dadurch erschwert, dass das intrazelluläre Fragment, sofern es nicht durch die Interaktion mit einem Bindungspartner stabilisiert wird, in der Zelle in sehr kurzer Zeit durch Enzyme des Proteasoms abgebaut wird. Der Effekt des Proteasomeninhibitors MG-132, für den in den *Proteolyseassays* eine massive Akkumulation des Fragmentes nachgewiesen werden konnte (s. 4.2.4), untermauerte die bisher beschriebenen Ergebnisse.

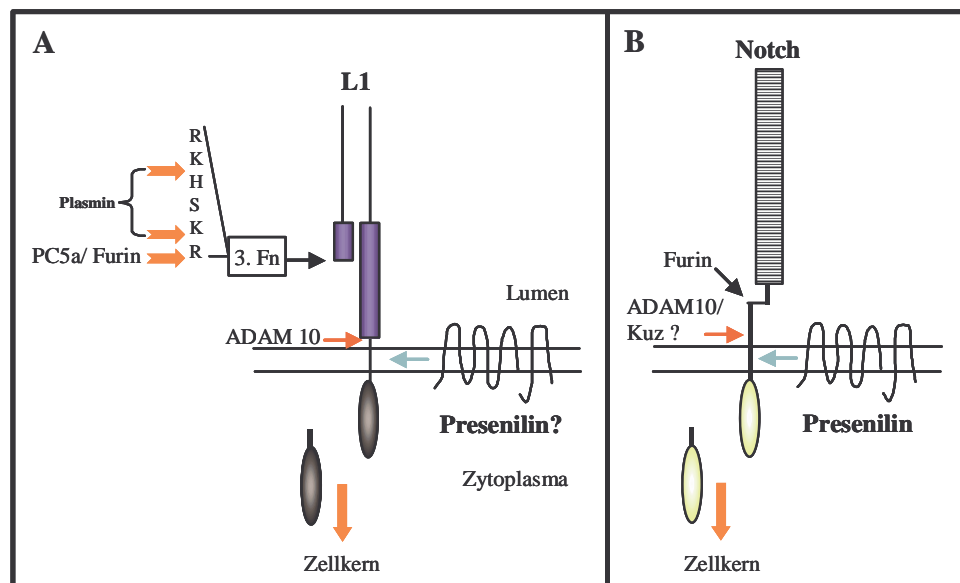
Die Abspaltung der extrazellulären Domäne eines Transmembranproteins ist die Voraussetzung für die Eigenschaft eines Substrates der iCLiPs. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition des *Ectodomain Sheddings* von L1 in einer massiven Reduktion des L1-vermittelten Neuritenwachstums resultiert (s. 4.2.2.4). Möglicherweise ist für die Vermittlung des L1-abhängigen Neuritenwachstums, das *Ectodomain Shedding* des Moleküls L1 lediglich der initiierende Schritt einer durch die Spaltung in der Transmembrandomäne ausgelösten Signaltransduktionskette ist. Diese Vermutung wurde durch das Ergebnis bestätigt, dass der spezifische  $\gamma$ -Sekretaseinhibitor DAPT, der die Entstehung des 15 kDa-Fragmentes inhibiert (s. 4.2.4), einen negativen Einfluss auf das L1-abhängige Neuritenwachstum zeigt (s. 4.2.4.1). Das Ergebnis führte zu der Frage, welche Funktion die lösliche

intrazelluläre Domäne von L1 im Zytoplasma einer Zelle ausübt und wie sie Einfluss auf den von L1-vermittelten Prozess des Neuritenwachstums nehmen kann. In einer Vielzahl der bereits untersuchten Substrate der iCLiPs wie z.B. APP und Notch wurde gezeigt, dass die durch den Mechanismus des RIP von der Membran gelösten zytoplasmatischen Domänen der Proteine nach ihrer Freisetzung in den Zellkern transportiert werden und dort an der Regulation der Transkription von Genen beteiligt sind (Kopan und Ilagan, 2004).- Führt auch die Spaltung des Membranstumpfes, der durch *Ectodomain Shedding* der extrazellulären Domäne von L1 entsteht, und der daraus folgenden Freisetzung der zytoplasmatischen Domäne, zur Entstehung eines in Signaltransduktionsprozesse involvierten und möglicherweise an Regulationsvorgängen im Zellkern beteiligten Mediators? Basierend auf den Ergebnissen von Immunpräzipitationsexperimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass ein Fragment von 15 kDa aus Zellkernextrakten mit Hilfe des anti-L1-Antikörpers 2c2 präzipitierbar ist (s. 4.2.4.2), lag die Vermutung nah, dass auch die solubilisierete intrazelluläre Domäne L1-ICD in den Zellkern transportiert wird. Die Kernlokalisierung des Proteins L1 wurde durch die immunhistochemische Analyse von Zellen der Neuroblastomazelllinie Neuro 2a unterstützt (s. 4.2.4.2).

Die Natur bedient sich des posttranslationalen Mechanismus der regulierten Proteolyse von Transmembranproteinen um die Diversität und somit auch die Vielfältigkeit der Funktionen dieser Proteine in einem großen Maße zu erhöhen. Die Modulation der extrazellulären Domäne eines Proteins durch regulierte Prozessierung, der daraus resultierenden Spaltung in der Transmembrandomäne und die Freisetzung der intrazellulären Domäne scheint ein fundamentaler Prozess zu sein. So weisen die Ergebnisse dieser Arbeit starke Parallelen zu der regulierten Prozessierung des Proteins Notch auf (**Abb. 5.6**): Notch besitzt ähnlich wie L1 eine Prohormonkonvertaseschnittstelle in seiner extrazellulären Domäne. Bereits vor dem Erreichen der Plasmamembran wird das Protein von der Konvertase Furin in der Spaltstelle S1 geschnitten (Logeat *et al.* 1998), was zu der Entstehung eines extrazellulären Fragmentes führt, dass über eine Kalziumionen vermittelte Interaktion mit dem resultierenden Membranstumpf

assoziiert bleibt (Selkoe und Kopan, 2003). Auch das Fragment L1-140, das durch Prozessierung in der dritten Fibronektindomäne des L1-Moleküls unter Beteiligung der Prohormonkonvertase PC5A generiert wird, verbleibt durch die Ausbildung eines Heterodimers mit einem membranständigen L1-200 zunächst an der Membran. Die Ligandenbindung an den heterodimeren Notchrezeptor hat eine Konformationsänderung zur Folge, die in einer Präsentation der zweiten, einer Metalloprotease-sensitiven Spaltstelle in der Nähe des Membranankers

Abb. 5.6:  
Parallelen in der regulierten Prozessierung der Proteine L1 (A) und Notch (B).



resultiert. Neben der den ADAMs zugehörigen Metalloprotease ADAM17 / TACE wird auch der Protease ADAM10 / Kuzbanian eine Rolle bei diesem Schritt der Notch-Prozessierung zugeordnet (Parks *et al.*, 2000). Die Protease ADAM 10 ist auch an der Prozessierung der extrazellulären Domäne von L1 beteiligt. Das Liganden-induzierte *Ectodomain Shedding* der extrazellulären Domäne des Proteins Notch initiiert die Spaltung des Proteins in der Membran durch die den iCLiPs zugehörigen  $\gamma$ -Sekretase (Struhl und Adachi, 1998; Struhl und Greenwald, 1999; De Strooper *et al.*, 1999). Auch der durch Freisetzung des Fragmentes L1-180 entstehende Membranstumpf scheint von einer Aspartylprotease des  $\gamma$ -Sekretase-Typs gespalten zu werden. Die in der freigesetzten intrazellulären Domäne von Notch lokalisierten *nuclear localizing signals* (NLS) unterstützen den Transport des Fragmentes in den Zellkern, wo es die Funktion des DNS-bindenden Proteins CSL (*C-promoter-binding factor* / *recombination signal-sequence binding protein* / *Suppressor of Hairless* / *Lag-1*) moduliert und durch

Bindung an dieses einen Repressor in einen Aktivator der Transkription umwandelt (Mumm und Kopan, 2000; Kopan, 2002). Erste Versuche zeigen, dass auch die intrazelluläre Domäne von L1 in den Zellkern transportiert wird. So bleiben am Ende dieser Arbeit folgenden Fragen offen: Welche Regulationsmechanismen liegen der Spaltung des Proteins L1 in seiner Transmembrandomäne zugrunde? Sind an dem Transport der L1-ICD in den Zellkern stabilisierende Proteine, wie bereits für APP und Notch gezeigt werden konnte (Kopan und Ilagan, 2004), beteiligt? Ist das zytoplasmatische Fragment L1-ICD in der Lage im Zellkern, in die Regulation von Genen einzugreifen? Wenn ja, kommt es zu einer direkten Interaktion der zytoplasmatischen Domäne mit regulatorischen Elementen der DNS oder wird die DNS-Bindung über eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren vermittelt? Welche Gene werden von der intrazellulären Domäne von L1 in ihrer putativen Eigenschaft als Transkriptionsfaktor reguliert?

## 6 Zusammenfassung

Zahlreiche Transmembranproteine existieren auch als lösliche Fragmente, die durch regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne dieser Moleküle entstehen. Auch für die Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1, die in zahlreiche essentielle Funktionen des sich entwickelnden sowie adulten Nervensystems involviert sind, wurde das Vorkommen löslicher Fragmente bestätigt.

Die Entstehung löslicher Fragmente des Zelladhäsionsmoleküls NCAM mit einem Molekulargewicht von 110 kDa - 190 kDa konnte bisher nur partiell aufgeklärt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese bestätigt, dass lösliche Fragmente des Moleküls NCAM durch regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne entstehen. Die Metalloprotease ADAM17 / TACE ist in der Lage, die membranständigen Isoformen NCAM140 und NCAM180 in der Nähe des Membranankers zu spalten und in Abhängigkeit des Glykosylierungsmusters des Proteins, Fragmente mit einem Molekulargewicht von 110 kDa und größer von der Membran zu lösen. Die Spaltung der extrazellulären Domäne des GPI-verankerten NCAM120 basiert dagegen auf einem anderen Mechanismus. Der Metalloproteaseinhibitor GM 6001 zeigt einen inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung von löslichen NCAM-Fragmenten. Der darüber hinaus negative Effekt des Metalloproteaseinhibitors auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum, weist auf eine bedeutende funktionelle Rolle der regulierten Prozessierung des Proteins NCAM hin, die unter anderem durch Modulationen des Aktinzytoskeletts reguliert wird. Auch der Calmodulininhibitor CGS 9343 B, der die Freisetzung löslicher NCAM-Fragmente stimuliert, zeigt einen inhibitorischen Effekt auf den Prozess des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums. Ob der durch Calmodulin vermittelte Einfluss auf das NCAM-abhängige Neuritenwachstum auf einer direkten Interaktion mit seinem Bindungspartner NCAM basiert, bleibt zu klären.

