

1. Einleitung

1.1. Die Zelladhäsion

Zelladhäsionsvorgänge sind für die Formierung und Erhaltung von Gewebestrukturen in einem vielzelligen Organismus unentbehrlich und waren für die Entstehung der Metazoa eine notwendige Voraussetzung. Zelladhäsion spielt eine zentrale Rolle bei Proliferation, Differenzierung, Migration und Zellaggregation; Prozesse, die für die Bildung funktionsfähiger Gewebe und Organe notwendig sind. Im adulten Organismus sind Änderungen der Zelladhäsion für zahlreiche physiologische Vorgänge wie Lymphocytenwanderung, Homöostase und Wundheilung als auch bei pathologischen Prozessen, wie Tumorentstehung, -wachstum und Metastasierung, essentiell [Hynes & Lander, 1992].

Als Zelladhäsion wird der über Zelladhäsionsmoleküle vermittelte Kontakt zu einer Nachbarzelle (Zell-Zell-Adhäsion) oder zu Bestandteilen der Extrazellulären Matrix (EZM) (Zell-Matrix-Adhäsion) bezeichnet. Während Zell-Zell-Adhäsionsvorgänge in der Histogenese entscheidend für die Ablösung ganzer Zellgruppen oder einzelner Zellen aus einem Zellverband (Segregation und Dispersion) und für die Aggregation von Zellen sind, überwiegen Zell-Matrix-Interaktionen bei der Migration von Zellen. Beim Auswachsen von Neuriten als auch deren zielgerichteten Lenkung sind beide Zelladhäsionsformen von Bedeutung. Die zeitliche und räumliche Regulation der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle ist für den richtigen Ablauf morphogenetischer Vorgänge entscheidend. Zelladhäsionsmoleküle wirken nicht nur als mechanisch-dynamische Kontaktelemente, sie können außerdem als Signalvermittler fungieren, also Signale aus der unmittelbaren Umgebung aufnehmen, integrieren und ins Zellinnere weiterleiten, weswegen sie auch als Adhäsionsrezeptoren bezeichnet werden. Aktivierung von Zelladhäsionsmolekülen können intrazellulär sowohl zu Umstrukturierung des Cytoskeletts als auch zur Initiation von Signaltransduktionsprozessen führen, die z.B. auch zu einer veränderten Genexpression führen können [Aplin et al., 1998]. Viele Adhäsionsmoleküle sind mit Elementen des Cytoskeletts und/oder mit intrazellulären Signalmolekülen, wie Proteinkinasen und Phosphatasen oder mit Adapterproteinen assoziiert. Sie können aber auch selber Kinase- oder Phosphatasedomänen besitzen oder lateral mit anderen Rezeptorproteinen, wie z.B. Rezeptor-tyrosinkinasen, assoziiert sein.

1.2. Zelladhäsionsmoleküle

Bei den Zelladhäsionsmolekülen handelt es sich meist um transmembranäre Glykoproteine, die über eine cytoplasmatische Domäne unterschiedlichster Länge verfügen. Einige Zelladhäsionsmoleküle oder bestimmte Isoformen besitzen keine cytoplasmatische Domäne und sind über einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Rest in der Membran verankert. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten lassen sich die Zelladhäsionsmoleküle in vier Groß-

familien einteilen: die Cadherine, die Selektine, die Integrine und die Familie der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF).

Die **Cadherine** sind Zelladhäsionsmoleküle, die sehr starke Ca^{2+} -abhängige Zell-Zelladhäsion über homophile Bindung vermitteln und eine wichtige Rolle in der Gewebeentwicklung und in der Aufrechterhaltung normaler Gewebestrukturen im adulten Organismus spielen. Zu den klassischen Cadherinen gehören mindestens 15 verschiedene Mitglieder, einige von ihnen werden nach ihrem Vorkommen in bestimmten Geweben benannt: die E-Cadherine (epithelial), die N-(neuronal)- und die P-(plazental)-Cadherine, R- und B-Cadherine [Takeichi, 1995]. Sie kommen in spezialisierten Zellkontaktbereichen vor, der Zonula adherens, wo die Cadherine intrazellulär über Catenine (β -, α -) mit dem Actincytoskelett verbunden sind und in den Desmosomen, wo sie Verbindungen mit Intermediärfilamenten eingehen [Cowin & Burke, 1996]. Cadherine sind auch in der Lage, über β -Catenin Signale weiter zu leiten, die an den wingless/Wnt-Signalweg anschließen [Orsulic & Peifer, 1996]. Die kleine Familie der **Selektine**, bestehend aus den drei Mitgliedern der L-(Leukocyten), P-(Plättchen), und E-(Endothel)-Selektine, werden auf Endothelzellen und verschiedenen Blutzellen exprimiert und vermitteln schwache Ca^{2+} -abhängige heterophile Zell-Zelladhäsion zwischen Blutzellen und Endothelzellen und zwischen Blutzellen untereinander [Tedder et al., 1995]. Über ihre N-terminale Typ-C-Lektindomäne erkennen und binden sie Ca^{2+} -abhängig an eine spezielle Tetrasaccharidstruktur des Liganden, die sogenannten Sialyl-Lewis-X-Struktur [Foxall et al., 1992] [Erbe et al., 1993]. Bei Entzündungsreaktionen und beim Lymphocytenhoming sind die Selektine für den ersten Kontakt der Lymphocyten mit dem Endothel und dem anschließenden Rollen der Zellen entlang der Endotheloberfläche verantwortlich, Prozesse, die der Migration der Leukocyten vorausgehen [Vestweber & Blanks, 1999].

Die **Integrine** stellen eine große Familie von Glykoproteinen dar, die Zell-Matrix- als auch Zell-Zell-Adhäsion vermitteln können. Sie sind transmembranäre Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Bisher sind mindestens 24 verschiedene Heterodimere beschrieben worden, die sich durch Kombination einer der 8 β - und einer der 18 α -Untereinheiten ergeben [Juliano, 2002]. Die β 1-Integrine sind auf allen Zelltypen vorhanden und binden hauptsächlich an Komponenten der Extrazellulären Matrix wie Kollagen, Laminin, Fibronectin und Vitronectin. Dabei zeigen die verschiedenen Heterodimere unterschiedliche Ligandenspezifität, wobei ein Heterodimer oft mehrere EZM-Proteine binden kann. Die vier bekannten β 2-Integrine werden nach Aktivierung durch chemotaktische Faktoren (z.B. IL-8 oder Plättchenaktivierender Faktor) auf Leukocyten exprimiert und vermitteln über heterophile Interaktionen zu Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie Kontakt zu anderen Leukocyten oder Endothelzellen [Albelda et al., 1994]. Im Gegensatz zu den Selektinen bewirken die Integrine eine stärkere Adhäsion am Endothel und leiten die Transmigration der Leukocyten in das Gewebe ein.

1.3. Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) stellt die größte Familie struktur-verwandter Proteine dar, die über 100 Mitglieder umfaßt [Brummendorf & Rathjen, 1995]. Sie kommen in Vertebraten aber auch in Invertebraten, wie z.B. Drosophila, vor und zeichnen sich alle durch die Anwesenheit eines gemeinsamen Strukturelementes aus: Das Vorhandensein mindestens einer Immunglobulin-artigen Domäne (Ig) im extrazellulären Proteinbereich. Solche Domänen, die auch für Antikörper charakteristisch sind, bestehen aus 70-110 Aminosäuren, die zwei antiparallele β -Faltblätter bilden, welche über eine Disulfidbrücke zusammen gehalten werden (2 Cysteinreste pro Ig-Domäne charakteristisch) [Vaughn & Bjorkman, 1996]. Es kommen vier verschiedene Typen von Ig-ähnlichen Domänen vor, Typ C1, C2 und V, die den konstanten (C) Teil bzw. den variablen (V) Teil von Immunglobulinen ähneln, sowie der I-Typ (intermediär) [Williams & Barclay, 1988]. Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie können die unterschiedlichsten Funktionen haben. Eine Untergruppe stellen die Zelladhäsionsmoleküle der IgSF dar. Sie sind meist stark glykosylierte transmembranäre Proteine, die Ca^{2+} -unabhängige Zell-Zell-Adhäsion vermitteln. Viele spielen im Immunsystem eine wichtige Rolle, wie der T-Zell- und der B-Zellrezeptor, die Corezeptoren CD4, CD8, CD 28, die MHC-Moleküle der Klasse 1 und 2, sowie die auf aktivierten Endothelzellen exprimierte ICAMs 1-3 (Inter-Cellular-Adhesion-Molecules) [Alberts et al., 1997]. Eine andere große Unterfamilie umfaßt die Zelladhäsionsmoleküle des Nervensystems, die eine wichtige Rolle beim Auswachsen von Neuriten und der Entstehung und Aufrechterhaltung neuronaler Verbindungen spielen [Baldwin et al., 1996]. Viele dieser Mitglieder besitzen neben Wiederholungen von Ig-Domänen ein oder mehrere Fibronectin-Typ III-Domänen, eine 90 Aminosäuren-lange Struktur, die als erstes in dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin gefunden wurde [Main et al., 1992]. Zu dieser Gruppe gehört das gut charakterisierte neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM, sowie L1, NgCAM (Neuron-Glia-Cell-Adhesion-Molecule), NrCAM, Tag-1 (Ratte), F3 (Maus)/F11 (Hühnchen), MAG (Myelin-Associated-Glycoprotein) und P₀. MAG und P₀ besitzen keine FN-Domäne. In Abb. 1 und Tab.1 sind einige Zelladhäsionsmoleküle des Nervensystems dargestellt. In verschiedenen Vertebraten aber auch in Invertebraten wie Drosophila oder Grashüpfer konnten Homologe einiger der IgCAMs (Immunglobulin-artige-Zelladhäsionsmoleküle) identifiziert werden.

