

Institut für Molekularbiologie und Biochemie
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Abteilung Biochemie
Leiter: Prof. Dr. Werner Reutter

**Die Rolle der cytoplasmatischen Domänen des neuronalen
Zelladhäsionsmoleküls im Neuritenwachstum und
Identifizierung neuer intrazellulärer Bindungspartner**

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bettina Büttner
aus Berlin

Berlin 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Reutter
2. Gutachter: Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

Tag der Disputation: 22.03.2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Zelladhäsion	1
1.2.	Zelladhäsionsmoleküle	1
1.3.	Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie	3
1.4.	Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM	5
1.4.1.	Vorkommen, Struktur und Splicevarianten	5
1.4.2.	Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression und Funktion der drei Hauptisoformen	7 7
1.4.3.	Ligandenbindung – Bindungseigenschaften	8
1.4.4.	Posttranslationale Modifikationen	10
1.4.5.	Polysialylierung als Modifikation	10
1.4.6.	Einfluß der Polysialylierung auf die Funktion	11
1.4.7.	Funktionen von NCAM und PSA-NCAM in der Entwicklung und im adulten Organismus	12
1.5.	NCAM-vermittelte Signaltransduktion	14
1.5.1.	Signaltransduktion beim Neuritenwachstum	14
1.5.1.1.	Aktivierung des FGF-Rezeptor-PLC γ -Signalweges	16
1.5.1.2.	Aktivierung des fyn-FAK-MAPK-Signalweges	17
1.5.1.3.	Beteiligung von cAMP, Proteinkinase A und der Phosphatidylinositol-3- Kinase (PI3-K)	20
1.5.1.4.	Stimulation von Transkriptionsfaktoren	21
1.5.2.	NCAM als heterophiler Signalrezeptor	22
1.6.	Regulation der NCAM-Expression	23
1.7.	Zielsetzung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Material	25
2.1.1.	Chemikalien	25
2.1.2.	Versuchstiere	25
2.1.3.	Zelllinien	25
2.1.4.	Bakterien	25
2.1.5.	Vektoren	26
2.1.6.	Primer und PCR-Reagenzien	28
2.1.7.	Antikörper	29
2.1.8.	Enzyme, Kits und Marker	30
2.1.9.	Nährmedien	31

2.1.10.	Lösungen und Puffer	32
2.1.11.	Geräte	38
2.1.12	Sonstiges	38
2.2.	Methoden	39
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.1.1.	RNA-Präparationen aus eukaryontischen Zellen mit RNeasy	39
2.2.1.2.	RNA-Präparation aus Rattenhirn mit RNeasy	39
2.2.1.3.	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	40
2.2.1.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	40
2.2.1.5.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	41
2.2.1.6.	Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.1.7.	Fällung von DNA	42
2.2.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution	42
2.2.1.9.	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
2.2.1.10.	Ligation von DNA-Fragmenten	42
2.2.1.11.	Plasmid-Schnell-Präparation	43
2.2.1.12.	Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA Midi- und Maxi- Plasmidpräparation	43
2.2.1.13.	DNA-Sequenzierung	44
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	44
2.2.2.1.	Kultivierung von <i>E.coli</i>	44
2.2.2.2.	Herstellung kompetenter Bakterien	45
2.2.2.3.	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien durch Hitzeschock	45
2.2.2.4.	Expression von rekombinanten Fusionsproteinen und Zellaufschluß	45
2.2.2.5.	Pilotexpression von His ₆ -Tag Fusionsprotein	45
2.2.2.6.	Expression von rekombinanten His ₆ -Tag Fusions-Protein	46
2.2.2.7.	Zellaufschluß	46
2.2.2.8.	Expression der GST-Fusionsproteine und Zellaufschluß	46
2.2.3.	Zellbiologische Methoden	47
2.2.3.1.	Kultivierung und Passagieren von eukaryontischen Zellen	47
2.2.3.2.	Auftauen und Einfrieren von Zellen	47
2.2.3.3.	Transfektion von eukaryontischen Zellen mittels Lipofektion	47
2.2.3.4.	Quantifizierung der TMcytNCAM-transient transfizierten PC12-Zellen	48
2.2.3.5.	Differenzierung von NGF- und NCAM-stimulierten PC12-Zellen	48
2.2.3.6.	Quantifizierung der Neuritenlängen von PC12-Zellen	48
2.2.3.7.	Indirekte Immunfluoreszenz	49
2.2.4.	Biochemische Methoden	49
2.2.4.1.	Proteinbestimmung	49
2.2.4.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.2.4.3.	Westernblotting	50
2.2.4.4.	Färben der Gele	51
2.2.4.5.	Solubilisation von Zellen	52