Zusätzlich zu der membrangebundenen 200 kDa Form des L1-Moleküls können auch lösliche L1-Fragmente nachgewiesen werden, die durch regulierte Prozessierung der extrazellulären Domäne des Moleküls entstehen. Im Rahmen

dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass an der Spaltung des Moleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne und der Freisetzung des löslichen Fragmentes L1-140 die Prohormonkonvertase PC5A beteiligt ist. Eine Beteiligung der Prohormonkonvertasen Furin, PC1, PC2, PACE4 und PC7 an der Prozessierung von L1 kann ausgeschlossen werden. Das Fragment L1-140 ist im Hippocampus, jedoch nicht im Kleinhirn nachweisbar, was basierend auf dem Expressionsmuster der Konvertase PC5A die Verantwortlichkeit der Protease für die Prozessierung von L1 bestätigt. Das Fragment L1-140 verbleibt nach seiner Entstehung durch die Ausbildung eines Heterodimers mit einem membranständigen L1-200 membranassoziiert und wird erst durch die Spaltung seines „Interaktionspartners“ von der Membran gelöst. Dies führt zu einer Dissoziation des Komplexes und zu der Freisetzung der löslichen Fragmente L1-180 und L1-140. Für die Spaltung der extrazellulären Domäne des Moleküls L1 in der Nähe des Membranankers, die durch den Kalziumsensor Calmodulin negativ beeinflusst wird, ist eine Metalloprotease verantwortlich. Der Einfluss des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 auf das L1-vermittelte Neuritenwachstum weist auf eine bedeutende Rolle des *Ectodomain Sheddings* des Moleküls für das L1-vermittelte Neuritenwachstum hin. Im Rahmen dieser Studie wurden darüber hinaus weitere lösliche Fragmente des Moleküls L1 nachgewiesen, die auf zusätzliche Schnittstellen in der extrazellulären Domäne von L1 hinweisen. Die Metalloprotease MMP9 scheint an der Prozessierung und Freisetzung dieser Fragmente beteiligt zu sein. Zahlreiche Transmembranproteine werden zusätzlich zu einer Proteolyse der extrazellulären Domäne in ihrer Transmembrandomäne gespalten. Die Voraussetzung für diesen Prozess ist die Abspaltung der extrazellulären Domäne eines Moleküls durch regulierte Prozessierung eines Proteins in der Nähe des Membranankers. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein lösliches L1-Fragment von 15 kDa durch eine Spaltung in der Transmembrandomäne von der Plasmamembran gelöst und in den Zellkern transportiert wird. Die Funktion des zytoplasmatischen L1-Fragmentes im Zellkern und eine mögliche Beteiligung an der Regulation der Transkription von Genen sind Fragen, die zu klären bleiben.

## 6.1 Schlüsselwörter

Zentrales Nervensystem – neuronale Zelladhäsionsmoleküle – NCAM – L1 – Prozessierung – Prohormonkonvertasen – PC5A – Metalloproteasen – ADAM17 / TACE – Calmodulin – Bindungspartner von NCAM – Aktinzytoskelett – Neuritenwachstum – regulierte Spaltung in der Transmembrandomäne – zytoplasmatische Domäne von L1 – Kernlokalisierung

Aus dieser Studie hervorgegangene Publikationen:

- Kalus, I., Schnegelsberg, B., Seidah, N. G., Kleene, R., Schachner, M.: The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1 (2003). *J. Biol. Chem.* 279 (12), 10381 – 10388
- Kalus, I., Bormann, U., Schulze, C., Kleene, R., Schachner, M.: The proteolytical cleavage of transmembraneous NCAM by ADAM 17 is involved in neurite outgrowth which is regulated by Calmodulin (in preparation)

## 7 Summary

A variety of different membrane proteins also occur as a circulating, soluble form. These soluble forms are often derived from the membrane forms by proteolysis. Different soluble fragments of the transmembrane and multidomain neural cell adhesion molecules NCAM and L1 playing important functional roles in the developing and adult nervous system have been detected.

The mechanism of generation of soluble NCAM fragments with a molecular range of 110 kDa to 190 kDa is poorly understood. In this study, evidence was presented that a metalloprotease is able to solubilize NCAM fragments via proteolytic processing. A member of the ADAM family of metalloproteases, the TNF $\alpha$  converting enzyme (TACE) cleaves the NCAM isoforms NCAM140 and NCAM180 near their membrane anchors resulting in the release of soluble NCAM fragments with a molecular weight of 110 kDa and higher depending on the glycosylation state of the extracellular domain of NCAM. The extracellular domain of the GPI-linked isoform NCAM120 is liberated from the membrane via a different mechanism. The metalloprotease inhibitor GM 6001 reduces the release of soluble NCAM fragments. Its inhibitory effect on NCAM dependent neurite outgrowth of cerebellar explants indicates that the proteolytic processing of NCAM plays an important role for NCAM dependent neurite outgrowth. Further evidence for an essential role of the ectodomain shedding of NCAM for the process of NCAM dependent neurite outgrowth was obtained in experiments showing that the calmodulin inhibitor CGS 9343 B which is able to stimulate the cleavage of membrane bound NCAM isoforms, inhibits NCAM dependent neurite outgrowth. Whether the effect of calmodulin on NCAM dependent neurite outgrowth is mediated via a direct interaction with its binding partner NCAM remains to be clarified.

The cell adhesion molecule L1 is proteolytically processed at two distinct sites within the extracellular domain, leading to the generation of different soluble fragments. Evidence was presented that the proprotein convertase PC5A is the protease that cleaves L1 in the third fibronectin type III domain, whereas the

proprotein convertases furin, PC1, PC2, PACE4, and PC7 are not effective in cleaving L1. This fragment was present in the hippocampus, which expresses PC5A, but was not detectable in the cerebellum, which does not express PC5A. The 140 kDa L1 fragment was found to be tightly associated with the full-length 200 kDa L1 molecule. The complex dissociated from the membrane upon cleavage by a protease acting at a more membrane-proximal site of full-length L1. This proteolytic cleavage was inhibited by the metalloprotease inhibitor GM 6001 and enhanced by a calmodulin inhibitor. L1-dependent neurite outgrowth of cerebellar neurons was inhibited by GM 6001, suggesting that proteolytic processing of L1 by a metalloprotease is involved in neurite outgrowth. In this study, it was shown that L1 is processed at further proteolytic cleavage sites in its extracellular domain resulting in the release of additional soluble fragments. The metalloprotease MMP9 seems to be one of the responsible proteases involved in this process. A lot of transmembrane proteins were identified to be additionally cleaved within their transmembrane domains. The ectodomain shedding of the extracellular domain is the initial step for regulated intramembranous proteolysis. A 15 kDa fragment recognized by an antibody directed against the intracellular domain of L1 is released from the plasma membrane into the cytoplasm via proteolysis and transported to the nucleus. The question whether the intracellular domain of L1 located in the nucleus is involved in regulation of gene transcription is currently under investigation.

## 7.1 Keywords

central nervous system – neural cell adhesion molecule – NCAM – L1 – processing – prohormon convertase – PC5A – metalloprotease – ADAM17 / TACE – calmodulin – interaction partner of NCAM – actin cytoskeleton – neurite outgrowth – regulated intramembranous proteolysis (RIP) – L1-ICD (intracellular domain) – nuclear localization

## 8 Literatur

Alexander, K.A., B.M.Cimler, K.E.Meier, and D.R.Storm. 1987. Regulation of calmodulin binding to P-57. A neurospecific calmodulin binding protein. *J. Biol. Chem.* 262:6108-6113.

Annabi, B., A.Pilorget, N.Bousquet-Gagnon, D.Gingras, and R.Beliveau. 2001. Calmodulin inhibitors trigger the proteolytic processing of membrane type-1 matrix metalloproteinase, but not its shedding in glioblastoma cells. *Biochem. J.* 359:325-333.

Annaert, W. and B.De Strooper. 1999. Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction. *Trends Neurosci.* 22:439-443.

Appel, F., J.Holm, J.F.Conscience, H.F.Bohlen Und, A.Faissner, P.James, and M.Schachner. 1995. Identification of the border between fibronectin type III homologous repeats 2 and 3 of the neural cell adhesion molecule L1 as a neurite outgrowth promoting and signal transducing domain. *J. Neurobiol.* 28:297-312.

Appel, F., J.Holm, J.F.Conscience, and M.Schachner. 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.

Asou, H., M.Miura, M.Kobayashi, K.Uyemura, and K.Itoh. 1992. Cell adhesion molecule L1 guides cell migration in primary reaggregation cultures of mouse cerebellar cells. *Neurosci. Lett.* 144:221-224.

Ausubel, L.J., C.K.Kwan, A.Sette, V.Kuchroo, and D.A.Hafler. 1996. Complementary mutations in an antigenic peptide allow for crossreactivity of autoreactive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:15317-15322.

Backstrom, J.R., G.P.Lim, M.J.Cullen, and Z.A.Tokes. 1996. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J. Neurosci.* 16:7910-7919.

Bauvois, B. 2001. Transmembrane proteases in focus: diversity and redundancy? *J. Leukoc. Biol.* 70:11-17.

Becker, C.G., A.Artola, R.Gerardy-Schahn, T.Becker, H.Welzl, and M.Schachner. 1996. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* 45:143-152.

Beer, S., M.Oleszewski, P.Gutwein, C.Geiger, and P.Altevogt. 1999. Metalloproteinase-mediated release of the ectodomain of L1 adhesion molecule. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 16):2667-2675.

Benjannet, S., A.Elagoz, L.Wickham, M.Mamarbachi, J.S.Munzer, A.Basak, C.Lazure, J.A.Cromlish, S.Sisodia, F.Checler, M.Chretien, and N.G.Seidah. 2001. Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* 276:10879-10887.

- Bergeron,E., A.Basak, E.Decroly, and N.G.Seidah. 2003. Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem. J.* 373:475-484.
- Bhat,S. and D.H.Silberberg. 1988. NCAM-180, the largest component of the neural cell adhesion molecule, is reduced in dysmyelinating quaking mutant mouse brain. *Brain Res.* 452:373-377.
- Bix,G.J. and G.D.Clark. 1998. Platelet-activating factor receptor stimulation disrupts neuronal migration In vitro. *J. Neurosci.* 18:307-318.
- Black,R.A., C.T.Rauch, C.J.Kozlosky, J.J.Peschon, J.L.Slack, M.F.Wolfson, B.J.Castner, K.L.Stocking, P.Reddy, S.Srinivasan, N.Nelson, N.Boiani, K.A.Schooley, M.Gerhart, R.Davis, J.N.Fitzner, R.S.Johnson, R.J.Paxton, C.J.March, and D.P.Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
- Black,R.A. and J.M.White. 1998. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:654-659.
- Blobel,C.P. 1997. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell* 90:589-592.
- Blobel,C.P. 2000. Remarkable roles of proteolysis on and beyond the cell surface. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:606-612.
- Blobel,C.P. and J.M.White. 1992. Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:760-765.
- Bock,E. and O.S.Jorgensen. 1975. Rat brain synaptic vesicles and synaptic plasma membranes compared by crossed immunoelectrophoresis. *FEBS Lett.* 52:37-39.
- Bode,W., C.Fernandez-Catalan, H.Tschesche, F.Grams, H.Nagase, and K.Maskos. 1999. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell Mol. Life Sci.* 55:639-652.
- Bohrmann,U. 2001. Yeast two-hybrid Systeme zur Identifikation zytoplasmatischer Interaktionspartner der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle MAG, P0 und NCAM (Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg).
- Brewer,G.J., J.R.Torricelli, E.K.Evege, and P.J.Price. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35:567-576.
- Brinckerhoff,C.E. and L.M.Matrisian. 2002. Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:207-214.
- Brittis,P.A., J.Silver, F.S.Walsh, and P.Doherty. 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,M.S., J.Ye, R.B.Rawson, and J.L.Goldstein. 2000. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100:391-398.