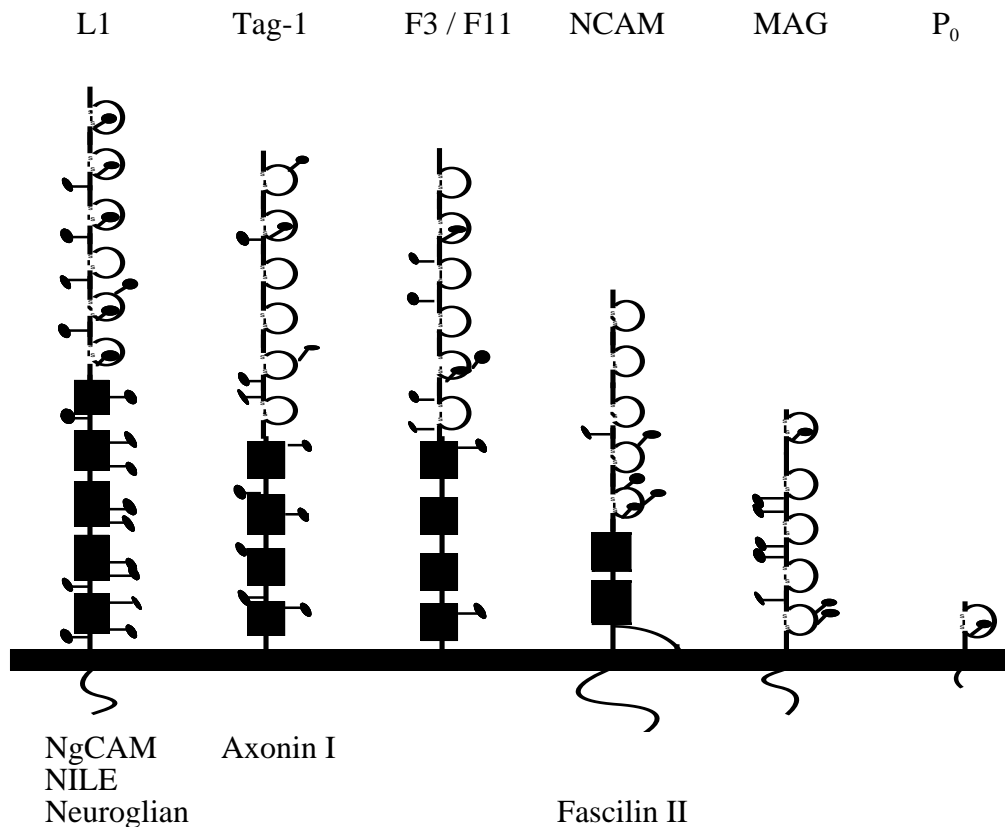


Abb. 1: Mitglieder von Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie im Nervensystem.

Immunglobulin-ähnliche Domänen sind durch offene Kreise, Fibronectin-Typ III homologe Domänen durch schwarze Kästen dargestellt. F3 (Maus), F11 (Huhn) und Axonin-1 (Huhn) ähneln strukturell Tag-1 (Ratte). In *Drosophila* konnte Neuroglian als potentielles L1-Homolog, Fascilin II als NCAM-Homolog und Fascilin III als NgCAM-Homolog identifiziert werden. Die in Hühnchen vorkommenden Moleküle NgCAM und NrCAM sind homolog zu L1.

Während die meisten der hier aufgezählten neuronalen Zelladhäsionsmoleküle hauptsächlich homophile Zell-Zell-Adhäsion vermitteln, aber auch heterophile Bindungen eingehen können, sind bei den Adhäsionsmolekülen des Immunsystems heterophile Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen (heterotypisch) dominant. So interagiert z.B. der T-Zellrezeptor mit dem MHC-Klasse-2-Protein und dem Antigenfragment der Antigen-präsentierenden Zelle oder die auf aktivierten Endothelzellen exprimierten ICAMs mit β 2-Integrinen der Leukocyten.

CAM	Adhäsion	Ligand	n Ig-Dom.	n FN-Dom.	Membran-Verankerung	Gewebe-verteilung	Spezies
L1 / NgCAM / NILE	+	L1, $\alpha\beta$ 1-, α v β 3-Integrin, Axonin-1, F11 Neuropilin-1 Semaphorin	6	5	TM	Neurone Epithelzellen	Mensch, Huhn, Ratte
Neuroglian	+	Neuroglian	6	5	TM	Neurone Glia	Drosophila
TAG-1	+	Ng-CAM	6	4	GPI	Neurone	Ratte
F11 / F3 (Contactin)	+	NgCAM NrCAM, TN-R, TN-C, RPTP β/ζ , Restrictin	6	4	GPI	Neurone	Huhn Maus
NCAM	+	NCAM Heparansulfat Neurocan, L1 Phosphacan,	5	2	TM/GPI	Neurone, Glia, Muskel	Säuger, Vögel, Amphibien
Fascilin II	+	Fascilin II	5	2	TM	Neurone	Drosophila Heuschrecke
MAG	+	Collagen Heparin, Ganglioside	5	-	TM	Glia	Mensch Nager
P ₀	-	P ₀	1	-	TM	Schwanzzellen	Vertebraten
DCC (Deleted in-Colorectal-Carcinoma)	+	Netrin	4	6	TM	Neurone	Säuger

Tab. 1: Zelladhäsionsmoleküle des Nervensystems (Auswahl).

1.4. Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM

1.4.1. Vorkommen, Struktur und Splicevarianten

Als eines der ersten Ig-artigen Zelladhäsionsmoleküle wurde NCAM erstmals 1977 aus embryonalen Hühnergewebe isoliert [Thiery et al., 1977]. Während der Embryonalentwicklung wird NCAM bereits im Blastoderm und anschließend in Ektoderm- und Mesodermderivaten, wie Neuralplatte, Neuralrohr und Endothel exprimiert und spielt zusammen mit anderen Zelladhäsionsmolekülen eine wichtige Rolle in der Zellgruppenformierung sowie in Prozessen der neuronalen Entwicklung, wie der Migration von Neuroblasten und dem regulierten Auswachsen von Neuriten (siehe 1.4.7, 1.5.1; [Edelman, 1985]). Während im weiteren Verlauf der Entwicklung die NCAM-Expression in den meisten Geweben/Organen zurückgeht, bleibt NCAM im adulten Organismus hauptsächlich im Nervensystem präsent. Aber auch einige nicht-neuronale Zellen wie Skelettmuskelzellen, β -Zellen des Pankreas, Fibroblasten des Ischiasnerves, natürliche Killerzellen, sowie einige endokrine Gewebe

exprimieren NCAM auf ihrer Zelloberfläche. Im zentralen Nervensystem (ZNS) wird NCAM von Neuronen, Astrocyten und Gliazellen exprimiert und vermittelt Zelladhäsion zwischen Neuronen untereinander, zwischen Neuronen und Astrocyten und zwischen Astrocyten untereinander [Keilhauer et al., 1985]. Im peripheren Nervensystem wird NCAM von Neuronen und Schwannzellen synthetisiert.

Auf Proteinebene existieren für NCAM im Hirn drei Haupt-Isoformen, die aufgrund ihrer apparenten Molekulargewichte im SDS-PAGE als NCAM 180, NCAM 140 und NCAM 120 bezeichnet werden [Goridis et al., 1983]. Alle NCAM-Isoformen entstehen durch alternatives Splicen einer prä-mRNA, die das Transkriptionsprodukt eines einzelnen NCAM-Gens darstellt [Owens et al., 1987]. Das NCAM-Gen liegt bei der Maus auf Chromosom 9 und bei Huhn und Mensch auf Chromosom 11. Die beiden großen Isoformen NCAM 180 und NCAM 140 sind transmembranäre Glykoproteine mit cytoplasmatischen Domänen unterschiedlicher Größe. NCAM 120 dagegen ist über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Plasmamembran befestigt.

Der extrazelluläre Bereich besteht bei allen NCAM-Molekülen aus 5 Ig-artigen Domänen und zwei membrannahen Fibronectin Typ-III-Domänen [Cunningham et al., 1987]. NCAM verfügt im extrazellulären Bereich über 6 potentielle N-gebundene Glykosylierungsstellen. Eine einzigartige posttranslationale Modifikation von NCAM ist die Polysialylierung der N-Glykane der drei Glykosylierungsstellen der 5. Ig-artigen Domäne [Nelson et al., 1995].

Durch alternatives Splicen können weitere 20-30 Isoformen generiert werden, die Varianten der drei Hauptisoformen darstellen [Goridis & Brunet, 1992]. Viele dieser Isoformen entstehen durch alternatives Splicen der extrazellulären Domäne, manche von ihnen sind Gewebe- oder Entwicklungsstadium-spezifisch [Santoni et al., 1987]. Im Muskel des Menschen konnte z.B. eine NCAM-cDNA identifiziert werden, die einer Splicevariante der NCAM-120-Isoform entspricht und auf Proteinebene über zusätzliche 37 Aminosäuren stromabwärts der 5. Ig-artigen Domäne verfügt [Dickson et al., 1987]. In den NCAM-Transkripten des Hirns befinden sich im kodierenden Bereich für die extrazelluläre Domäne zwei Splicestellen, die als α und π bezeichnet werden. Das π -Exon, das auch als VASE (Variable-Alternative-Spliced-Exon) bekannt ist, kodiert für ein zusätzliches 10 Aminosäuren langes Insert innerhalb der 4. Ig-artigen Domäne von NCAM und ist deswegen interessant, weil es die Funktion von NCAM entscheidend modulieren kann (siehe 1.5.1.). Die Expression des VASE-Exons wird entwicklungsabhängig reguliert [Santoni et al., 1987] [Saffell et al., 1994]. An der Splicestelle α zwischen Exon 12 und Exon 13 können alternativ 15, 48 oder 42 Nukleotide und / oder das Trinukleotid AAG inseriert werden, eine Region die stromabwärts der für die 5. Ig-artige Domäne-kodierenden DNA liegt [Barthels et al., 1992].

Es existieren auch lösliche Formen von NCAM, die im Hirn, in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Blut identifiziert werden konnten. Es handelt sich dabei um in den Extrazellularraum entlassene NCAM-120-Moleküle oder durch extrazelluläre Spaltung der transmembranären Isoformen entstehende Moleküle. Es konnten aber auch intakte transmembranäre Formen identifiziert werden, was auf eine Sekretion dieser Formen hindeutet [Krog et al., 1992; Olsen et al., 1993]. Die Funktion der löslichen Isoformen in den Gewebsflüssigkeiten ist noch nicht

geklärt. Möglicherweise modulieren sie durch Bindung an zelluläres NCAM die NCAM-vermittelte Zell-Zelladhäsion. In vitro-Untersuchungen zeigten, daß an der Astrocytenoberfläche gebundenes NCAM die Astrocytenproliferation hemmt [Krushel et al., 1998]. Außerdem kann lösliches NCAM die Migration von Schwannzellen stimulieren [Thomaidou et al., 2001]. Lösliches NCAM hemmt die Proliferation hippocampaler Vorläuferzellen und induziert deren Differenzierung [Shin et al., 2002].

1.4.2. Unterschiede in der räumlichen und zeitlichen Expression und Funktion der drei Hauptisoformen

Die cytoplasmatische Domäne von NCAM 180 verfügt gegenüber NCAM 140 über ein zusätzliches Insert von 267 Aminosäuren (Maus) (kodiert von Exon 18), während die flankierenden Regionen mit NCAM 140 identisch sind.