2.2.4.6.	Aufarbeitung von Cytosol sowie Membran- und Cytoskelettprotein-angereicherte Fraktionen aus Rattenhirn	52
2.2.4.7.	Herstellung von Maushirnhomogenisat für die Immunpräzipitation	52
2.2.4.8.	Chromatographische Methoden	53
2.2.4.8.1.	Kopplung des mAk 5B8 an Cyanbromid-aktivierter Sepharose 4B	53
2.2.4.8.2.	Kopplung der Liganden (cytNCAM, Kontrollprotein) an Cyanbromid-aktivierter Sepharose	53
2.2.4.8.3.	Isolierung und Reinigung von überexprimierten cytNCAM durch Immunaффinitätschromatographie	53
2.2.4.8.4.	Reinigung von überexprimierten poly-Histidin-markierten Fusionsproteinen durch Ni-NTA-Aффinitätschromatographie	54
2.2.4.8.5.	Umpuffern und Konzentrierung der cytNCAM-Fusionsproteine und des Kontrollproteins	54
2.2.4.8.6.	Ligandenaffinitätschromatographie	55
2.2.4.9.	Immunpräzipitation	55
2.2.4.10.	Reinigung von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen	56
2.2.4.11.	Pull-down mit GST-LANP oder GST-PLC γ	56
2.2.4.12.	Identifizierung von Proteinen	57
2.2.4.12.1.	Tryptischer Verdau von Proteinen im Polyacrylamidgel	57
2.2.4.12.2.	Entsalzen von Proben mit Zip-Tip	57
2.2.4.12.3.	Herstellung des Matrixüberstandes	58
2.2.4.12.4.	Peptide-Mass-Fingerprinting	58
3.	Ergebnisse	59
3.1.	Klonierung der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180	59
3.1.1.	DNA-Amplifizierung der cytosolischen Domänen von NCAM aus PC12-Zellen und Rattenhirn	59
3.1.2.	Klonierung der cytNCAM-cDNAs in den prokaryontischen Expressionsvektor pRSET C	62
3.1.3.	Klonierung der TMcytNCAM-cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1	62
3.1.4.	NCAM-Sequenzvergleiche von Ratte und Maus auf cDNA- und Proteinebene	65
3.2.	Die Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 bei der neuronalen Differenzierung	69
3.2.1.	Expression der cytoplasmatischen Domänen von NCAM in PC12-Zellen	69
3.2.1.1.	Nachweis der transienten Expression von TMcytNCAM 140 und TMcytNCAM 180 in PC12-Zellen mittels Westernblot-Analyse	69
3.2.1.2.	Nachweis der TMcytNCAM140- und TMcytNCAM 180-Proteinexpression durch Immunfluoreszenz	71

3.2.2.	Stimulation des NCAM-vermittelten Neuritenwachstum in PC12-Zellen mit löslichen NCAM	72
3.2.3.	NCAM vermitteltes Neuritenwachstum in TMcytNCAM-transfizierten PC12-Zellen	73
3.3.	Identifizierung und Charakterisierung intrazellulärer Bindungspartner von NCAM 140 und NCAM 180	76
3.3.1.	Expression der rekombinanten cytNCAM-Fusionsproteine in <i>E.coli</i>	76
3.3.2.	Expression des Kontrollproteins in <i>E. coli</i>	78
3.3.3.	Reinigung der rekombinanten cytNCAM-Fusionsproteine	79
3.3.3.1.	Aufreinigung von rekombinanten cytNCAM über Immunaффinitätschromatographie	79
3.3.4.	Reinigung des Kontrollproteins durch Ni ²⁺ -NTA-Chromatographie	80
3.3.5.	Identifizierung potentieller cytNCAM-Bindungspartner durch Ligandenaffinitätschromatographie	81
3.3.5.1.	SDS-PAGE-Analyse der cytNCAM-bindenden Proteine	81
3.3.5.2.	Tryptischer Verdau der Bindungskandidaten und Analyse der Peptide im MALDI-TOF-MS	85
3.3.5.3.	Nachweis der potentiellen Bindungspartner von cytNCAM durch Westernblot-Analyse	87
3.3.6.	Coimmunpräzipitations-Studien mit dem NCAM-spezifischen Antikörper H28	91
3.3.6.1.	Coimmunpräzipitation von PLC γ , ROK α und Spectrin mit NCAM	91
3.3.7.	Pull-down-Experimente	93
3.3.7.1.	Pull-down-Experimente mit rekombinanten GST-PLC γ -Konstrukten	93
3.3.7.2.	Pull-down-Experimente mit rekombinanten GST-LANP	97
3.3.8.	Immunfluoreszenz-Analysen der potentiellen intrazellulären Bindungspartner von NCAM	98
3.3.9.	Untersuchungen zum Einfluß der ROK α -Inhibition auf das Neuritenwachstum von PC12-Zellen	100
3.3.10.	Expression der potentiellen Bindungspartner in PC12-Zellen nach Stimulation mit NGF und/oder löslichen NCAM	103
4.	Diskussion	104
4.1.	Die Primärstruktur von NCAM 180 der Ratte	104
4.2.	Die Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM bei der neuronalen Differenzierung	106
4.2.1.	Transiente Expression der cytoplasmatischen Domänen von NCAM in PC12-Zellen	106
4.2.2.	Untersuchungen zum NCAM-vermittelten Neuritenwachstum in PC12-Zellen	106