Brummendorf,T., M.Hubert, U.Treubert, R.Leuschner, A.Tarnok, and F.G.Rathjen. 1993. The axonal recognition molecule F11 is a multifunctional protein: specific domains mediate interactions with Ng-CAM and restrictin. *Neuron* 10:711-727.

Brummendorf,T. and F.G.Rathjen. 1995. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile*. 2:963-1108.

Brummendorf,T. and F.G.Rathjen. 1996. Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:584-593.

Burnette,W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.

Buxbaum,J.D., K.N.Liu, Y.Luo, J.L.Slack, K.L.Stocking, J.J.Peschon, R.S.Johnson, B.J.Castner, D.P.Cerretti, and R.A.Black. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* 273:27765-27767.

Cao,X., T.C.Sudhof. 2001. A transcriptionally (correction of transcriptively) active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115-120

Caporaso,G.L., S.E.Gandy, J.D.Buxbaum, T.V.Ramabhadran, and P.Greengard. 1992. Protein phosphorylation regulates secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:3055-3059.

Carenini,S., M.Schachner, and R.Martini. 1998. Cytochalasin D disrupts the restricted localization of N-CAM, but not of L1, at sites of Schwann cell-neurite and Schwann cell-Schwann cell contact in culture. *J. Neurocytol.* 27:453-458.

Chan,Y.M. and Y.N.Jan. 1999. Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and notch signaling. *Neuron* 23:201-204.

Chang,S., F.G.Rathjen, and J.A.Raper. 1987. Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell surface glycoproteins. *J. Cell Biol.* 104:355-362.

Chretien,M., S.Benjannet, F.Gossard, C.Gianoulakis, P.Crine, M.Lis, and N.G.Seidah. 1979. From beta-lipotropin to beta-endorphin and 'pro-opio-melanocortin'. *Can. J. Biochem.* 57:1111-1121.

Cohen,N.R., J.S.Taylor, L.B.Scott, R.W.Guillery, P.Soriano, and A.J.Furley. 1998. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr. Biol.* 8:26-33.

Cossins,J.A., J.M.Clements, J.Ford, K.M.Miller, R.Pigott, W.Vos, d.Van, V, and C.J.De Groot. 1997. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol. (Berl)* 94:590-598.

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

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

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

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

Curran,S. and G.I.Murray. 1999. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J. Pathol.* 189:300-308.

Dahlin-Huppe,K., E.O.Berglund, B.Ranscht, W.B.Stallcup. 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

Dahme,M., U.Bartsch, R.Martini, B.Anliker, M.Schachner, and N.Mantei. 1997. Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat. Genet.* 17:346-349.

Davis,J.Q. and V.Bennett. 1994. Ankyrin binding activity shared by the neurofascin/L1/NrCAM family of nervous system cell adhesion molecules. *J. Biol. Chem.* 269:27163-27166.

De Strooper,B., W.Annaert, P.Cupers, P.Saftig, K.Craessaerts, J.S.Mumm, E.H.Schroeter, V.Schrijvers, M.S.Wolfe, W.J.Ray, A.Goate, and R.Kopan. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.

DeBernardo,A.P. and S.Chang. 1996. Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension. *J. Cell Biol.* 133:657-666.

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

Doherty,P., C.H.Barton, G.Dickson, P.Seaton, L.H.Rowett, S.E.Moore, H.J.Gower, and F.S.Walsh. 1989. Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms. *J. Cell Biol.* 109:789-798.

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

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

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

Doherty,P. and F.S.Walsh. 1996. CAM-FGF Receptor Interactions: A Model for Axonal Growth. *Mol. Cell Neurosci.* 8:99-111.

Durbec,P. and H.Cremer. 2001. Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* 24:53-64.

Ebeling,O., A.Duczmal, S.Aigner, C.Geiger, S.Schollhammer, J.T.Kemshead, P.Moller, R.Schwartz-Albiez, and P.Altevogt. 1996. L1 adhesion molecule on human lymphocytes and monocytes: expression and involvement in binding to alpha v beta 3 integrin. *Eur. J. Immunol.* 26:2508-2516.

Eckhardt,M., O.Bukalo, G.Chazal, L.Wang, C.Goridis, M.Schachner, R.Gerardy-Schahn, H.Cremer, and A.Dityatev. 2000. Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SialV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 20:5234-5244.

Ellerbroek,S.M. and M.S.Stack. 1999. Membrane associated matrix metalloproteinases in metastasis. *Bioessays* 21:940-949.

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

Endo,A., N.Nagai, T.Urano, Y.Takada, K.Hashimoto, and A.Takada. 1999. Proteolysis of neuronal cell adhesion molecule by the tissue plasminogen activator-plasmin system after kainate injection in the mouse hippocampus. *Neurosci. Res.* 33:1-8.

Faissner,A., D.B.Teplow, D.Kubler, G.Keilhauer, V.Kinzel, and M.Schachner. 1985. Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *EMBO J.* 4:3105-3113.

Fazeli,M.S., K.Breen, M.L.Errington, and T.V.Bliss. 1994. Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci. Lett.* 169:77-80.

Ferguson,T.A. and D.Muir. 2000. MMP-2 and MMP-9 increase the neurite-promoting potential of schwann cell basal laminae and are upregulated in degenerated nerve. *Mol. Cell Neurosci.* 16:157-167.

Fields,R.D. and K.Itoh. 1996. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19:473-480.

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

Fors,B.P., K.Goodarzi, and U.H.von Andrian. 2001. L-selectin shedding is independent of its subsurface structures and topographic distribution. *J. Immunol.* 167:3642-3651.

Fox,G.B., N.Kennedy, and C.M.Regan. 1995. Polysialylated neural cell adhesion molecule expression by neurons and astroglial processes in the rat dentate gyrus declines dramatically with increasing age. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13:663-672.

Fransen,E., V.Lemmon, G.Van Camp, L.Vits, P.Coucke, and P.J.Willems. 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., P. Milev, L. Karthikeyan, R.K. Margolis, R.U. Margolis, and M. Grumet. 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.

Galko, M.J. and M. Tessier-Lavigne. 2000. Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* 289:1365-1367.

Gaultier, A., H. Cousin, T. Darribere, and D. Alfandari. 2002. ADAM13 disintegrin and cysteine-rich domains bind to the second heparin-binding domain of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 277:23336-23344.

Gennarini, G., M. Hirn, H. Deagostini-Bazin, and C. Goriadis. 1984. Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. The use of liposome-inserted radioiodinated N-CAM to study its transbilayer orientation. *Eur. J. Biochem.* 142:65-73.

Gluschankof, P. and R.S. Fuller. 1994. A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *EMBO J.* 13:2280-2288.

Goddard, D.R., R.A. Bunning, and M.N. Woodroffe. 2001. Astrocyte and endothelial cell expression of ADAM 17 (TACE) in adult human CNS. *Glia* 34:267-271.

Grumet, M. and G.M. Edelman. 1984. Heterotypic binding between neuronal membrane vesicles and glial cells is mediated by a specific cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 98:1746-1756.

Gupta, S., H. Li, and N.S. Sampson. 2000. Characterization of fertilin beta-disintegrin binding specificity in sperm-egg adhesion. *Bioorg. Med. Chem.* 8:723-729.

Gutwein, P., M. Oleszewski, S. Mechttersheimer, N. Agmon-Levin, K. Krauss, and P. Altevogt. 2000. Role of Src kinases in the ADAM-mediated release of L1 adhesion molecule from human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275:15490-15497.

Gutwein, P., S. Mechttersheimer, S. Riedle, A. Stoeck, D. Gast, S. Joumaa, H. Zentgraf, M. Fogel, and D.P. Altevogt. 2003. ADAM10-mediated cleavage of L1 adhesion molecule at the cell surface and in released membrane vesicles. *FASEB J.* 17:292-294.

Harris, A.S. and J.S. Morrow. 1988. Proteolytic processing of human brain alpha spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J. Neurosci.* 8:2640-2651.

Harris, A.S. and J.S. Morrow. 1990. Calmodulin and calcium-dependent protease I coordinately regulate the interaction of fodrin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:3009-3013.

Hartwig, J.H., M. Thelen, A. Rosen, P.A. Janmey, A.C. Nairn, and A. Aderem. 1992. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356:618-622.

Haspel, J., G. Schurmann, J. Jacob, H.P. Erickson, and M. Grumet. 2001. Disulfide-mediated dimerization of L1 Ig domains. *J. Neurosci. Res.* 66:347-355.

He,H.T., J.Barbet, J.C.Chaix, and C.Goridis. 1986. Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of NCAM-120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO J.* 5:2489-2494.

Heukeshoven,J. and R.Dernick. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28-32.

Ho,A., T.C.Sudhof. 2004. Binding of F-spondin to amyloid-beta precursor protein: a candidate amyloid-beta precursor protein ligand that modulates amyloid-beta precursor cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 2548-2553.

Hoefnagel,C.A., M.Rutgers, C.K.Buitenhuis, L.A.Smets, J.de Kraker, M.Meli, F.Carrel, H.Amstutz, P.A.Schubiger, and I.Novak-Hofer. 2001. A comparison of targeting of neuroblastoma with mIBG and anti L1-CAM antibody mAb chCE7: therapeutic efficacy in a neuroblastoma xenograft model and imaging of neuroblastoma patients. *Eur. J. Nucl. Med.* 28:359-368.

Hoffman,K.B. 1998. The relationship between adhesion molecules and neuronal plasticity. *Cell Mol. Neurobiol.* 18:461-475.

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

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

Hohnoki,K., A.Inoue, and C.S.Koh. 1998. Elevated serum levels of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha/unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating diseases during the acute stage. *J. Neuroimmunol.* 87:27-32.

Holm,J., F.Appel, and M.Schachner. 1995. Several extracellular domains of the neural cell adhesion molecule L1 are involved in homophilic interactions. *J. Neurosci. Res.* 42:9-20.

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

Huang,L., T.Berkelman, A.E.Franklin, and N.E.Hoffman. 1993. Characterization of a gene encoding a Ca(2+)-ATPase-like protein in the plastid envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:10066-10070.