Für NCAM 180 ergeben sich daher theoretisch mehr intrazelluläre Interaktionsmöglichkeiten. Eine Interaktion von NCAM 180 mit dem Cytoskelett-Membran-Verbindungsmolekül Spectrin konnte das erste Mal 1987 gezeigt werden, wo Spectrin zusammen mit NCAM 180 durch Immunitätschromatographie gereinigt wurde [Pollerberg et al., 1987].

Die Assoziation mit dem Actin-Cytoskelett wurde als Ursache für die reduzierte laterale Mobilität von NCAM 180 in der Membran gegenüber NCAM 140 diskutiert [Pollerberg et al., 1986]. Nur für NCAM 140 konnte in Immunpräzipitationsstudien eine Assoziation mit der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p59fyn und der fokalen Adhäsionskinase (FAK) nachgewiesen werden [Beggs et al., 1997]. Die drei NCAM-Isoformen sind nicht homogen auf allen NCAM-exprimierenden Zellen verteilt, sondern können sowohl von verschiedenen Zell-Typen exprimiert werden als auch innerhalb der Zelle unterschiedlich lokalisiert sein. So wird NCAM 140 vor allem im Bereich der Wachstumskegel von auswachsenden Neuriten exprimiert, während NCAM 180 an Zell-Zell-Kontakt-Stellen (Soma, Neuriten, Wachstumskegel) akkumuliert vorliegt. NCAM 180 wird eine Rolle in der Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte aufgrund seiner Assoziation mit dem Cytoskelett zugeschrieben [Pollerberg et al., 1985]. Versuche mit Latex-Beads lieferten Hinweise, daß Moleküle der EZM direkt oder indirekt die Akkumulation von NCAM 180 in die Zellkontaktbereiche stimulieren [Pollerberg et al., 1990]. NCAM 140 konnte auf prä- und postsynaptischen Membranen identifiziert werden, während NCAM 180 nur auf der postsynaptischen Seite vorkommt. Aber nicht alle postsynaptischen Membranen exprimieren NCAM 180 [Persohn et al., 1989].

NCAM 180 ist exklusiv in neuronalen Geweben anzutreffen (im ZNS: Neurone, Oligodendrocyten, Astrocyten) und wird vermutlich erst exprimiert, wenn die Zellen bereits differenziert sind [Pollerberg et al., 1985]. NCAM 140 wird sowohl von Neuronen als auch von Muskelzellen synthetisiert. NCAM 120 ist hauptsächlich auf Gliazellen zu finden. Außerdem wird es auch von einigen Neuronen und Muskelzellen exprimiert und erscheint später in der Entwicklung als die beiden anderen Isoformen. Alle Isoformen können in bestimmten Membranbereichen, den sogenannten „lipid rafts“ anwesend sein. Diese

Membranbereiche stellen detergentenresistente Mikrodomänen dar, die einen hohen Cholesterin- und Sphingolipid-Gehalt aufweisen. Während NCAM 120 häufig in „lipid rafts“ zu finden ist, befindet sich der größte Anteil der transmembranären Isoformen außerhalb der „lipid rafts“ und ein geringer Anteil (2% der NCAM-140-Moleküle) in „lipid rafts“ [Niethammer et al., 2002]. Für die Präsenz der transmembranären NCAM-Isoformen in „lipid rafts“ sind die vier Palmitoylierungsstellen von Bedeutung [Niethammer et al., 2002].

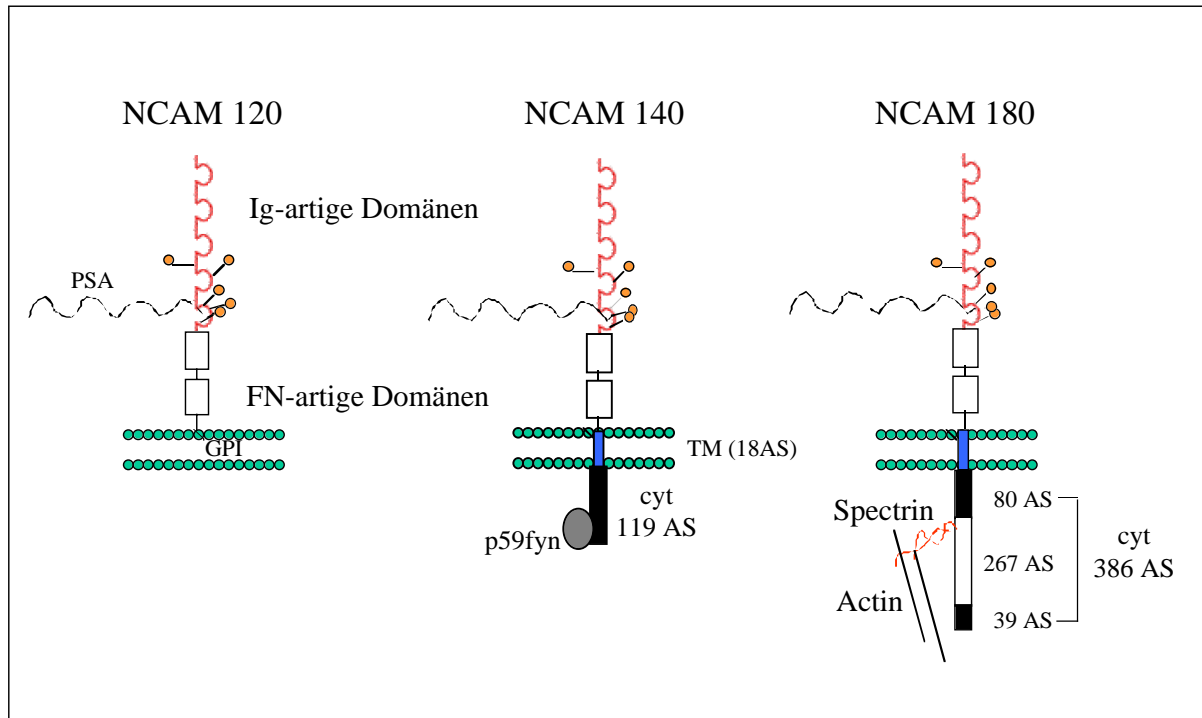


Abb. 2: Schematische Darstellung der drei Hauptisoformen von NCAM.

AS: Aminosäuren; Ig: Immunglobulin; FN: Fibronectin; cyt: cytosolische Domäne.

1.4.3. Ligandenbindung - Bindungseigenschaften

NCAM vermittelt homophile Ca^{2+} -unabhängige (NCAM-NCAM) Zelladhäsion. Es gibt verschiedene Hypothesen und Beobachtungen, welche der extrazellulären Domänen an der homophilen Interaktionen beteiligt sind. Rao et al. (1994) konnten beobachten, daß eine Dekapeptidsequenz innerhalb der 3. Ig-artigen Domäne reziprokal direkt an die gleiche Sequenz im gegenüberliegenden NCAM-Molekül bindet.

Ranheim et al. (1996) schlagen vor, daß alle 5 Ig-Domänen des einen NCAM-Moleküls mit denen des anderen NCAMs in antiparalleler Orientierung interagieren: Ig I mit Ig V; Ig II mit Ig IV und Ig III mit Ig III. Eine neuere Theorie von zwei Forschungsgruppen besagt, daß die 1. Ig-Domäne des einen NCAM-Moleküls mit der 2. Ig-Domäne des anderen Moleküls in einer antiparallelen Orientierung interagiert. Für diese Annahme sprachen NMR-Spektroskopie-Untersuchungen und Versuche mit der 1. Ig-Domäne als rekombinantes Fusionsprotein [Atkins et al., 1999] [Kiselyov et al., 1997b].

Unabhängig davon löst die homophile NCAM-NCAM-Interaktion eine Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden aus, die unter 1.5. besprochen werden.

Es wird vermutet, daß die Fibronectin-Domänen möglicherweise an cis-Interaktionen zwischen benachbarten NCAM-Molekülen der gleichen Zelle beteiligt sind [Peck & Walsh, 1993].

NCAM hat neben den homophilen auch heterophile Bindungseigenschaften. So verfügt die zweite Ig-artige Domäne über eine 17 Aminosäuren lange Heparin-Sulfat-Bindedomäne und ermöglicht NCAM eine heterophile Bindung an den in der Basallamina vorkommenden Proteoglykan [Cole & Akeson, 1989]. Auch für die 1. Ig-Domäne konnte die Bindung an Heparin nachgewiesen werden. Beide Domänen sind außerdem in der Lage, über Heparin an Kollagen I zu binden [Kiselyov et al., 1997a].

Auch das im Hirn und Knorpel vorkommende Neurocan, ein Sulfat-Proteoglykan bindet an NCAM und könnte die Adhäsion und Neuritenstimulation hemmen, wie es für seine Interaktion mit NgCAM gezeigt wurde [Friedlander et al., 1994].

In der 4. Ig-artigen Domäne besitzt NCAM eine Lektindomäne, über welche NCAM mit einem oligomannosidischen Glykan von L1 auf der gleichen Zelle eine cis-Interaktion eingehen kann. Dieser NCAM-L1-Komplex verstärkt die homophile Transinteraktion zu L1 (assistierte homophile Bindung) [Horstkorte et al., 1993]. Da L1 mit CD 9, einem integralen Tetraspan-Membranprotein, und CD9 mit $\alpha 6\beta 1$ -Integrinen lateral assoziiert sein kann, steht auch NCAM indirekt über L1 mit diesen Molekülen in Verbindung [Schmidt et al., 1996].

Kürzlich konnte die lang spekulierte direkte Interaktion des FGF-Rezeptors mit NCAM durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse nachgewiesen werden [Kiselyov et al., 2003]. Diese Interaktion wird über die erste und zweite Fibronectin III-Domäne des NCAM-Moleküls und der zweiten und dritten Ig-artigen Domäne des FGF-Rezeptors 1 vermittelt. Auch in NMR-Untersuchungen konnte eine Interaktion zwischen der zweiten Fibronectin-Domäne von NCAM und der dritten Ig-artigen Domäne des FGF-Rezeptors 1 nachgewiesen werden. Über die gleiche Bindestelle in der zweiten FN-III-Domäne kann NCAM auch mit extrazellulären ATP interagieren. Es wird vermutet, daß ATP die NCAM-FGF-Rezeptor-Interaktion reguliert, da an NCAM gebundenes ATP eine NCAM-FGF-Rezeptorbindung verhindert. Weiterhin wird spekuliert, daß NCAM gebundenes ATP hydrolysieren kann, also eine extrazelluläre ATPase-Aktivität besitzt [Dzhandzhugazyan & Bock, 1997]. Welche Rolle die vermutete ATPase-Aktivität von NCAM in den für NCAM bekannten Funktionen spielt, ist noch nicht erforscht. Die extrazelluläre Zugabe von ATP inhibiert die Aggregation von Neuronen des Hippocampus als auch das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum [Skladchikova et al., 1999].