4.3.	Identifizierung neuer potentieller Bindungspartner für die cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180	110
5.	Zusammenfassung	121
6.	Literatur	125
	Anhang	143
	Proteinsequenzen	143
	Zusatzprojekt	146
	Stimulierung von neuronalen Zellen durch den synthetischen Sialinsäurevorläufer N-Propanoylmannosamin (ManNProp)	
	Veröffentlichungen	151
	Lebenslauf	152
	Danksagung	153

Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	Actin-Related-Protein
AS	Aminosäure
BDNF	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor
BSA	Rinderserum-Albumin
CAM	Cell-Adhesion-Molecule
CaMK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Kinase
Cas	Crk-Associated-Substrate
CD	Cluster-of-Differentiation
CEACAM	Carcinoembryonic-Antigen-Related-Cell-Adhesion-Molecule
CNBr	Cyanbromid
CRE	cAMP-Response-Element
CREB	cAMP-Response-Element-Binding Protein
Cyt	cytosolische Domäne
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-Regulated-Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Focal-Adhesion-Kinase
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FGF-R	Fibroblast-Growth-Factor-Receptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FN	Fibronectin
Gab1	Grb-Associated-Binder 1
GAM	Goat-anti-Mouse
GAR	Goat-anti-Rabbit
GAP-43	Growth-Associated-Protein-43
GDNF	Glia-Cell-Line-Derived-Neurotrophic-Factor
GEF	GTP-Exchange-Factor
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
Grb 2	Growth Factor-Rezeptor-Binding-Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
His	Histidin
ICAM	Intercellular-Adhesion-Molecule
Ig	Immunglobulin
IgCAM	Immunglobulin-artige Zelladhäsionsmoleküle
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
IP ₃	Inositoltrisphosphat
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminal Kinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
K IV	Kollagen IV
LANP	Leucin-Rich-Acidic-Nuclear-Protein
mAk	monoklonaler Antikörper
MAG	Myelin-Associated-Glykoprotein
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization Time-of-Flight Massenspektroskopie
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
MAPKK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase-Kinase
MLC	Myosin-Light-Chain

Abkürzungen

MEK	MAP-ERK-Kinase
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
mRNA	Messenger-RNA
MSK	Mitogen-and-Stress-Activated-Protein-Kinase
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül (Neural-Cell-Adhesion-Molecule)
NgCAM	Neuron-Glia-Cell-Adhesion-Molecule
NMR	Nuclear-Magnetic-Resonance
NrCAM	NgCAM-related Cell-Adhesion-Molecule
NGF	Nerve-Growth-Factor (Nerven-Wachstumsfaktor)
N-WASP	Neural-Wiskott-Aldrich-Syndrome-Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC12-Zellen	Pheochromocytoma-Zellen
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PH	Pleckstrin-Homology
PHAP-1	Putative-Human-Leukocyte-Antigen-Class II-Associated-Protein
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PND	Post-Natal-Day
PSA	Polysialic acid
PST	Polysialyltransferase
PYK2	Proline-Rich-Tyrosine-Kinase
RAM	Rabbit-anti-Mouse
ROK α	RhoA-binding-Kinase α
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds-per-Minute)
RSK	Ribosomale Protein S6-Kinase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium-Dodecyl-Sulfate)
SH	src-Homology
SOS	Son-of-Sevenless
SRE	Serum-Response-Element
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TOAD-64	Turned-On-After-Division-64
ü.N.	über Nacht
TRIC	Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
VASE	Variable-Alternative-Spliced-Exon
VCP	Valosin-Containing-Protein
WT	Wildtyp