Hunter,I., H.Sawa, M.Edlund, and B.Obrink. 1996. Evidence for regulated dimerization of cell-cell adhesion molecule (C-CAM) in epithelial cells. *Biochem. J.* 320 ( Pt 3):847-853.

Hynes,R.O. 1992. Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2:621-624.

Iba,K., R.Albrechtsen, B.Gilpin, C.Frohlich, F.Loechel, A.Zolkiewska, K.Ishiguro, T.Kojima, W.Liu, J.K.Langford, R.D.Sanderson, C.Brakebusch, R.Fassler, and U.M.Wewer. 2000. The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J. Cell Biol.* 149:1143-1156.

- Ibsen,S., V.Berezin, B.Norgaard-Pedersen, and E.Bock. 1983. Quantification of the D2-glycoprotein in amniotic fluid and serum from pregnancies with fetal neural tube defects. *J. Neurochem.* 41:363-366.
- Ikebe,M., S.Reardon, G.C.Scott-Woo, Z.Zhou, and Y.Koda. 1990. Purification and characterization of calmodulin-dependent multifunctional protein kinase from smooth muscle: isolation of caldesmon kinase. *Biochemistry* 29:11242-11248.
- Inoue,D., M.Reid, L.Lum, J.Kratzschmar, G.Weskamp, Y.M.Myung, R.Baron, and C.P.Blobel. 1998. Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J. Biol. Chem.* 273:4180-4187.
- Itoh,K., B.Stevens, M.Schachner, and R.D.Fields. 1995. Regulated expression of the neural cell adhesion molecule L1 by specific patterns of neural impulses. *Science* 270:1369-1372.
- Jaques,G., B.Auerbach, M.Pritsch, M.Wolf, N.Madry, and K.Havemann. 1993. Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a new tumor marker in small cell lung cancer. *Cancer* 72:418-425.
- Jie,C., Y.Xu, D.Wang, D.Lukin, B.Zipser, J.Jellies, K.M.Johansen, and J.Johansen. 2000. Posttranslational processing and differential glycosylation of Tractin, an Ig-superfamily member involved in regulation of axonal outgrowth. *Biochim. Biophys. Acta* 1479:1-14.
- Johnson,L.L., R.Dyer, and D.J.Hupe. 1998a. Matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:466-471.
- Jorgensen,O.S. 1995. Neural cell adhesion molecule (NCAM) as a quantitative marker in synaptic remodeling. *Neurochem. Res.* 20:533-547.
- Jorgensen,O.S. and B.Norgaard-Pedersen. 1981. The synaptic membrane D2-protein in amniotic fluid from pregnancies with fetal neural tube defects. *Prenat. Diagn.* 1:3-6.
- Jun,C.D., M.Shimaoka, C.V.Carman, J.Takagi, and T.A.Springer. 2001. Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:6830-6835.
- Jung,K.M., S.Tan, N.Landman, K.Petrova, S.Murray, R.Lewis, P.K.Kim, D.S.Kim, S.H.Ryu, M.V.Chao, and T.W.Kim. 2003. Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J. Biol. Chem.* 278:42161-42169.
- Kadmon,G. and P.Altevogt. 1997. The cell adhesion molecule L1: species- and cell-type-dependent multiple binding mechanisms. *Differentiation* 61:143-150.
- Kadmon,G., B.A.Imhof, P.Altevogt, and M.Schachner. 1995. Adhesive hierarchy involving the cell adhesion molecules L1, CD24, and alpha 6 integrin in murine neuroblastoma N2A cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:94-101.
- Kadmon,G., A.Kowitz, P.Altevogt, and M.Schachner. 1990. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* 110:193-208.

Kahn, J., B. Walcheck, G. I. Migaki, M. A. Jutila, and T. K. Kishimoto. 1998. Calmodulin regulates L-selectin adhesion molecule expression and function through a protease-dependent mechanism. *Cell* 92:809-818.

Kamiguchi, H. and V. Lemmon. 1997-. Neural cell adhesion molecule L1: signaling pathways and growth cone motility. *J. Neurosci. Res.* 49:1-8.

Karkkainen, I., E. Rybnikova, M. Peltö-Huikko, and A. P. Huovila. 2000. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. *Mol. Cell Neurosci.* 15:547-560.

Kemler, R., M. Ozawa, and M. Ringwald. 1989. Calcium-dependent cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1:892-897.

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

Khasigov, P. Z., O. V. Podobed, S. A. Ktsoeva, T. M. Gatagonova, S. V. Grachev, S. S. Shishkin, and T. T. Berezov. 2001a. Matrix metalloproteinases of normal human tissues. *Biochemistry (Mosc.)* 66:130-140.

Khatib, A. M., G. Siegfried, A. Prat, J. Luis, M. Chretien, P. Metrakos, and N. G. Seidah. 2001. Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *J. Biol. Chem.* 276:30686-30693.

Kim, D. Y., L. A. Ingano, and D. M. Kovacs. 2002. Nectin-1alpha, an immunoglobulin-like receptor involved in the formation of synapses, is a substrate for presenilin/gamma-secretase-like cleavage. *J. Biol. Chem.* 277:49976-49981.

Kimberly, W. T. and M. S. Wolfe. 2003. Identity and function of gamma-secretase. *J. Neurosci. Res.* 74:353-360.

Kishimoto, T. K., J. Kahn, G. Migaki, E. Mainolfi, F. Shirley, R. Ingraham, and R. Rothlein. 1995. Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis. *Agents Actions Suppl* 47:121-134.

Kiss, J. Z. and G. Rougon. 1997. Cell biology of polysialic acid. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7:640-646.

Kleene, R., H. Yang, M. Kutsche, and M. Schachner. 2001. The neural recognition molecule L1 is a sialic acid-binding lectin for CD24, which induces promotion and inhibition of neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 276:21656-21663.

Kleiner, D. E., Jr. and W. G. Stetler-Stevenson. 1993. Structural biochemistry and activation of matrix metalloproteases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:891-897.

Kolkova, K., V. Novitskaya, N. Pedersen, V. Berezin, and E. Bock. 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.

- Kopan,R. 2002. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J. Cell Sci.* 115:1095-1097.
- Kopan,R. and M.X.Ilagan. 2004. Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:499-504.
- Kostrewa,D., M.Brockhaus, A.D'Arcy, G.E.Dale, P.Nelboeck, G.Schmid, F.Mueller, G.Bazzoni, E.Dejana, T.Bartfai, F.K.Winkler, and M.Hennig. 2001. X-ray structure of junctional adhesion molecule: structural basis for homophilic adhesion via a novel dimerization motif. *EMBO J.* 20:4391-4398.
- Kowitz,A., G.Kadmon, H.Verschueren, L.Remels, P.De Baetselier, M.Hubbe, M.Schachner, V.Schirmacher, and P.Altevogt. 1993. Expression of L1 cell adhesion molecule is associated with lymphoma growth and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 11:419-429.
- Kridel,S.J., E.Chen, L.P.Kotra, E.W.Howard, S.Mobashery, J.W.Smith. 2001. Substrate Hydrolysis by Matrix Metalloproteinase-9. *J. Biol. Chem.* 276:20572-20578
- Krog,L., M.Olsen, A.M.Dalseg, J.Roth, and E.Bock. 1992. Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma. *J. Neurochem.* 59:838-847.
- Kuhn,T.B., E.T.Stoeckli, M.A.Condrau, F.G.Rathjen, and P.Sonderegger. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* 115:1113-1126.
- Kunz,S., M.Spirig, C.Ginsburg, A.Buchstaller, P.Berger, R.Lanz, C.Rader, L.Vogt, B.Kunz, and P.Sonderegger. 1998. Neurite fasciculation mediated by complexes of axonin-1 and Ng cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 143:1673-1690.
- Kunz,S., U.Ziegler, B.Kunz, and P.Sonderegger. 1996. Intracellular signaling is changed after clustering of the neural cell adhesion molecules axonin-1 and NgCAM during neurite fasciculation. *J. Cell Biol.* 135:253-267.
- Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lagenaur,C. and V.Lemmon. 1987. An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:7753-7757.
- Lee,H.J., K.M.Jung, Y.Z.Huang, L.B.Bennett, J.S.Lee, L.Mei, and T.W.Kim. 2002. Presenilin-dependent gamma-secretase-like intramembrane cleavage of ErbB4. *J. Biol. Chem.* 277:6318-6323.
- Liljelund,P., P.Ghosh, and A.N.van den Pol. 1994. Expression of the neural axon adhesion molecule L1 in the developing and adult rat brain. *J. Biol. Chem.* 269:32886-32895.
- Lindner,J., F.G.Rathjen, and M.Schachner. 1983. L1 mono- and polyclonal antibodies modify cell migration in early postnatal mouse cerebellum. *Nature* 305:427-430.
- Lissitzky,J.C., J.Luis, J.S.Munzer, S.Benjannet, F.Parat, M.Chretien, J.Marvaldi, and N.G.Seidah. 2000. Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of

furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem. J.* 346 Pt 1:133-138.

Lochter,A., L.Vaughan, A.Kaplony, A.Prochiantz, M.Schachner, and A.Faissner. 1991. J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 113:1159-1171.

Loechel,F., B.J.Gilpin, E.Engvall, R.Albrechtsen, and U.M.Wewer. 1998. Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 273:16993-16997.

Lum,L., M.S.Reid, and C.P.Blobel. 1998. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* 273:26236-26247.

Luthi,A., H.Mohajeri, M.Schachner, and J.P.Laurent. 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.

Luthi,A., J.P.Laurent, A.Figurov, D.Muller, and M.Schachner. 1994. Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* 372:777-779.

Maidment,S.L., G.J.Rucklidge, H.K.Rooprai, and G.J.Pilkington. 1997. An inverse correlation between expression of NCAM-A and the matrix-metalloproteinases gelatinase-A and gelatinase-B in human glioma cells in vitro. *Cancer Lett.* 116:71-77.

Marambaud,P., J.Shioi, G.Serban, A.Georgakopoulos, S.Sarner, V.Nagy, L.Baki, P.Wen, S.Efthimiopoulos, Z.Shao, T.Wisniewski, and N.K.Robakis. 2002. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 21:1948-1956.

Marcinkiewicz,M., D.Savaria, and J.Marcinkiewicz. 1998. The pro-protein convertase PC1 is induced in the transected sciatic nerve and is present in cultured Schwann cells: comparison with PC5, furin and PC7, implication in pro-BDNF processing. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 59:229-246.

Marcinkiewicz,M., N.G.Seidah, and M.Chretien. 1996. Implications of the subtilisin/kexin-like precursor convertases in the development and function of nervous tissues. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 56:287-298.

Marston,S.B., I.D.Fraser, P.A.Huber, K.Pritchard, N.B.Gusev, and K.Torok. 1994. Location of two contact sites between human smooth muscle caldesmon and Ca(2+)-calmodulin. *J. Biol. Chem.* 269:8134-8139.

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

Martini,R., Y.Xin, and M.Schachner. 1994. Restricted localization of L1 and N-CAM at sites of contact between Schwann cells and neurites in culture. *Glia* 10:70-74.