Vor kurzem konnte auch eine direkte extrazelluläre Interaktion des neurotrophen Wachstumsfaktors GDNF (Glial-Cell-Line-Derived-Neurotrophic-Factor) mit NCAM 140 in RN33B-Zellen, Schwannzellen und embryonalen hippocampalen Zellen durch chemisches Vernetzen mit radioaktiven GDNF (^{125}I -GDNF) nachgewiesen werden [Paratcha et al., 2003]. Weiterhin wurde in Coimmunpräzipitationen eine konstitutive Assoziation zwischen NCAM und dem GPI-verankerten GDNF-Rezeptor $\text{GFR}\alpha 1$ demonstriert. Es wird vermutet, daß die NCAM 140-Assoziation mit $\text{GFR}\alpha 1$ die GDNF-Bindung an NCAM fördert.

1.4.4. Posttranslationale Modifikationen

Alle drei NCAM-Isoformen sind posttranslational modifiziert. Modifikationen des extrazellulären Bereiches sind Glykosylierungen der Asparaginreste (N-Glykane), sowie die Sulfatierung der Asparagin-gebundenen Oligosaccharide [Sorkin et al., 1984]. Die beiden großen NCAM-Isoformen können an Serin- und Threoninresten der cytoplasmatischen Domänen phosphoryliert werden. 3 der 4 Cysteinreste der cytoplasmatischen Domäne können palmitoyliert werden [Little et al., 1998]. Die Acylierung könnte dazu dienen, NCAM zusätzlich in der Membran in bestimmten Microdomänen, wie z.B. die „lipid rafts“, zu verankern oder die Domäne für intrazelluläre Proteininteraktionen auszurichten. Das Kohlenhydratepitop HNK-1 konnte in neuralen Geweben auf einigen NCAM-Molekülen identifiziert werden [Hoffman & Edelman, 1987]. Dieses Kohlenhydrat kommt auch auf vielen anderen Zellrezeptoren und Matrixkomponenten vor. HNK ist mit sulfatierter Glucuronsäure assoziiert, seine Funktion ist nicht klar [Chou et al., 1986]. Eine ganz besondere Art der posttranslationalen Modifikation, die einzigartig für NCAM ist, stellt die Polysialylierung der 5. Ig-artigen Domäne dar.

1.4.5. Polysialylierung als Modifikation

Polysialinsäure (PSA) ist ein langes Homopolymer von α -2,8-verknüpften Sialinsäureresten ($n = 8-100$). Die Polysialylierung als posttranslationale Modifikation ist bei Vertebraten nur für NCAM und für die α -Untereinheit von Natriumkanälen des Hirns bekannt. In Prokaryoten kommt PSA als Kapselkomponente von Sepsis- und Meningitis-verursachenden Bakterien vor. NCAM besitzt in der 5. Ig-Domäne drei Asparaginreste. Dort kann an den Asparagin-geknapften N-Glykan-Grundgerüsten des komplexen Typs PSA addiert werden [Nelson et al., 1995]. Die Biosynthese von PSA findet im Golgi-Apparat statt. Es konnten zwei Polysialyltransferasen, die ST8Sia IV (PST) und die ST8Sia II (STX), identifiziert und kloniert werden, die beide in der Lage sind, NCAM zu polysialylieren [Eckhardt et al., 1995; Nakayama et al., 1995; Scheidegger et al., 1995] [Yoshida et al., 1995]. Beide Enzyme werden entwicklungsabhängig reguliert und oft zusammen in den gleichen Geweben exprimiert. Sie können kooperativ zusammenarbeiten und dann längere PSA-Ketten synthetisieren, als jede allein. Für die spezifische Erkennung und Polysialylierung eines NCAM-Moleküls benötigen die beiden Polysialyltransferasen die Ig-Domäne V, welche die drei Akzeptorstellen für PSA enthält sowie die benachbarte Ig-IV- und die erste Fibronectin-Typ III-Domäne. Außerdem ist eine Wechselwirkung mit der Membran notwendig [Nelson et al., 1995]. *In vitro*-Experimente zeigten, daß beide Polysialyltransferasen fähig sind, den ersten α -2,8-verknüpften Sialinsäurerest an die endständigen α -2,6- oder α -2,3-Sialinsäurereste des N-Glykans (komplexer Typ) zu knüpfen. Es folgen weitere Additionen von α -2,8-Sialinsäuren [Angata et al., 1998].

1.4.6. Einfluß der Polysialylierung auf die Funktion

Die Polysialylierung von NCAM wird unabhängig von der NCAM-Expression entwicklungsabhängig reguliert. Während der frühen Entwicklung sind nahezu alle NCAM-Moleküle polysialyliert (PSA-NCAM). Mit zunehmender Gewebedifferenzierung nimmt die Expression von PSA wieder ab, jedoch wird in einigen Hirnstrukturen zeitlebens PSA-NCAM exprimiert [Edelman, 1985]. Diese Hirnbereiche haben entweder die Fähigkeit behalten, Neurone zu generieren oder sie zeichnen sich durch hohe morphologische und physiologische Plastizität aus, wie Hippocampus, Hypophyse und Hypothalamus. PSA kommt auf auswachsenden Axonen und wandernden Zellen vor und hat einen entscheidenden modulatorischen Einfluß auf Zelladhäsion, Migration und Neuritenwachstum. Die erste Funktion, die PSA zugeordnet wurde, war die, daß aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der stark negativ geladenen Kohlenhydratketten und deren große Hydrathülle PSA als eine Art Platzfüller fungiert und die Adhäsionskräfte zwischen Zellen reduziert [Rutishauser et al., 1988]. So konnte sowohl eine anti-adhäsive Wirkung von PSA auf die homophile NCAM-Zelladhäsion, als auch auf die über andere Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Zell-Zell- (L1-L1) und Zell-Substrat (Integrin-Kollagen)-Interaktionen beobachtet werden [Acheson et al., 1991]. Weiterhin wurde diskutiert, daß PSA auch Auswirkungen auf cis-Interaktionen zwischen benachbarten Molekülen der gleichen Zelle hat, so daß z.B. ein stabilisierendes Clustering von NCAM-Molekülen unterbunden wird und NCAM dadurch dynamisch in der Membran verteilt ist [Doherty & Walsh, 1992]. Als Resultat fördert PSA die morphologische Plastizität, indem sie die Zelladhäsionskräfte verringert. In den 80er Jahren wurde PSA wegen der Folge einer verminderten NCAM-NCAM-Bindung als Inhibitor von NCAM-vermittelten Funktionen diskutiert. Im Laufe der Zeit wurden Befunde publiziert, die PSA als einen positiven Regulator der NCAM-Funktion beschreiben. So ließ sich zeigen, daß unpolysialyliertes NCAM weniger gut Neuritenwachstum stimulieren kann, als polysialyliertes NCAM [Doherty et al., 1990], was paradox erscheint, da für die Stimulation des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums eine homophile Interaktion der NCAM-Moleküle notwendig ist, um die entsprechende Signaltransduktion einzuleiten. In Adhäsionsversuchen mit N2A- und CHO-Zellen konnte allerdings gezeigt werden, daß diese Zellen an immobilisierten hochpolysialylierten NCAM (aus embryonalen Rattenhirn) binden [Storms et al., 1994]. Neben den rein physikalischen Eigenschaften könnte PSA also auch funktionale Eigenschaften haben, indem sie z.B. als Rezeptor wirkt oder die Bindungseigenschaften anderer Rezeptoren beeinflusst und dadurch die Funktionen von NCAM vervielfältigt.

1.4.7. Funktionen von NCAM und PSA-NCAM in der Entwicklung und im adulten Organismus

NCAM ist während der Entwicklung an zahlreichen Prozessen wie der Neurulation, der Migration von Neuroblasten, dem Auswachsen von Neuriten und deren Bündelung und an der Ausbildung von Kommunikationskontakten, wie z.B. Nerv-Muskel-Interaktionen, beteiligt. Im adulten Organismus spielt NCAM in der Aufrechterhaltung des dreidimensionalen Zellgefüges im Hirn, der Synapsenformierung und –stabilisierung sowie beim Lernen und der Gedächtnisbildung (synaptische Aktivität) eine Rolle. In Studien mit NCAM-blockierenden Antikörpern konnten viele Funktionen von NCAM aufgedeckt werden. Eine weitere Möglichkeit, NCAM-Funktionen zu untersuchen, stellt das gezielte Ausschalten des NCAM-Gens dar. **NCAM-Knock-out-Mäuse** sind lebensfähig und fertil, was zeigt, daß die Anwesenheit von NCAM bzw. PSA-NCAM zumindestens für Mäuse nicht lebensnotwendig ist [Cremer et al., 1994b] [Tomasiewicz et al., 1993]. Die Hirnmasse der Mäuse ist um 10% reduziert und besonders auffällig ist der um 37% verkleinerte Bulbus olfactoris, eine Region, in der normalerweise zeitlebens PSA-NCAM exprimiert wird. Vermutlich ist die Verhinderung der durch PSA-NCAM vermittelten Einwanderung von Neuronen in diese Region ausschlaggebend für die Verkleinerung des Bulbus olfactoris. Normalerweise wandern die nach Teilung entstehenden olfactorischen Vorläuferzellen aus den lateralen Ventrikeln entlang eines definierten Weges in den Bulbus olfactoris ein. Dabei wandern die PSA-positiven Zellen dicht hintereinander in Ketten, es kommt zu kurzzeitigen Adhäsionen und darauffolgenden Ablösen der Zellen voneinander, was durch die Anwesenheit von PSA ermöglicht wird. Für diese Art der **Zellwanderung** (kooperative Strömung) sind keine radialen Gliafasern oder Axone als Leitstrukturen notwendig [Bruses & Rutishauser, 2001]. Nach Erreichen des Bulbus wird die Kettenorganisation aufgelöst, die Neurone wandern radial auseinander (wofür kein PSA mehr erforderlich ist) und differenzieren [Hu et al., 1996]. Eine Verkleinerung des Bulbus olfactoris wird auch bei enzymatischer Entfernung von PSA beobachtet [Ono et al., 1994], was ein Hinweis ist, daß die Anwesenheit von PSA für diese Vorgänge ausschlaggebend ist und nicht NCAM allein. Weiterhin konnte bei den NCAM-Knock-out-Mäusen eine Abnahme der Dichte und eine Defascikulierung der im Gyrus dentatus des Hippocampus entspringenden Moosfasern beobachtet werden [Cremer et al., 1997]. Dies könnte auch die Defizite im räumlichen **Lernen und Gedächtnis** erklären, welche die Knock-out-Tiere im Morris-Water-Maze-Test zeigen [Cremer et al., 1994a]. Lernen und Gedächtnis sind Prozesse, die sich im Hippocampus abspielen, einer Hirnregion, wo zeitlebens PSA-NCAM und NCAM exprimiert werden und postnatale Neurogenese stattfindet. Hier kommt es nach Lernvorgängen ständig zu Neubildungen von Synapsen oder zum Loslösen von synaptischen Verbindungen, zu neuer Ausrichtung von Axonen und zur Verstärkung der synaptischen Aktivität mancher Synapsen. Der Hippocampus zeichnet sich also wie auch der Bulbus olfactoris durch hohe morphologische und funktionale Plastizität aus, wobei PSA eine wichtige Rolle spielt. Die Abwesenheit der PSA in den Moosfasern führt zu Defascikulation der Fasern und der anormalen nicht mehr lösbaren Innervierungen der Pyrimidialzellschicht [Seki & Rutishauser, 1998].