Matala,E., S.R.Alexander, T.K.Kishimoto, and B.Walcheck. 2001-. The cytoplasmic domain of L-selectin participates in regulating L-selectin endoproteolysis. *J. Immunol.* 167:1617-1623.

Matrisian,L.M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14:455-463.

- Mechtersheimer,S., P.Gutwein, N.Agmon-Levin, A.Stoeck, M.Oleszewski, S.Riedle, R.Postina, F.Fahrenheit, M.Fogel, V.Lemmon, and P.Altevogt. 2001. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J. Cell Biol.* 155:661-673.
- Meli,M.L., F.Carrel, R.Waibel, H.Amstutz, N.Crompton, R.Jaussi, H.Moch, P.A.Schubiger, and I.Novak-Hofer. 1999. Anti-neuroblastoma antibody chCE7 binds to an isoform of L1-CAM present in renal carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 83:401-408.
- Middelhoven,P.J., J.D.Van Buul, M.Kleijer, D.Roos, and P.L.Hordijk. 1999. Actin polymerization induces shedding of FcgammaRIIIb (CD16) from human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255:568-574.
- Miethke,T., C.Wahl, B.Holzmann, K.Heeg, and H.Wagner. 1993. Bacterial superantigens induce rapid and T cell receptor V beta-selective down-regulation of L-selectin (gp90Mel-14) in vivo. *J. Immunol.* 151:6777-6782.
- Montgomery,A.M., J.C.Becker, C.H.Siu, V.P.Lemmon, D.A.Cherness, J.D.Pancook, X.Zhao, and R.A.Reisfeld. 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., R.Tacke, H.Scherer, D.Teplow, K.Fruh, and M.Schachner. 1988. Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334:701-703.
- Moss,M.L. and M.H.Lambert. 2002. Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. *Essays Biochem.* 38:141-153.
- Muller,D., Z.Djebbara-Hannas, P.Jourdain, L.Vutskits, P.Durbec, G.Rougon, and J.Z.Kiss. 2000. Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:4315-4320.
- Mumm,J.S. and R.Kopan. 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228:151-165.
- Murakami,D., I.Okamoto, O.Nagano, Y.Kawano, T.Tomita, T.Iwatsubo, B.De Strooper, E.Yumoto, and H.Saya. 2003. Presenilin-dependent gamma-secretase activity mediates the intramembranous cleavage of CD44. *Oncogene* 22:1511-1516.
- Murase,S. and E.M.Schuman. 1999. The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:549-553.
- Murphy,G. and J.Gavrilovic. 1999. Proteolysis and cell migration: creating a path? *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:614-621.
- Murphy,G., J.P.Segain, M.O'Shea, M.Cockett, C.Ioannou, O.Lefebvre, P.Chambon, and P.Basset. 1993. The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J. Biol. Chem.* 268:15435-15441.
- Nagase,H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378:151-160.
- Nagase,H. and J.F.Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274:21491-21494.

Naus,S., M.Richter, D.Wildeboer, M.Moss, M.Schachner, and J.W.Bartsch. 2004. Ectodomain shedding of the neural recognition molecule CHL1 by the metalloprotease-disintegrin ADAM8 promotes neurite outgrowth and suppresses neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* 279:16083-16090.

Nayeem,N., S.Silletti, X.Yang, V.P.Lemmon, R.A.Reisfeld, W.B.Stallcup, and A.M.Montgomery. 1999. A potential role for the plasmin(ogen) system in the posttranslational cleavage of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 24):4739-4749.

Niethammer,P., M.Delling, V.Sytnyk, A.Dityatev, K.Fukami, and M.Schachner. 2002. Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis. *J. Cell Biol.* 157:521-532.

Nybroe,O., M.Albrechtsen, J.Dahlin, D.Linnemann, J.M.Lyles, C.J.Moller, and E.Bock. 1985. Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: characterization of polypeptide C. *J. Cell Biol.* 101:2310-2315.

Nybroe,O., D.Linnemann, and E.Bock. 1989. Heterogeneity of soluble neural cell adhesion molecule. *J. Neurochem.* 53:1372-1378.

O'Connell,J.P., F.Willenbrock, A.J.Docherty, D.Eaton, and G.Murphy. 1994. Analysis of the role of the COOH-terminal domain in the activation, proteolytic activity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interactions of gelatinase B. *J. Biol. Chem.* 269:14967-14973.

Oh,L.Y., P.H.Larsen, C.A.Krekoski, D.R.Edwards, F.Donovan, Z.Werb, and V.W.Yong. 1999. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 19:8464-8475.

Oleszewski,M., P.Gutwein, L.W.von der, U.Rauch, and P.Altevogt. 2000. Characterization of the L1-neurocan-binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J. Biol. Chem.* 275:34478-34485.

Olsen,M., L.Krog, K.Edvardsen, L.T.Skovgaard, and E.Bock. 1993. Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane. *Biochem. J.* 295 ( Pt 3):833-840.

Owens,G.C., G.M.Edelman, and B.A.Cunningham. 1987. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:294-298.

Parks,A.L., K.M.Klueg, J.R.Stout, and M.A.Muskavitch. 2000. Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127:1373-1385.

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

Poltorak,M., I.Khoja, J.J.Hemperly, J.R.Williams, R.el Mallakh, and W.J.Freed. 1995. Disturbances in cell recognition molecules (N-CAM and L1 antigen) in the CSF of patients with schizophrenia. *Exp. Neurol.* 131:266-272.

- Primakoff,P. and D.G.Myles. 2000. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* 16:83-87.
- Probstmeier,R., T.Fahrig, E.Spiess, and M.Schachner. 1992. Interactions of the neural cell adhesion molecule and the myelin-associated glycoprotein with collagen type I: involvement in fibrillogenesis. *J. Cell Biol.* 116:1063-1070.
- Probstmeier,R., K.Kuhn, and M.Schachner. 1989a. Binding properties of the neural cell adhesion molecule to different components of the extracellular matrix. *J. Neurochem.* 53:1794-1801.
- Rathjen,F.G. and M.Schachner. 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.
- Rehemtulla,A. and R.J.Kaufman. 1992. Preferred sequence requirements for cleavage of pro-von Willebrand factor by propeptide-processing enzymes. *Blood* 79:2349-2355.
- Reichardt,L.F. and K.J.Tomaselli. 1991. Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:531-570.
- Rhoads,A.R. and F.Friedberg. 1997. Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* 11:331-340.
- Richter-Landsberg,C., V.M.Lee, S.R.Salton, M.L.Shelanski, and L.A.Greene. 1984. Release of the NILE and other glycoproteins from cultured PC12 rat pheochromocytoma cells and sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 43:841-848.
- Rizoli,S.B., O.D.Rotstein, and A.Kapus. 1999. Cell volume-dependent regulation of L-selectin shedding in neutrophils. A role for p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 274:22072-22080.
- Roghani,M., J.D.Becherer, M.L.Moss, R.E.Atherton, H.Erdjument-Bromage, J.Arribas, R.K.Blackburn, G.Weskamp, P.Tempst, and C.P.Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 274:3531-3540.
- Ronn,L.C., S.Dissing, A.Holm, V.Berezin, and E.Bock. 2002. Increased intracellular calcium is required for neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of NCAM. *FEBS Lett.* 518:60-66.
- Rose,S.P. 1995. Glycoproteins and memory formation. *Behav. Brain Res.* 66:73-78.
- Rouille,Y., S.J.Duguay, K.Lund, M.Furuta, Q.Gong, G.Lipkind, A.A.Oliva, Jr., S.J.Chan, and D.F.Steiner. 1995. Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol.* 16:322-361.
- Ruppert,M., S.Aigner, M.Hubbe, H.Yagita, and P.Altevogt. 1995. The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. *J. Cell Biol.* 131:1881-1891.
- Rutishauser,U., J.P.Thiery, R.Brackenbury, B.A.Sela, and G.M.Edelman. 1976. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 73:577-581.

Sadoul,K., A.Meyer, M.G.Low, and M.Schachner. 1986. Release of the 120 kDa component of the mouse neural cell adhesion molecule N-CAM from cell surfaces by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci. Lett.* 72:341-346.

Sadoul,K., R.Sadoul, A.Faissner, and M.Schachner. 1988. Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.* 50:510-521.

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

Salton,S.R., M.L.Shelanski, and L.A.Greene. 1983. Biochemical properties of the nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein. *J. Neurosci.* 3:2420-2430.

Sambrook,J. and M.J.Gething. 1989. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342:224-225.

Sammar,M., S.Aigner, and P.Altevogt. 1997. Heat-stable antigen (mouse CD24) in the brain: dual but distinct interaction with P-selectin and L1. *Biochim. Biophys. Acta* 1337:287-294.

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

Sato,H. and M.Seiki. 1996. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis. *J. Biochem. (Tokyo)* 119:209-215.

Scaramuzzino,D.A. and J.S.Morrow. 1993. Calmodulin-binding domain of recombinant erythrocyte beta-adducin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:3398-3402.

Schachner,M. 1991. Cell surface recognition and neuron-glia interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633:105-112.

Schafer,M.K., R.Day, W.E.Cullinan, M.Chretien, N.G.Seidah, and S.J.Watson. 1993. Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J. Neurosci.* 13:1258-1279.

Schlondorff,J. and C.P.Blobel. 1999. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 21):3603-3617.

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

Schmidt,C., V.Kunemund, E.S.Wintergerst, B.Schmitz, and M.Schachner. 1996. CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1. *J. Neurosci. Res.* 43:12-31.

Schnegelsberg,B. 2001. *In vitro* Untersuchungen zur posttranslationalen Prozessierung der Zelladhäsionsmoleküle L1 und CHL1 (Dissertation durchgeführt am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, ZMNH, Universität Hamburg).

- Schnierer,S., T.Kleine, T.Gote, A.Hillemann, V.Knauper, and H.Tschesche. 1993. The recombinant catalytic domain of human neutrophil collagenase lacks type I collagen substrate specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191:319-326.
- Schulz,J.G., W.Annaert, J.Vandekerckhove, P.Zimmermann, B.De Strooper, and G.David. 2003. Syndecan 3 intramembrane proteolysis is presenilin/gamma-secretase-dependent and modulates cytosolic signaling. *J. Biol. Chem.* 278:48651-48657.
- Seals,D.F. and S.A.Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* 17:7-30.
- Seidah,N.G. and M.Chretien. 1997. Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:602-607.
- Seidah,N.G. and M.Chretien. 1999. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 848:45-62.
- Seidah,N.G., M.Chretien, and R.Day. 1994. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* 76:197-209.
- Seiki,M. 1999. [Outline of tumor invasion and metastasis]. *Gan To Kagaku Ryoho* 26:157-161.
- Seilheimer,B. and M.Schachner. 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.
- Selkoe,D. and R.Kopan. 2003. Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:565-597.
- Shi,M., K.Dennis, J.J.Peschon, R.Chandrasekaran, and K.Mikecz. 2001. Antibody-induced shedding of CD44 from adherent cells is linked to the assembly of the cytoskeleton. *J. Immunol.* 167:123-131.
- Shih,L.M., M.Y.Hsu, J.P.Palazzo, and M.Herlyn. 1997. The cell-cell adhesion receptor Mel-CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma. *Am. J. Pathol.* 151:745-751.
- Silletti,S., F.Mei, D.Sheppard, and A.M.Montgomery. 2000-. Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment. *J. Cell Biol.* 149:1485-1502.
- Skovronsky,D.M., S.Fath, V.M.Lee, and M.E.Milla. 2001. Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques. *J. Neurobiol.* 49:40-46.
- Smith,P.K., R.I.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner, M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, and D.C.Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150:76-85.
- Sporns,O., G.M.Edelman, and K.L.Crossin. 1995. The neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits proliferation in primary cultures of rat astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92:542-546.

Stallcup, W.B. 2000-. The third fibronectin type III repeat is required for L1 to serve as an optimal substratum for neurite extension. *J. Neurosci. Res.* 61:33-43.

Stanley, P. and L. Siminovitch. 1977. Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins. *Somatic. Cell Genet.* 3:391-405.

Stawowy, P., K. Graf, S. Goetze, M. Roser, M. Chretien, N.G. Seidah, E. Fleck, and M. Marcinkiewicz. 2003. Coordinated regulation and colocalization of alpha v integrin and its activating enzyme proprotein convertase PC5 in vivo. *Histochem. Cell Biol.* 119:239-245.

Steiner, D.F. and D.E. James. 1992. Cellular and molecular biology of the beta cell. *Diabetologia* 35 Suppl 2:S41-S48.

Steiner, J.P., H.T. Walke, Jr., and V. Bennett. 1989. Calcium/calmodulin inhibits direct binding of spectrin to synaptosomal membranes. *J. Biol. Chem.* 264:2783-2791.

Stork, O., H. Welzl, H. Cremer, and M. Schachner. 1997. Increased intermale aggression and neuroendocrine response in mice deficient for the neural cell adhesion molecule (NCAM). *Eur. J. Neurosci.* 9:1117-1125.

Stromqvist, M., A. Berglund, V.P. Shanbhag, and L. Backman. 1988. Influence of calmodulin on the human red cell membrane skeleton. *Biochemistry* 27:1104-1110.

Struhl, G. and A. Adachi. 1998. Nuclear access and action of notch in vivo. *Cell* 93:649-660.

Struhl, G. and I. Greenwald. 1999. Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398:522-525.

Szklarczyk, A., J. Lapinska, M. Rylski, R.D. McKay, and L. Kaczmarek. 2002. Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J. Neurosci.* 22:920-930.

Takamatsu, K., B. Auerbach, R. Gerardy-Schahn, M. Eckhardt, G. Jaques, and N. Madry. 1994-. Characterization of tumor-associated neural cell adhesion molecule in human serum. *Cancer Res.* 54:2598-2603.

Takei, K., T.A. Chan, F.S. Wang, H. Deng, U. Rutishauser, and D.G. Jay. 1999. The neural cell adhesion molecules L1 and NCAM-180 act in different steps of neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 19:9469-9479.

Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455.

Takino, T., H. Sato, E. Yamamoto, and M. Seiki. 1995. Cloning of a human gene potentially encoding a novel matrix metalloproteinase having a C-terminal transmembrane domain. *Gene* 155:293-298.

Thomaidou, D., D. Coquillat, S. Meintanis, M. Noda, G. Rougon, and R. Matsas. 2001a. Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases zeta/beta as the putative F3 receptors on Schwann cells. *J. Neurochem.* 78:767-778.

- Thomaidou,D., D.Coquillat, S.Meintanis, M.Noda, G.Rougon, and R.Matsas. 2001b. Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases zeta/beta as the putative F3 receptors on Schwann cells. *J. Neurochem.* 78:767-778.
- Thomas,G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:753-766.
- Tomimatsu,Y., S.Idemoto, S.Moriguchi, S.Watanabe, and H.Nakanishi. 2002. Proteases involved in long-term potentiation. *Life Sci.* 72:355-361.
- Towbin,H., T.Staehelin, and J.Gordon. 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.
- Ulloa,L., J.W.Creemers, S.Roy, S.Liu, J.Mason, and S.Tabibzadeh. 2001. Lefty proteins exhibit unique processing and activate the MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 276:21387-21396.
- Van de Ven,W.J., A.J.Roebroek, and H.L.Van Duijnhoven. 1993. Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. *Crit Rev. Oncog.* 4:115-136.
- Vawter,M.P., N.Usen, L.Thatcher, B.Ladenheim, P.Zhang, D.M.VanderPutten, K.Conant, M.M.Herman, D.P.van Kammen, G.Sedvall, D.L.Garver, and W.J.Freed. 2001. Characterization of human cleaved N-CAM and association with schizophrenia. *Exp. Neurol.* 172:29-46.
- Villeneuve,P., L.Lafortune, N.G.Seidah, P.Kitabgi, and A.Beaudet. 2000. Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain. *J. Comp Neurol.* 424:461-475.
- Villeneuve,P., N.G.Seidah, and A.Beaudet. 1999. Immunohistochemical distribution of the prohormone convertase PC5-A in rat brain. *Neuroscience* 92:641-654.
- Walev,I., D.Tappe, E.Gulbins, and S.Bhakdi. 2000. Streptolysin O-permeabilized granulocytes shed L-selectin concomitantly with ceramide generation via neutral sphingomyelinase. *J. Leukoc. Biol.* 68:865-872.
- Werb,Z. and Y.Yan. 1998. A cellular striptease act. *Science* 282:1279-1280.
- Wessel,D. and U.I.Flugge. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138:141-143.
- White,J.M. 2003-. ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:598-606.
- Will,H. and B.Hinzmann. 1995. cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur. J. Biochem.* 231:602-608.
- Williams,A.F. and A.N.Barclay. 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6:381-405.

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

Wolff,J.M., R.Frank, K.Mujoo, R.C.Spiro, R.A.Reisfeld, and F.G.Rathjen. 1988. A human brain glycoprotein related to the mouse cell adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 263:11943-11947.

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

Wood,P.M., M.Schachner, and R.P.Bunge. 1990. Inhibition of Schwann cell myelination in vitro by antibody to the L1 adhesion molecule. *J. Neurosci.* 10:3635-3645.

Wyszynski,M., J.Lin, A.Rao, E.Nigh, A.H.Beggs, A.M.Craig, and M.Sheng. 1997. Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. *Nature* 385:439-442.

Yagami-Hiromasa,T., T.Sato, T.Kurisasi, K.Kamijo, Y.Nabeshima, and A.Fujisawa-Sehara. 1995. A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature* 377:652-656.

Yong,V.W., C.Power, P.Forsyth, and D.R.Edwards. 2001. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:502-511.

Yoshida,S. and S.Shiosaka. 1999. Plasticity-related serine proteases in the brain (review). *Int. J. Mol. Med.* 3:405-409.

Zhang,Y., R.Roslan, D.Lang, M.Schachner, A.R.Lieberman, and P.N.Anderson. 2000. Expression of CHL1 and L1 by neurons and glia following sciatic nerve and dorsal root injury. *Mol. Cell Neurosci.* 16:71-86.

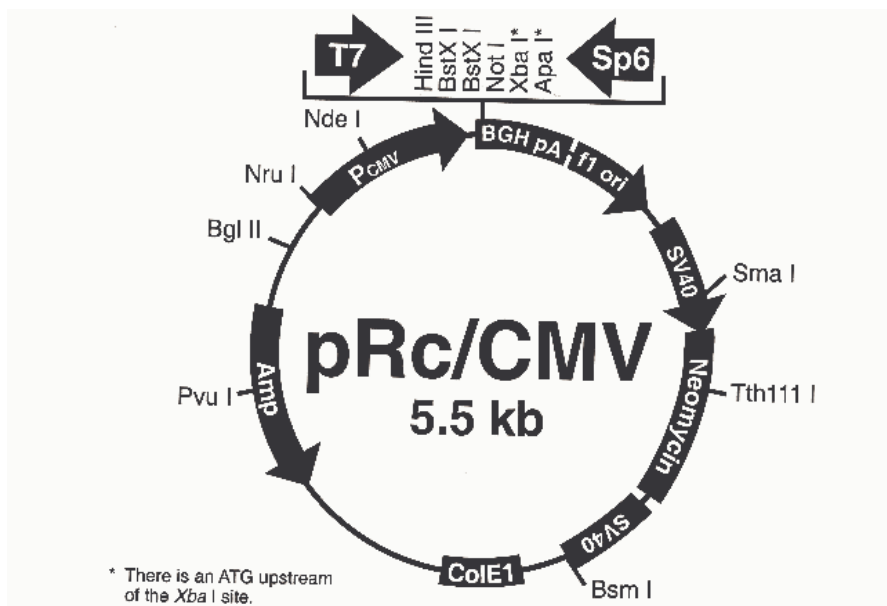
Zhong,M., S.Benjannet, C.Lazure, S.Munzer, and N.G.Seidah. 1996. Functional analysis of human PACE4-A and PACE4-C isoforms: identification of a new PACE4-CS isoform. *FEBS Lett.* 396:31-36.

Zisch,A.H., W.B.Stallcup, L.D.Chong, K.Dahlin-Huppe, J.Voshol, M.Schachner, and E.B.Pasquale. 1997. Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cek5. *J. Neurosci. Res.* 47:655-665.

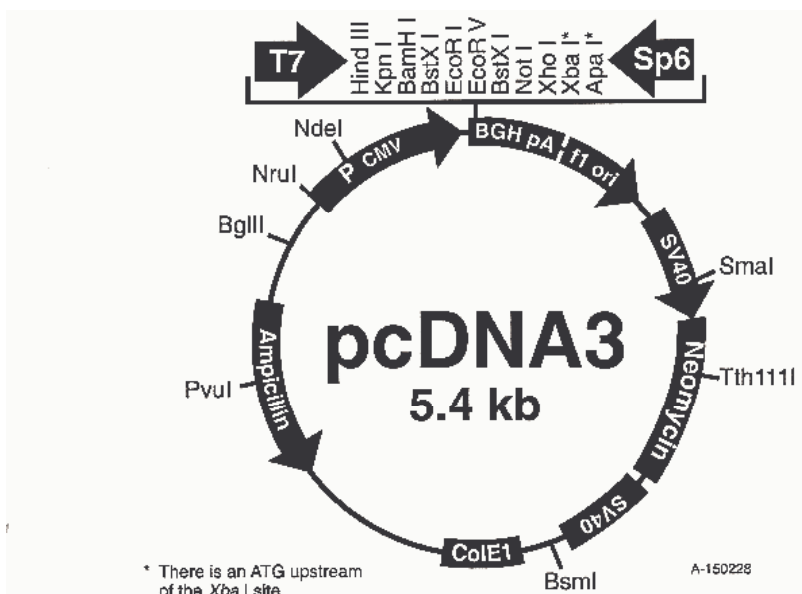
## 9 ANHANG

### 9.1 Plasmidkarten

#### 9.1.1 pRc/CMV



#### 9.1.2 pcDNA3



## 9.2 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1: Beispiele von Transmembranproteinen, die durch proteolytische Spaltung von der Membran gelöst werden (Schlondorff and Blobel, 1999).