In verschiedenen Verhaltenstudien konnte ein Anstieg der PSA-NCAM-Expression im Hippocampus nach Lernprozessen beobachtet werden. So konnte eine erhöhte PSA-Expression in Ratten, die auf Gerüche trainiert wurden und raumbezogene Aufgaben erfüllen mußten, detektiert werden [Doyle et al., 1992]. Durch intrakranielle Injektion von NCAM-Antikörpern in die Hippocampusregion konnten die Lernvorgänge bei Ratten und Hühnchen blockiert werden (Passive avoidance task test) [Doyle et al., 1992].

Versuche mit Hippocampus-Kulturen, die aus NCAM-Knock-out-Mäusen präpariert wurden, zeigten einen Abfall der Langzeitpotenzierung (LTP) in der CA1-Region im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen [Muller et al., 1996]. Ebenso kann die enzymatische Entfernung von PSA in Organkulturen von Wildtyp-Mäusen oder die Injektion von NCAM-Antikörpern die Bildung von LTP in der CA1-Region inhibieren [Muller et al., 1996] [Ronn et al., 1995]. Elektrische Aktivität und Ca^{2+} -Einstrom stimulieren die Neu-Expression von PSA in Hippocampuskulturen, in denen PSA enzymatisch entfernt wurde [Kiss et al., 1994]. Unter LTP versteht man die langanhaltene Zunahme der Signalübertragung an Synapsen (Zunahme der excitatorischen postsynaptischen Potentiale), was durch hochfrequente elektrische Stimulation der hippocampalen Fasern *in vitro* oder *in vivo* stimulierbar ist. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die LTP-Defizite NCAM-defizienter Mäuse durch Zugabe von BDNF (Brain-Derived-Neurotrophic-Factor) zu Hippocampuskulturen aufgehoben werden können [Muller et al., 2000]. In NCAM-Knock-out-Mäusen kommt es außerdem zu einer Reduktion der BDNF-vermittelten Signaltransduktion [Muller et al., 2000]. BDNF ist für das Überleben von Neuroblasten notwendig. Vorherige Studien lieferten Ergebnisse, daß der Verlust oder die Inaktivierung von PSA die Überlebens- und Differenzierungsrate kortikaler Neurone verringert [Vutsits et al., 2001]. Diese Beobachtungen ließen vermuten, daß PSA die Sensibilität des BDNF-Rezeptors für BDNF bzw. die BDNF-induzierte Signalweiterleitung positiv beeinflusst. Möglicherweise spielt dabei eine cis-Interaktion mit dem BDNF-Rezeptor TrkB eine Rolle [Kiss et al., 2001].

PSA-NCAM ist auch an der **Regeneration** von zerstörten zentralen oder peripheren Nervenfasern involviert. In denervierten Muskelzellen kommt es während der Regeneration der lädierten Motoneuronen zur Reexpression von PSA-NCAM, allerdings nimmt die Fähigkeit zur Reexpression mit dem Alter ab (bei Ratten) [Olsen et al., 1995].

Viele der phänotypisch beobachteten Funktionen von NCAM sind auf die Anwesenheit von PSA zurückzuführen. So sind viele der in NCAM-defizienten Mäusen beobachteten Defekte und Defizite mit denen, die man nach enzymatischer Entfernung der PSA mit Endoneuraminidase erhält, identisch. Ein Beispiel, was dafür spricht, daß auch NCAM allein ohne PSA bei Lernvorgängen eine Rolle spielt, zeigte Cremer 1998: Die von den Körnerzellen im Gyrus dentatus ausgehenden Moosfasern gehen mit den apikalen Dendriten der Pyramidenzellen in der CA3-Region im Stratum lucidum eine synaptische Verbindung ein. Prä- und postsynaptische Membran der adulten Moosfasern bzw. der CA3-Pyramidalzellen exprimieren kein PSA mehr [Seki & Rutishauser, 1998], dafür aber viel NCAM. Auch in diesen Moosfasersynapsen konnte in NCAM-Knock-out-Mäusen ein Abfall der LTP beobachtet werden [Cremer et al., 1998].

1.5. NCAM-vermittelte Signaltransduktion

Die Beteiligung von NCAM (und anderer CAMs) an unterschiedlichen Prozessen wie Zellwanderung, axonalem Wachstum und synaptischer Plastizität lassen vermuten, daß NCAM intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktivieren kann. Erste Hinweise für eine Beteiligung von NCAM an Signaltransduktionsprozessen lieferten Studien Ende der 80er/Anfang der 90er Jahre mit primären Neuronen und PC12-Zellen, die zeigten, daß eine homophile NCAM-Bindung oder eine Stimulation der NCAM-Moleküle durch NCAM-spezifische Antikörper die Konzentration bestimmter Signalmoleküle in der Zelle ändert. So zeigten Schuch et al, daß die Zugabe von NCAM- oder L1-Antikörpern zu PC12-Zellen einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, eine Reduktion der intrazellulären Inositolphosphat-Konzentration (IP_2 , IP_3) als auch eine Abnahme des intrazellulären pH-Wertes zur Folge hat [Schuch et al., 1989]. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg kann durch Pertussis-Toxin inhibiert werden, was auf eine Beteiligung von Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteinen an diesem Prozess hindeutet. Gleiche Ergebnisse konnten bei PC12-Zellen und primären Neuronen beobachtet werden, die mit löslichen NCAM oder L1 behandelt wurden.

1.5.1. Signaltransduktion und Neuritenwachstums

Die Fähigkeit bestimmter Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), Neuritenwachstum zu stimulieren wurde in Neuritenwachstums-Assays zur Aufklärung der CAM-vermittelten Signaltransduktion genutzt. Die Verwendung von Reagentien, welche die Aktivität bestimmter Signalmoleküle blockieren oder verstärken, als auch die Überexpression von dominant negativ-Formen von Signalmolekülen, geben Aufschluß darüber, welche Signalmoleküle bei der NCAM-vermittelten Signaltransduktion und beim NCAM-vermittelten Neuritenwachstum eine Rolle spielen. Mit den Ergebnissen solcher Versuche lassen sich Modelle der NCAM-Signaltransduktion aufstellen.

In den ersten Neuritenwachstums-Experimenten wurden PC12-Zellen oder primäre Neurone auf Monolayer von NCAM/CAM-transfizierten 3T3-Fibroblasten kultiviert. Das resultierende Neuritenwachstum wurde mit dem Neuritenwachstum von Zellen, die auf nicht-transfizierten Fibroblasten wuchsen, verglichen [Doherty et al., 1989].

Mit diesem System wurde demonstriert, daß alle drei Hauptisoformen von NCAM als Liganden fungieren können und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum stimulieren. Spätere Studien zeigten, daß auch die löslichen Formen der CAMs (NCAM, L1 und N-Cadherin) als CAM-Fc-Chimeren ein CAM-abhängiges Neuritenwachstum induzieren können.

Die Fähigkeit von Neuronen, Neuriten auszubilden, ist abhängig von ihrem PSA-Gehalt sowie von der An- oder Abwesenheit des alternativ gesplizierten VASE-Exons im extrazellulären Bereich von NCAM. Hühnchen-Retina-Ganglionzellen des Embryonaltages E6, die viel PSA exprimieren, bilden z.B. längere Neuriten auf NCAM-transfizierten 3T3-Fibroblasten als Ganglionzellen vom Embryonaltag E11, die bereits weniger PSA exprimieren. Das Neuritenwachstum der Ganglionzellen vom E6 kann durch enzymatische Entfernung der PSA

von den Zellen um 35% inhibiert werden [Doherty et al., 1990]. Die Neuriten von hippocampalen Neuronen des Embryonaltags E17 sind auf NCAM-transfizierten 3T3-Zellen doppelt so lang, wie auf Kontrollsubstrat, durch enzymatische Entfernung von PSA reduziert sich die Neuritenverlängerung auf 20%. Postnatale Hippocampuszellen (PND 4 („postnatal-day“ 4) dagegen reagieren nur noch schwach auf NCAM mit Neuritenwachstum, stattdessen überwiegt zu diesem Zeitpunkt das durch N-Cadherin vermittelte Neuritenwachstum [Doherty et al., 1992b]. Diese Beispiele zeigen, daß mit abnehmenden PSA-Gehalt die Fähigkeit von NCAM, Neuritenwachstum in primären Neuronen zu stimulieren, nachläßt.

Die Anwesenheit des 10-Aminosäuren-kodierenden VASE-Exons innerhalb der 4. Ig-Domäne des NCAM-Moleküls hat ebenfalls einen modulatorischen Einfluß auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum [Doherty et al., 1992a], [Liu et al., 1993], [Saffell et al., 1994]. Das Vorkommen von VASE in NCAM-transfizierten Fibroblasten oder in den Neuronen inhibiert NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum. Im Verlauf der Entwicklung nimmt der Gehalt an VASE-exprimierenden NCAM-Molekülen zu. In adulten Ratten enthalten 50% der NCAM-Transkripte das VASE-Exon [Small & Akeson, 1990]. Die Expression des VASE-Exons ist räumlich beschränkt und ist in den Hirnregionen, die weiterhin morphologische und synaptische Plastizität zeigen, nicht anwesend [Small & Akeson, 1990].

Daß die cytoplasmatische Domäne von NCAM für die Initiation der Signaltransduktion und für die Stimulierung des Neuritenwachstums essentiell ist, konnte in Versuchen gezeigt werden, in denen NCAM 120 oder NCAM 140 mit entfernter cytoplasmatischer Domäne in PC12-Zellen überexprimiert wurden. Diese Zellen konnten nicht durch NCAM zum Neuritenwachstum stimuliert werden [Saffell et al., 1995].