Tab. 1.2: Zellfunktionen, die durch Proteolyse beeinflusst und reguliert werden.

Tab. 1.3: Proteasen der ADAM-Familie und ihre Substrate (White, 2003)

Tab. 1.4: Proteasen der MMP-Familie und ihre nicht-traditionellen Substrate (Johnson *et al.*, 1998; Khasigov *et al.*, 2001)

Tab. 1.5: Proteinvorläufer, die durch regulierte Prozessierung von Mitgliedern der Familie der Prohormonkonvertasen aktiviert werden können (Seidah and Chretien, 1997).

Tab. 1.6: Die L1-defiziente Maus - Ein Tiermodell für das CRASH-Syndrom

Tab. 2.1: Verwendete Zelllinien und ihre Eigenschaften

Tab. 2.2: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der CHO-Zelllinie

Tab. 2.3: Zusammensetzung des Mediums zur Kultivierung der Neuro 2a-Zelllinie

Tab. 2.4: Verwendete *E. coli*-Stämme und ihre Eigenschaften

Tab. 2.5: Verwendete Expressionskonstrukte und ihre Charakteristika

Tab. 2.6: Verwendete Plasmide und ihre Charakteristika

Tab. 2.7: Verwendete Antibiotika

Tab. 2.8: Verwendete Primärantikörper und ihre Charakteristika

Tab. 2.9: Verwendete Inhibitoren

Tab. 3.1: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngellösungen

Tab. 3.2: Eingesetzte Antikörper und ihre Charakteristika

Tab. 3.3: Verwendete Inhibitoren (Proteolyseassay an isolierten Membranen)

Tab. 3.4: Verwendete Inhibitoren (Behandlung von Zellen mit Inhibitoren)

Tab. 3.5: Verwendete Expressionskonstrukte

Tab. 3.6: Verwendete Inhibitoren (Kleinhirnexplantate)

Tab. 9.1: Abkürzungen der Nukleotide

Tab. 9.2: Symbole für Aminosäuren

### 9.3 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1: Schematische Übersicht der Domänenstruktur der Familie der ADAMs  
(Moss und Lambert, 2002)

Abb. 1.2: MMPs weisen eine konservierte Domänenstruktur auf (Matrisian, 1992).

Abb. 1.3: Die Mitglieder dieser Familie weisen eine einheitliche Domänenstruktur auf (Seidah and Chretien, 1997).

Abb. 1.4: Metalloproteasen vermitteln Neuritenwachstum (Yong *et al.*, 2001).

Abb. 1.5: MMP-vermittelte Mechanismen, die zu neuropathologischen Veränderungen führen (Yong *et al.*, 2001).

Abb. 1.6: Das Protein APP wird an drei Stellen durch die als  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen bezeichneten Enzyme gespalten (Blobel, 2000).

Abb. 1.7: Schematische Übersicht über die Subfamilien der Neuralen Zelladhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie (Crossin and Krushel, 2000).

Abb. 1.8: Die NCAM-Isoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180 entstehen durch „Alternatives Spleißen“.

Abb. 1.9: Zusätzlich zu seiner Funktion als Ligand nimmt das Molekül NCAM die Rolle eines Vermittlers in Signaltransduktionsprozessen ein (Williams *et al.*, 1992).

Abb. 1.10: Schematische Darstellung des neuralen Zelladhäsionsmoleküls L1.

Abb. 1.11: L1 ist nicht nur ein adhäsives Molekül, sondern auch ein signaltransduzierender Rezeptor (Kenwrick *et al.*, 2000).

Abb. 1.12: Lösliche Fragmente des Moleküls L1 entstehen durch die regulierte Proteolyse der extrazellulären Domäne.

Abb. 2.1: Vergleich der von den Konstrukten pcDNA3-TACE und pcDNA3-dTACE exprimierten Proteine

Abb. 3.1: Aufbau des diskontinuierlichen Saccharosegradienten zur Isolierung von Fraktionen angereichert mit Endoplasmatischem Retikulum (ER), Golgi-Apparat und glattem ER und sekretorischen Vesikeln

Abb. 3.2: Aufbau des diskontinuierlichen Saccharosegradienten zur Isolierung von Fraktionen angereichert mit synaptosomalen Membranen, Mitochondrien und Zellkernen

Abb. 3.3: Aminosäuresequenzvergleich der intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180.

Abb. 4.1: Nachweis der löslichen NCAM-Fragmente in den Überständen des *in vitro* Proteolyseassays nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.

Abb. 4.2: Nachweis der löslichen PSA-tragenden NCAM-Fragmente in den Überständen des *in vitro* Proteolyseassays nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.

Abb. 4.3: Analyse des enzymatischen Verdaus der Proben des *in vitro* Proteolyseassays unter Kontrollbedingungen mit dem Enzym Endo N.

Abb. 4.4: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.

Abb. 4.5: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit den Expressionskonstrukten NCAM180, NCAM140 und NCAM120 transfizierten CHO-Zellen nach der Inkubation mit dem

Metalloproteaseinhibitor GM 6001.

Abb. 4.6: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit den Expressionskonstrukten TACE und dTACE transfizierten Neuro 2a-Zellen.

Abb. 4.7: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit dem Calmodulininhibitor CGS 9343 B.

Abb. 4.8: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von transient mit den Expressionskonstrukten NCAM140 (A) und NCAM120 (B) transfizierten CHO-Zellen nach der Inkubation mit dem Calmodulininhibitor CGS 9343 B.

Abb. 4.9: Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von NCAM140 (A) und NCAM180 (B) mit Calmodulin.

Abb. 4.10: Lokalisierung des putativen Calmodulinbindungsmotivs in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180.

Abb. 4.11: Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von NCAM140 (A) und NCAM180 (B) mit Calmodulin in Anwesenheit der Peptide 1 - 3.

Abb. 4.12: Interaktion der zytoplasmatischen Domänen von NCAM140 (A) und NCAM180 (B) mit Calmodulin in Anwesenheit des Peptids 1.

Abb. 4.13: Nachweis löslicher NCAM-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit Zytoskelett-modulierenden Substanzen.

Abb. 4.14: Effekt des Serin- und Cysteinproteaseinhibitors Leupeptin und des Metalloproteaseinhibitors GM6001 auf NCAM-abhängiges Neuritenwachstum.

Abb. 4.15: Effekt des Calmodulininhibitors CGS 9343 B auf poly-L-Lysin-, NCAM-,

Laminin- und L1-abhängiges Neuritenwachstum.

Abb. 4.16: Putatives Prohormonkonvertase-Erkennungsmotiv in der dritten Fibronektindomäne des L1-Moleküls.

Abb. 4.17: Nachweis von L1-Fragmenten in den Zellkulturüberständen und den Zelllysaten von transient mit den Expressionskonstrukten PC1, PC2, PC5A und Furin transfizierten Neuro 2a-Zellen.

Abb. 4.18: Nachweis des löslichen Fragmentes L1-140 in Homogenaten von adulten Hippocampi und Kleinhirnen der Maus sowie von kultivierten Kleinhirnneuronen und hippocampalen Neuronen.

Abb. 4.19: Nachweis löslicher und membrangebundener Fragmente des Moleküls L1 in den Überständen und Sedimenten des *in vitro* Proteolyseassays.

Abb. 4.20: Nachweis der löslichen L1-Fragmente in den Überständen des *in vitro* Proteolyseassays nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.

Abb. 4.21: Nachweis von L1-Fragmenten in den Fraktionen eines Dichtegradienten einer mit Triton-X 100 solubilisierten Gehirnhomogenatfraktion (A), einer mit Triton X-100 solubilisierten Membranfraktion (B) und einer mit löslichen Proteinen angereicherten Fraktion (C).

Abb. 4.22: Nachweis löslicher L1-Fragmente in den Zellkulturüberständen von Neuro 2a Zellen nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.

Abb. 4.23: Effekt der Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin und des Metalloproteaseinhibitors GM 6001 auf L1-abhängiges Neuritenwachstum.

- Abb. 4.24: Schematische Darstellung der mit dem anti-L1-Antikörper 555 detektierbaren L1-Fragmente.
- Abb. 4.25: Detektion eines membranassoziierten L1-Fragmentes mit einem Molekulargewicht von 80 kDa.
- Abb. 4.26: Die Spaltung des Moleküls L1 durch die Protease MMP9.
- Abb. 4.27: Nachweis von L1-Fragmenten in den Sedimenten des *in vitro* *Proteolyseassays* nach der Inkubation mit verschiedenen Proteaseinhibitoren.
- Abb. 4.28: Effekt des Presenilininhibitors DAPT auf L1-abhängiges Neuritenwachstum.
- Abb. 4.29: Nachweis der intrazellulären Domäne des Moleküls L1 in Immunpräzipitaten von Zellkernextrakten.
- Abb. 4.30: Immunhistochemischer Nachweis des Moleküls L1 in Zellen der Neuroblastoma Zelllinie Neuro 2a unter Verwendung des anti-L1-Antikörpers 2c2.
- Abb. 5.1: Calmodulin ist in die Regulation von zahlreichen Signaltransduktionswegen involviert.
- Abb. 5.2: Lokalisierung des putativen Calmodulinbindungsmotivs in den intrazellulären Domänen von NCAM140 und NCAM180.
- Abb. 5.2: Die Spaltung des Moleküls L1 in der dritten Fibronektindomäne.
- Abb. 5.3: Übersicht über die durch die Prozessierung des Moleküls L1 in der sechsten Ig-Domäne und ersten Fn-Domäne durch die Protease MMP9 entstehenden zusätzlichen löslichen Fragmente.
- Abb. 5.4: Das Molekül L1 und seine verschiedenen funktionellen Domänen.
- Abb. 5.5: Parallelen der regulierten Prozessierung der Proteine L1 und Notch.

## 9.4 Abkürzungen und Einheiten

μ	Mikro
μM	micromolar
AA	<i>arachidonic acid</i>
Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ADAM	<i>a disintegrin and a metalloprotease</i>
AK	Antikörper
amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APP	<i>amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNS	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CHL1	<i>close homologue of L1</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CKII	<i>casein kinase II</i>
CRASH	<i>corpus callosum hypoplasia, mental retardation, adducted thumbs, spasticity paraplegia and hydrocephalus</i>
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
CSF-1	<i>colony stimulating factor 1</i>
Da	Dalton
DAG	<i>diacylglycerol</i>

---

DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DM1-GRASP	<i>dystrophia myotonica 1 - (general receptor for phosphoinositides) - associated scaffold protein</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i>
DNS	Desoxiribonucleinsäure
DTACE	<i>deficient TACE</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherischia coli
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Eph kinase Cck5	<i>Ephrin receptor tyrosine kinase Cck 5</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinasen
et al.	und weitere
EtBr	Ethidium Bromid
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
Fa	Firma
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
Fas-L	Fas-Ligand
FGF-R	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
Fn	Fibronektin
g	Gramm

GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMEM	<i>Glasgow's Minimal Essential Medium</i>
Golgi	Golgi-Apparat
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	<i>heparin binding - epidermal growth factor</i>
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HEK	human embryonic kidney cells
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
ICAM1	<i>intercellular adhesion molecule L1</i>
ICD	<i>intracellular domain</i>
ICLiP	<i>intramembrane-cleaving-protease</i>
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunoglobulin-Superfamilie
JAM	<i>junctional adhesion molecule</i>
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
lac	Lactose
LB	Luria Bertani
LPC	<i>human lymphoma proprotein convertase</i>
LTP	Langzeitpotenzierung

---

M	molar, mol/l
mA	Milliampere
MAG	<i>myelin associated glycoprotein</i>
MAP-2	<i>microtubule associated protein-2</i>
MAPK	mitogen activated protein kinase
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>
MDC	Metalloprotease-/Disintegrin-/Cystein-reiches Protein
MetOH	Methanol
mg	milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Multiple Sklerose
MT-MMP	<i>membrane type - matrixmetalloprotease</i>
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
Neuro 2a	Neuroblastomazellline Neuro 2a
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLS	<i>nuclear localizing signals</i>
NN	<i>neuromedin</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NrCAM	<i><u>n</u>euron-<u>g</u>lia cell adhesion molecule <u>r</u>elated <u>c</u>ell <u>a</u>dhesion <u>m</u>olecule</i>
NT	<i>neurotensin</i>
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
p.a.	per analysi

p75 NGFR	<i>75 kDa nerve growth factor receptor</i>
P90 rsk	<i>90 kDa ribosomal protein S6 kinase 6</i>
PAA	Polyacrylamid
PACE	<i>paired based amino acid cleaving system</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	<i>prohormonconvertase</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
PI-PLC	<i>phosphatidyl-inositol specific phospholipase C</i>
PKC	<i>protein kinase C</i>
PLC $\gamma$	Phospholipase $\gamma$
PLL	poly-L-Lysin
POMC	Pro-Opiomelanocortin
Pro-BDNF	<i>pro-brain derived neurotrophic factor</i>
Pro-HB-EGF	<i>pro-heparin binding-epidermal growth factor</i>
Pro-LHRH	<i>pro-luteinising releasing hormone</i>
Pro-MIS	<i>pro-mullerian inhibitory substance</i>
Pro-NGF	<i>pro-nerve growth factor</i>
Pro-NT3	<i>pro-neurotrophin 3</i>
Pro-PTH	<i>pro-parathyroid hormone</i>
Pro-TGF $\beta$	<i>pro-transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Pro-TNF $\alpha$	<i>pro-tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i>
Pro-TRH	<i>pro-thyrotropin releasing hormone (Protirelin)</i>
Pro-VEGF <sub>c</sub>	<i>pro-vascular endothelial growth factor c</i>

---

PSA	<i>polysialic acid</i>
RIP	<i>regulated intramembranous proteolysis</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannt
SPC	<i>subtilisin like proprotein convertase</i>
SPP	<i>signal peptide peptidase</i>
SREBP	<i>sterol element binding protein</i>
TACE	<i>TNF<math>\alpha</math> converting enzyme</i>
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
Tau	<i>tubulin assembly unit</i>
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF $\alpha$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TNF $\alpha$	<i>tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TNFR I	<i>tumour necrosis factor receptor I</i>
TNFR II	<i>tumour necrosis factor receptor II</i>
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
TrkA	<i>tyrosine receptor kinase A</i>
TSHR	thyroid stimulating hormone receptor

TX-100	Triton-X 100
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	x 9,81 m/s <sup>2</sup>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 9.5 Abkürzungen der Nukleotide und Aminosäuren

Tab. 9.1: Abkürzungen der Nukleotide

Nukleotid	Abkürzung
<i>Adenine</i>	A
<i>Cytosine</i>	C
<i>Guanine</i>	G
<i>Thymin</i>	T

Tab. 9.2: Symbole für Aminosäuren

Aminosäure	„3 Buchstaben-Code“	„1 Buchstaben-Code“
<i>Alanin</i>	Ala	A
<i>Arginin</i>	Arg	R
<i>Asparagin</i>	Asn	N
<i>Aspartat</i>	Asp	D
<i>Cystein</i>	Cys	C
<i>Glutamin</i>	Gln	Q
<i>Glutamat</i>	Glu	E

---

<b>Aminosäure</b>	<b>„3 Buchstaben-Code“</b>	<b>„1 Buchstaben-Code“</b>
<i>Glycin</i>	Gly	G
<i>Histidin</i>	His	H
<i>Isoleucin</i>	Ile	I
<i>Leucin</i>	Leu	L
<i>Lysin</i>	Lys	K
<i>Methionin</i>	Met	M
<i>Phenylalanin</i>	Phe	F
<i>Prolin</i>	Pro	P
<i>Serin</i>	Ser	S
<i>Threonin</i>	Thr	T
<i>Tryptophan</i>	Trp	W
<i>Tyrosin</i>	Tyr	Y
<i>Valin</i>	Val	V

---

### **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbst verfaßt wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtliche und sinngemäße Zitate wurden durch entsprechende Quellenangaben kenntlich gemacht.

Hamburg, im

## I. Curriculum Vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Ina Kalus
Geburtsdatum:	16. 04.1977
Geburtsort:	Gießen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

### AUSBILDUNGSDATEN

09/1983 - 07/1987	Grundschule in Fernwald-Annerod
09/1987 - 07/1996	Gesamtschule Gießen-Ost in Gießen Schulabschluss: Abitur
10/1996 - 02/2001	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
Februar 2001	Studienabschluss: Diplom Diplomarbeit am Institut für Zytobiologie und klinische Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg, Thema der Diplomarbeit: „Identifizierung von Bindungspartnern des GP-2, eines GPI-verankerten Membranproteins der Zymogengranula des Rattenpankreas“
Seit März 2001	Promotion am Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg der Universität Hamburg in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Marburg, Thema der Promotionsarbeit: „Untersuchungen zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1 im Zentralen Nervensystem der Maus“
10/2001 - 10/2003	Aufbaustudiengang Molekularbiologie der Universität Hamburg

## II. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer des Fachbereiches Medizin im Studiengang der Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren:

Aumüller, Aurich, Beato, Daut, Eilers, Elsässer, Engelhardt, Fruhstorfer, Garten, Hasilik, Hartmann, Heeg, Juncklas, Kern, Kirchner, Körle, Koolman, Lill, Löffler, Lührmann, Meinhardt, Müller, Nissing, Röhm, Tampé, Voigt, Schäfer, Schrader, Seifert, Seitz, Steiniger, Suske, Westphal

und im Aufbaustudiengang Molekularbiologie Hamburg der Universität Hamburg die Damen und Herren Professoren:

Bartsch, Becker, Jentsch, Kleene, Pongs, Schaller, Schachner

### III. Danksagung

Frau Prof. Dr. Melitta Schachner danke ich für die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die interessante Themenstellung meiner Doktorarbeit.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Meinhardt danke ich für die außerordentlich nette und unkomplizierte Betreuung während der gesamten Zeit meiner Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn PD Dr. Ralf Kleene für seine genialen Ideen und die außerordentlich konstruktiven und interessanten Diskussionen bedanken, ohne die diese Arbeit nie so weit fortgeschritten wäre.

Dr. Birthe Schnegelsberg und Dr. Ulrich Bormann danke ich für all die Experimente und Ergebnisse, die es mir erlaubt haben, die Arbeit von diesen Punkten aus, weiter fortzuführen und darauf aufzubauen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Stephan Rattai und seinen Kollegen aus der EDV, die mir in so mancher „Frauen verstehen einfach nichts von Computern“-Situation immer mit Rat und Tat und unglaublicher Geduld zur Seite gestanden haben (Obwohl ich trotzdem nicht weiß, ob da nicht doch vielleicht eine überirdische Kraft im Spiel gewesen ist.). Torsten und Fritz, den „Jungs“ aus der Werkstatt danke ich für ihre spontane Hilfe in so mancher technischen Notsituation.

Frauke Brendel danke ich dafür, dass sie während der vergangenen vier Jahre immer ein offenes Ohr für all meine „wissenschaftlichen“ Fragen hatte, für die hundert (Ehrlich wahr!) Duplos und Hanutas, die wir miteinander geteilt haben, auch die Phantasia-Tüten nicht zu vergessen, für den verlorenen Barbecue-Abend mit Herrn Ballack (Ein Glück, dass ich nicht gewonnen habe!), ihre Hilfe bei allen noch so komplizierten Dreisatzrechnungen, unsere gemeinsame Vorliebe für den „Broiler“, für Shakespeares unvergessliches „Wie es Euch gefällt“, für das geteilte Leid vom „Lehmweg“ zum Rathausmarkt und das alles auch noch mit „Druck“ und für all die vielen Dinge, die ich jetzt hier aufgrund des Platzmangels nicht erwähnen kann.

Ute Bork, Ute Eicke-Kohlmorgen, Claudia Friedrich, Stephan Kaizik, Dr. Gaby Loers (Vielen Dank für all die Hilfestellungen im Laboralltag und die Einführung in Herrn Neumeiers Tanztheater!), Dr. Benedikt Salmen (Danke, für das beste Elektrophysiologie-Praktikum und all die gemeinsamen Theaterabende mit TicTac's und geschmolzener Schoki aus der Hosentasche!), Dr. Carsten Schmidt (Danke, für Deine stete Hilfsbereitschaft in allen proteolytischen Fragen und für all die lebensrettenden Schoki- und Keksrationen!), Tanja Schneegans (Tausend und einen Dank für all Deine Hilfe bei den Explants, ChIPs und EMSAs! Ich sag nur, was darf's denn heute sein?), Mirjam Sibbe, Dr. Kai-Oliver Wesche, Gerrit Wolters (Den besten Nachfolger, den ich mir nur wünschen kann!) danke ich für die gute Stimmung im Labor, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich mich bei Timo für seine tatkräftige Hilfe und moralische Unterstützung während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit bedanken, die oftmals das Arbeiten erleichtert haben.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die in dieser Zeit immer für mich da waren, immer ein offenes Ohr hatten und mich nach allen Kräften unterstützt haben.

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zu der Entstehung und der Bedeutung löslicher Fragmente der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle NCAM und L1 im Zentralen Nervensystem der Maus“ im Institut für Biosynthese Neuraler Strukturen, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) der Universität Hamburg in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. A. Meinhardt und Prof. Dr. M. Schachner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Teile der vorliegenden Arbeit wurden in dem Publikationsorgan: „*Journal of Biological Chemistry*“ veröffentlicht.

Marburg, den 29.9.2004