NCAM, L1 und N-Cadherin sind in der Lage durch homophile Wechselwirkung Neuritenwachstum zu stimulieren. 1991 konnte gezeigt werden, daß alle drei CAMs in PC12-Zellen Neuritenwachstum über das G-Protein-abhängige Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen des L- und N-Typs stimulieren [Doherty et al., 1991b]. Pertussistoxin (hemmt G-Proteine) als auch eine Kombination von L- und N-Typ Ca^{2+} -Kanal-Blockern inhibieren dieses CAM-stimulierte Neuritenwachstum vollständig. Bei allen drei CAMs spielt dabei der second messenger Ca^{2+} eine entscheidende Rolle in der Stimulation der Neuritenbildung.

Bisher wurden zwei durch NCAM-vermittelte Signaltransduktionswege, die eine Rolle beim Neuritenwachstum spielen, aufgedeckt und intensiv untersucht. Bei dem einen handelt es sich um den durch NCAM (CAM)-Stimulation aktivierten FGF-Rezeptor-PLC γ -Signalweg, während der andere mit der Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinasen startet. Neuere Studien lassen vermuten, daß beide Signalwege über bestimmte Signalmoleküle miteinander gekoppelt sind.

1.5.1.1. Aktivierung des FGF-Rezeptor-PLC γ -Signalweges

NCAM besitzt keine intrazelluläre Kinaseaktivität, doch kann ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinasen inhibiert, das Erbstatin-Analog, NCAM- und L1-vermitteltes Neuritenwachstum inhibieren, nicht aber das Integrin-vermittelte Neuritenwachstum [Williams et al., 1994a]. Dies lieferte den ersten Hinweis für die Beteiligung einer Rezeptortyrosinkinase in der NCAM- und L1-vermittelten Signaltransduktion und bewies, daß verschiedene Rezeptortypen (CAM oder Integrine) unterschiedliche Signalwege nutzen, die zu einem Auswachsen von Neuriten führen können. Die Entdeckung einer 20 Aminosäuren langen Region in der 2. Ig-Domäne des FGF-Rezeptors, die einer kurzen Peptidsequenz innerhalb der extrazellulären Domäne von NCAM, N-Cadherin und L1 ähnelt (CAM-homologe Domäne), führte zu der Annahme, daß die CAMs direkt mit dem FGF-Rezeptor über dessen CAM-homologen Domäne interagieren könnten [Williams et al., 1994a]. Kürzlich konnte eine direkte Interaktion von NCAM mit dem FGF-Rezeptor, die über die Fibronectin-Domänen von NCAM und der zweiten und dritten Ig-artigen Domäne des FGF-Rezeptors vermittelt wird, nachgewiesen werden [Kiselyov et al., 2003]. Versuche mit dem zweiten Fibronectin III-Modul von NCAM, zeigten daß dieses Modul ausreicht, eine Aktivierung (Phosphorylierung) des FGF-Rezeptors zu bewirken.

Verschiedene pharmakologische Reagentien, die Komponenten eines FGF-Rezeptor-Signalweges inhibieren (FGF-Rezeptor-Inhibitor, PLC γ -Inhibitor, DAG-Lipase-Inhibitor, Reagentien, die den Ca²⁺-Influx in die Zelle inhibieren sowie ein Ca²⁺-/Calmodulin-Kinase-Inhibitor) hemmen das durch NCAM-, L1- und N-Cadherin stimulierte Neuritenwachstum in primären Neuronen [Hall et al., 1996; Mohammadi et al., 1998] [Williams et al., 1994c] [Brittis et al., 1996] [Doherty et al., 1991a]. Auch ein gegen den FGF-Rezeptor gerichteter Antikörper, sowie die Expression eines dominant negativen FGF-Rezeptors inhibieren das von diesen Zelladhäsionsmolekülen stimulierte Neuritenwachstum in PC12-Zellen und primären Neuronen [Williams et al., 1994a] [Saffell et al., 1997]. FGF allein ist in der Lage, über die Aktivierung des FGF-Rezeptors Neuritenwachstum zu induzieren, und die gleichen Inhibitoren können diese Antwort hemmen [Williams et al., 1994b]. Diese Beobachtungen und viele andere Experimente unterstützen daher die Hypothese, daß NCAM, L1 und N-Cadherin Neuritenwachstum über die Aktivierung des FGF-Rezeptor-PLC γ -Signalweges stimulieren können. Das Modell sieht wie folgt aus [Doherty & Walsh, 1996] [Meiri et al., 1998]:

Nach homophiler trans-Bindung gehen die Zelladhäsionsmoleküle NCAM, L1 oder N-Cadherin eine cis-Interaktion mit dem FGF-Rezeptor (über dessen CAM-homologe Domäne) ein. Daraufhin dimerisiert der Rezeptor und es folgt eine Autophosphorylierung seiner Tyrosinreste. Die Phospholipase C γ (PLC γ) bindet über ihre SH2-Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest Tyr 766 des FGF-Rezeptors. PLC γ wird phosphoryliert und hydrolysiert daraufhin das in der Membran verankerte Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) [Williams et al., 1994b]. Das cytoplasmatische IP₃ bewirkt eine Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (ER). Das in

der Membran verbleibende DAG aktiviert die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C (PKC), die sich an die Membran angelagert hat. DAG wird durch die DAG-Lipase gespalten, wobei als ein mögliches Spaltprodukt die mehrfach ungesättigte Arachidonsäure anfällt. (Arachidonsäure kann sonst auch durch Phospholipase A2 entstehen). Arachidonsäure induziert einen Ca^{2+} -Einstrom durch L- und N-Typ Ca^{2+} -Kanäle [Williams et al., 1994c]. Die Ca^{2+} -Ionen interagieren unter anderem mit der von der DAG-aktivierten PKC, welche daraufhin viele Proteine phosphorylieren kann. So wird z.B. auch das membran-assoziierte, in Wachstumskegel und Axonen angereicherte GAP-43 (Growth-Associated-Protein) von der PKC phosphoryliert. Im unphosphorylierten Zustand liegt GAP-43 im Komplex mit Calmodulin vor. Die Phosphorylierung von GAP-43 oder die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin bewirkt eine Dissoziation beider Moleküle. Während GAP-43/Calmodulin-Komplexe die Actinpolymerisierung inhibieren, stabilisiert phosphoryliertes GAP-43 die Actinfilamente, indem es sich zwischen sie lagert und als Verbindungsmolekül zwischen den parallel angeordneten Actinfilamenten wirkt [Meiri et al., 1998]. Dies ist ein Beispiel für eine direkte Auswirkung der NCAM-vermittelten Signaltransduktion auf cytoskelettale Umstrukturierungen. Die Wichtigkeit des GAP-43-Proteins im CAM-vermittelten Neuritenwachstum zeigten Versuche mit Kleinhirnneuronen der GAP-43-Knock-out-Maus. GAP-43-defiziente Zellen können nicht durch FGF oder NCAM zum Neuritenwachstum stimuliert werden, während das Integrin-vermittelte Neuritenwachstum unbeeinflusst bleibt.

Ein weiteres Downstream-Target des NCAM-induzierten Ca^{2+} -Influx ist die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMK II). Williams et al. (1995) zeigten, daß die Anwesenheit eines CaMK II-Inhibitors das NCAM-/L1- und N-Cadherin vermittelte als auch das Arachidonsäure-vermittelte Neuritenwachstum in Kleinhirnneuronen hemmt [Williams et al., 1995]. Dies zeigt, daß die CaMK II stromabwärts des Ca^{2+} -Influxes agiert und für das CAM-stimulierte Neuritenwachstum essentiell ist. Der CaMK II-Inhibitor beeinflusst nicht das Integrin-abhängige Neuritenwachstum, die CaMK II- spielt demnach keine Rolle beim Integrin-stimulierten Neuritenwachstum.

1.5.1.2. Aktivierung des fyn-FAK-MAPK-Signalweges

Auch die cytoplasmatische Domäne des als Rezeptor fungierenden NCAMs ist für die Stimulation des Neuritenwachstums wichtig. Für die cis-Aktivierung des FGF-Rezeptors dagegen scheint sie unbedeutend zu sein. Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p59fyn konnte als eine wichtige Komponente des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums identifiziert werden. Primäre Neurone von fyn-Knock-out-Mäusen zeigen eine komplette Inhibition des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums [Beggs et al., 1994].

In Neuronen von pp60src-Knockout-Mäusen dagegen wird das L1-stimulierte aber nicht das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum inhibiert. In Immunpräzipitations-Versuchen konnte 1997 erstmals eine Assoziation der fyn-Kinase mit der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140, aber nicht mit der von NCAM 180 nachgewiesen werden [Beggs et al., 1997]. Ein Teil der von der Zelle exprimierten NCAM 140-Moleküle (3%) scheint konstitutiv mit

der fyn-Kinase innerhalb der „lipid rafts“ assoziiert zu sein. Homophile NCAM-Bindung oder durch NCAM-Antikörper ausgelöstes Verbinden von NCAM-Molekülen induziert die Assoziation einer weiteren Tyrosinkinase, der fokalen Adhäsionskinase (FAK) mit dem NCAM 140-fyn-Komplex und die Phosphorylierung beider Kinasen [Beggs et al., 1997]. Die FAK wird durch Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste Tyr 397 und Tyr 925 aktiviert, wodurch eine Bindungsstelle für das Adapterprotein Grb2 (Growth-Factor-Receptor-Bound Protein 2) entsteht [Schlaepfer et al., 1994]. Grb2 bindet im Komplex mit SOS (Son-of-Sevenless), einem Ras-Guaninnukleotid-Austauschfaktor an das phosphorylierte Tyr 925, woraufhin SOS die Aktivierung von Ras durch Austausch von GDP gegen GTP induziert. Es ist bekannt, daß die FAK in fokalen Komplexen mit Integrinen lokalisiert ist und Integrin-vermittelte Signale mit dem Ras-MAPK (Mitogen-Activated-Protein-Kinase)-Signalweg verbindet [Schlaepfer et al., 1994] [Chen et al., 1998]. Es wird postuliert, daß NCAM den Ras-MAPK-Signalweg mittels FAK aktiviert und daß dieser Signalweg für die maximal mögliche Stimulation des Neuritenwachstums durch NCAM notwendig ist. Ein Downstream-Ziel von Ras ist Raf, welches MEK1 und MEK2 phosphoryliert und aktiviert. MEK1/MEK2 ihrerseits aktivieren die MAPK ERK1 (Extracellular-Signal-Regulated-Kinase) und ERK2.

1999 konnten Schmid et al. zeigen, daß ein durch NCAM-Antikörper oder durch NCAM-Fc-Fusionsproteine ausgelöstes NCAM-Clustering auf der Zelloberfläche von NCAM 140 exprimierenden Neuroblastomzellen oder primären Kleinhirnneuronen eine verstärkte Phosphorylierung der MAPK ERK1 und ERK2 zur Folge hat [Schmid et al., 1999]. Die Aktivierung der ERKs erfolgte schnell innerhalb von 5 min, war maximal nach 10 min und nahm schnell wieder ab (transiente Aktivierung) (ERK2: 4-5 fache Stimulation). In Neuroblastomzellen, die ausschließlich NCAM 180 exprimierten war eine derartige ERK1- und ERK2-Aktivierung nicht zu detektieren. Es ist also nur die NCAM 140-Isoform in der Lage, die MAPKinasen ERK1 und 2 zu aktivieren. Andere MAPK wie JNK werden durch NCAM-Clustering nicht aktiviert. Für PC12-Zellen und primären Neuronen des Hippocampus konnte ebenfalls eine Aktivierung der MAPK ERK1 und 2 nach physiologischer NCAM-NCAM-Bindung oder nach Stimulation mit einem synthetischen NCAM-Peptid-Liganden erzielt werden [Kolkova et al., 2000a]. Daß die NCAM-stimulierte ERK-Aktivierung von der Aktivierung von FAK und Ras abhängt, konnte in Versuchen mit Neuroblastomzellen gezeigt werden, die eine dominant negative Form von FAK oder Ras exprimierten. Diese Zellen wiesen nach NCAM-Clustering eine um 70% reduzierte Aktivierung der ERK-Kinasen auf. Schließlich zeigten Versuche mit MEK-Inhibitoren oder dominant negativen Formen von Ras und Raf, daß der FAK-Ras-Raf-MEK-MAPK-Signalweg eine Rolle im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum spielt. Die Inhibition des MAPK-Signalweges reduziert in primären Kleinhirnneuronen das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum um 60%, während in PC12-Zellen das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum vollständig inhibiert wird [Schmid et al., 1999] [Kolkova et al., 2000a].

Die in den Kleinhirnneuronen beobachtete unvollständige Inhibition des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums durch den MEK-Inhibitor könnte darauf zurückzuführen sein, daß NCAM auch unabhängig vom MAPK-Weg ein gewisses Neuritenwachstum stimulieren kann

(über den FGF-R-PLC γ -Weg). Für ein optimales NCAM-stimuliertes Neuritenwachstum ist jedoch die Aktivierung des MAPK-Weges notwendig. In PC12-Zellen dagegen wird das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum vollständig durch Inhibition des MAPK-Weges inhibiert. Dies läßt sich dadurch erklären, daß PC12-Zellen bereits für die Initiation der Differenzierung (Priming) der Zellen eine aktive MAPK-Signaltransduktion benötigen, bevor sie zum Neuritenwachstum stimuliert werden können. Es konnte vor einigen Jahren gezeigt werden, daß zwar der MAPK-Signalweg für die Differenzierung der naiven PC12-Zellen zu sympathischen Neuronen wichtig ist, die NGF-induzierte Neuritenbildung dagegen erfolgt unabhängig vom MAPK-Weg [Sano & Kitajima, 1998].

Generell vermittelt der Ras-MAPK-Signalweg das Überleben von Zellen, Zellwachstum und Differenzierung. So scheint die NCAM 140 homophile trans-Interaktion sowohl das Überleben der Neurone als auch deren Differenzierung über die Aktivierung des Ras-MAPK-Weges zu stimulieren. Auch Wachstumsfaktorrezeptoren können FAK-abhängig als auch FAK-unabhängig den MAPK-Weg aktivieren. Bei der FAK-unabhängigen MAPK-Aktivierung interagiert der aktivierte FGF-Rezeptor mit den Adapterproteinen Shc und FRS, wodurch eine Andockstelle für die SH2-Domäne des Adapterproteins Grb2 entsteht, welches wie oben beschrieben über SOS eine Rekrutierung von Ras induziert. Ein Teil der NCAM-induzierten Aktivierung des MAPK-Kaskade könnte demnach auch über den FGF-Rezeptor erfolgen, während der andere Teil über die Aktivierung des fyn-FAK-Komplexes abläuft. Niethammer et al. (2002) konnten zeigen, daß in NCAM-transfizierten CHO-Zellen alle drei NCAM-Isoformen ERK1/2 aktivieren können. Dabei wird die NCAM 180-stimulierte ERK 1/2-Aktivierung über den FGF-R-Signalweges vermittelt, während die NCAM 120 stimulierte Erk 1/2-Aktivierung FGF-Rezeptor-unabhängig erfolgt. Der mittels NCAM 180 vermittelte FGF-Rezeptor-Signalweg scheint aber nicht auszureichen, um Neuritenwachstum zu stimulieren. NCAM 140 stimuliert dagegen sowohl den FGF-Rezeptorweg außerhalb von „lipid rafts“, als auch die Aktivierung des MAPK-Weges über fyn und FAK. Die Aktivierung über fyn und FAK ist von der Lokalisation von NCAM 140 in „lipid rafts“ abhängig [Niethammer et al., 2002].

In PC12-Zellen hemmt sowohl die Inhibition des FGF-Rezeptor /PLC γ -Signalweges als auch die Inaktivierung von fyn, FAK und Ras das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum. Die Überexpression der MAPKK MEK kann jedoch die durch Inhibitoren des FGF-Rezeptors, der PLC γ und der fyn-Kinase als auch die von dominant negativen Formen von FAK und Ras induzierte Reduktion des Neuritenwachstum aufheben. Kolkova et al. schlugen vor, daß beide Signalwege über ein Signalmolekül, das upstream von MEK agiert, miteinander in Verbindung stehen. Bei diesem Molekül könnte es sich um die Proteinkinase C handeln, da die Inhibition der PKC durch Calphostin C das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in PC12-Zellen blockiert während eine Stimulation der PKC durch PMA die durch FGF-Rezeptor-Antikörper, PLC γ -Inhibitor, fyn- oder FAK-Inhibitor ausgelöste Inhibition des Neuritenwachstums aufhebt [Kolkova et al., 2000a]. Die PKC-Stimulation kann dagegen nicht den inhibitorischen Effekt des MEK-Inhibitors aufheben. Die PKC wird durch DAG aktiviert, aber auch Arachidonsäure kann in Gegenwart von DAG die PKC aktivieren [Kishimoto et al., 1980]. Eine PKC-Isoform, die PKC δ , kann Raf Ras-unabhängig durch Phosphorylierung

aktivieren [Ueda et al., 1996]. Kolkova et al. schlagen daher ein Modell vor, bei dem die PKC als Folge des FGF-Rezeptor-PLC γ -Signalweges durch DAG aktiviert wird und daraufhin Raf direkt phosphoryliert und aktiviert. Möglicherweise ist die gleichzeitige Aktivierung von Raf über den fyn-FAK-Ras-Signalweg als auch durch PKC für eine anhaltende ERK-Aktivierung notwendig. Für PC12-Zellen konnte gezeigt werden, daß eine lang anhaltende ERK-Aktivierung Differenzierung induziert, während eine vorübergehende ERK-Aktivität die Proliferation von Zellen fördert [Heasley & Johnson, 1992].

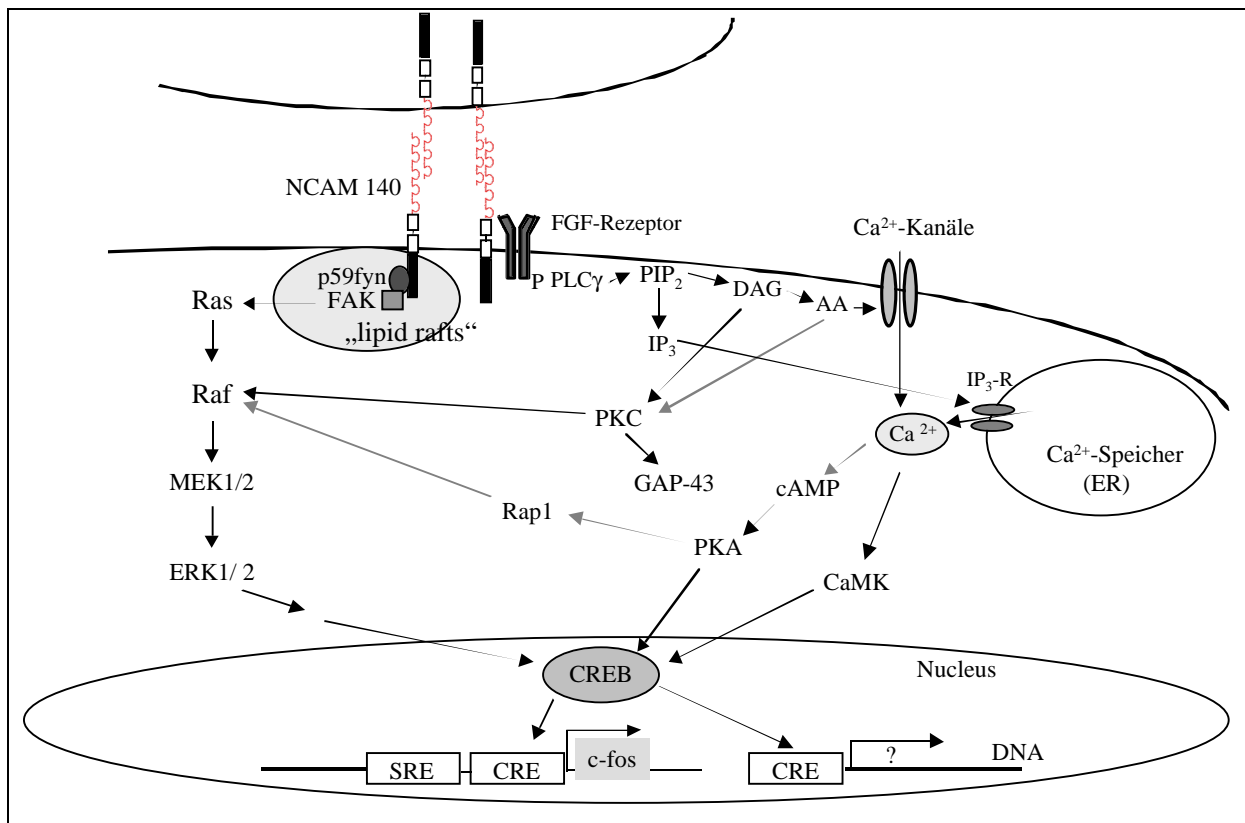


Abb. 3: NCAM-aktivierte Signalwege, die im NCAM-vermittelten Auswachsen von Neuriten involviert sind.

PLC γ : Phospholipase C γ ; PIP $_2$: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; DAG: Diacylglycerin; IP $_3$: Inositol-(1,4,5)-Trisphosphat; AA: Arachidonsäure; IP $_3$ -R: IP $_3$ -Rezeptor; cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat; PKA: Proteinkinase A; CaMK: Ca $^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase; CREB: cAMP-Response-Element-Binding-Protein; CRE: cAMP-Response-Element; FAK: Fokale Adhäsionskinase; MEK: MAP-ERK-Kinase; ERK: Extracellular-Signal-Regulated Kinase; GAP-43: Growth-Associated-Protein-43; FGF-R: Fibroblast-Growth-Factor-Receptor. Graue Pfeile: vermutete Interaktionen.

1.5.1.3. Beteiligung von cAMP, Proteinkinase A und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K)

Kürzlich zeigten Jessen et al. (2001), daß auch cAMP und die Proteinkinase A (PKA) eine Rolle in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion spielen. Sowohl ein cAMP-Antagonist als auch ein PKA-Inhibitor hemmen das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in PC12-Zellen [Jessen et al., 2001]. Es wird vermutet, daß es durch den NCAM-vermittelten Ca $^{2+}$ -

Einstrom zu einem Anstieg in der cAMP-Konzentration kommt und daraufhin die PKA aktiviert wird. Auch aktivierte PKA kann über das Ras-verwandte kleine G-Protein Rap1 den MAPK-Weg mittels Raf aktivieren [Roberson et al., 1999; Zanassi et al., 2001].

Alle an der NCAM-Signaltransduktion beteiligten Signalwege sind in Abb. 3 dargestellt.

Auch für die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) konnte eine Beteiligung in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion und im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum nachgewiesen werden [Ditlevsen et al., 2003]. Sowohl in PC12-Zellen als auch in Kleinhirnneuronen reduzieren PI3-K-Inhibitoren konzentrationsabhängig das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum. Die PI3-K ist vor allem für ihre Funktion als Stimulator für das Überleben von Zellen bekannt. Ditlevsen et al. konnten zeigen, daß die Stimulation von NCAM mit einem synthetischen NCAM-Peptidliganden einen positiven Effekt auf das Überleben von Apoptose-induzierte Kleinhirnneuronen und dopaminergen Neuronen hat, und daß die PI3-K dafür erforderlich ist. Die Kinase Akt, ein Downstream-Effektor der PI3-K und Stimulator vieler Proteine, die überlebensfördernd wirken, wird ebenfalls in NCAM-stimulierten Neuronen aktiviert. Es existieren zwei Möglichkeiten wie die PI3-K durch NCAM-Signaltransduktion aktiviert werden kann: 1.) Die PI3-K kann über ihre in der p85-Untereinheit befindlichen SH2-Domäne an phosphorylierte FAK binden. Diese Bindung führt zur Aktivierung der PI3-K. 2.) Der FGF-Rezeptor kann eine Aktivierung der PI3-K über die Rekrutierung mehrerer Andockproteine induzieren. Gab1 rekrutiert an den FRS2-Grb2-Komplex, wird daraufhin phosphoryliert und erhält dadurch eine Bindestelle für die SH2-Domäne der PI3-K.

1.5.1.4. Stimulation von Transkriptionsfaktoren

Die durch NCAM-induzierten Signalwege sind in der Lage, Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Im NCAM-stimulierten Neuritenwachstum spielen drei Transkriptionsfaktoren eine Rolle: CREB, c-Fos und NFkB.

NCAM kann über die Aktivierung von ERK die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB induzieren. Phosphoryliertes CREB fungiert als Transkriptionfaktor für Gene, welche das cAMP-Response Element (CRE) in der Promotorregion enthalten. Die aktivierte MAPK ERK induziert die CREB-Phosphorylierung indirekt über die Aktivierung der ribosomalen Protein S6-Kinase (RSK) oder über Aktivierung der Mitogen- und Stress-aktivierten Protein-Kinase 1 (MSK-1, Mitogen-and-Stress-Activated-Protein-Kinase 1) [Dalby et al., 1998; Deak et al., 1998]. Die Phosphorylierung der RSK durch ERK erfolgt im Cytoplasma, woraufhin die aktivierte RSK in den Kern transloziert und dort neben CREB auch andere Transkriptionsfaktoren aktivieren kann. Für die Aktivierung der MSK-1 muß die aktivierte ERK zunächst selber in den Kern gelangen, um dort die im Kern lokalisierte MSK zu aktivieren. Die CREB-Aktivierung ist nicht nur für die NCAM-vermittelte Neuritenbildung notwendig, sondern auch für Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung (LTP-Bildung). CREB-Knock-out-Mäuse und NCAM-Knock-out-Mäuse zeigen beide Defizite im räumlichen Lernen und Fehler in der LTP [Bourtchuladze et al., 1994]. Vermutlich kann NCAM durch Aktivierung des MAPK-Signalweges die Expression von Genen induzieren, die für langzeitige synaptische Verände-

rungen von Bedeutung sind. CREB kann nicht nur über den MAPK-Signalweg aktiviert werden sondern auch durch aktivierte PKC, CaMK und PKA. Diese Signalmoleküle sind alle in den von NCAM-stimulierten Signalwegen beteiligt, so daß die verschiedenen Signalwege alle zur Aktivierung von CREB führen können. Ein CRE-enthaltendes Gen ist das c-fos-Gen, welches für den Transkriptionsfaktor c-Fos kodiert. Auch aktives c-Fos ist für das NCAM-stimulierte Neuritenwachstum notwendig [Jessen et al., 2001]. Ein anderer Transkriptionsfaktor, der direkt durch ERK phosphoryliert wird, ist Elk-1. Elk-1 aktiviert ebenfalls die Transkription des c-fos-Gens über die Bindung an das Serum Response-Element (SRE) im c-fos-Promotor [Whitmarsh et al., 1995].

Auch der Transkriptionsfaktor NF κ B scheint eine Rolle in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion zu spielen. NF κ B wird in Astrocyten nach neuronalen Verletzungen und in aktiven Neuronen aktiviert. Zu einer Aktivierung von NF κ B kommt es sowohl in NCAM-stimulierten Astrocyten und Kleinhirnneuronen aber auch in NCAM-stimulierten Astrocyten von NCAM-Knock-out-Mäusen. NCAM scheint demnach auch über einen noch unbekanntem heterophilen Interaktionspartner eine NF κ B-Aktivierung in Astrocyten stimulieren zu können [Little et al., 2001]. Bisherige Untersuchungen liefern Hinweise, daß nicht nur fyn und src sondern auch andere Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen eine Rolle in der NCAM-induzierten NF κ B-Aktivierung spielen [Choi et al., 2001]. Weiterhin sind die PLC γ , PKC und die CaMKII in der NCAM-vermittelten NF κ B-Aktivierung beteiligt, nicht aber der FGF-Rezeptor an sich und auch nicht der MAPK-Signalweg.

In Astrocyten konnte ein Anstieg der mRNA für Glutaminsynthetase und Calreticulin nach homophiler NCAM-Bindung beobachtet werden. Beide Proteine sind in der Signaltransduktion des Glucocorticoid-Rezeptors involviert [Crossin et al., 1997].

1.5.2. NCAM als heterophiler Signalrezeptor

Kürzlich konnte gezeigt werden, daß NCAM als ein alternativer Signalrezeptor für GDNF fungieren kann [Paratcha et al., 2003]. Die Assoziation von NCAM 140 mit dem GDNF-Rezeptor GFR α 1 innerhalb der „lipid rafts“ erhöht die Bindungsfähigkeit von GDNF an NCAM 140, hemmt die NCAM-vermittelte Zelladhäsion und führt zur Aktivierung der für NCAM bekannten Downstream-Effektoren fyn und FAK. Obwohl GDNF auch unabhängig vom GDNF-Rezeptor an NCAM 140 binden kann, scheint die Assoziation von NCAM mit GFR α 1 für die Aktivierung von fyn und FAK notwendig zu sein. Diese Resultate lieferten den ersten Beweis, daß NCAM auch durch eine heterophile extrazelluläre Interaktion Signaltransduktion initiieren kann. Auch für den GDNF-Rezeptor GFR α 1, welcher in vielen Zellen nach GDNF-Bindung mit der Rezeptortyrosinkinase Ret interagiert und die Aktivierung von Ras und PLC γ induziert, konnte damit erstmals ein Ret-unabhängiger über NCAM verlaufender Signalweg aufgedeckt werden. *In vitro*-Untersuchungen zeigten, daß GDNF in Explantaten des Ischiasnerves von Wildtyp und Ret-negativen Tieren fyn-abhängig die Migration von Schwanzzellen stimuliert. Außerdem fördert GDNF das axonale Wachstum

von Wildtyp und Ret-defizienten hippocampalen Neuronen, aber nicht von NCAM-defizienten Neuronen. Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß GDNF via NCAM-fyn-FAK signalisieren kann und diese Signaltransduktion zu Schwannzell-Migration und axonalen Wachstum führt [Zhou et al., 2003].

1.6. Regulation der NCAM-Expression

Nach einer homophilen NCAM-NCAM-Bindung wird die Expression von NCAM-mRNA in Neuronen und Astrocyten herunterreguliert, was auf einen Feedback-Mechanismus zwischen Zelloberfläche und Kern hindeutet. Es ist nicht bekannt, ob diese Regulation auf Ebene des NCAM-Promotors stattfindet. Nach Verletzung neuronaler Zellen dagegen kommt es zu einer Hochregulation der NCAM-Expression [Daniloff et al., 1986].

Im NCAM-Gen, als auch im L1-Gen konnten Hox- und Pax-Bindestellen gefunden werden [Jones et al., 1992] [Jones et al., 1993]. Die Transkriptionsfaktoren Hox und Pax spielen eine wichtige Rolle in der zeitlich-räumlich-geregelten Expression vieler Proteine während der embryonalen Entwicklung und können die Genexpression der CAMs verstärken oder unterdrücken.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

1. In dieser Arbeit sollte die Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum untersucht werden. Dazu sollten PC12-Zellen transient mit der cytoplasmatischen und der transmembranären NCAM-cDNA von NCAM 140 und NCAM 180 aus der Ratte transfiziert werden. Die PC12-Zellen sollten mit löslichen NCAM stimuliert werden, so daß das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum der jeweilig transfizierten PC12-Zellen untersucht werden kann.
2. Zu Beginn der Arbeit war für NCAM 140 nur die intrazelluläre Assoziation mit der src-Kinase p59fyn bekannt. Für NCAM 180 dagegen ist die Interaktion mit dem Membran-Cytoskelett-Verbindungsprotein Spectrin beschrieben. Da beide NCAM-Isoformen über sehr lange cytoplasmatische Domänen verfügen - NCAM 140 hat eine 119-Aminosäuren lange und NCAM 180 eine 386-Aminosäuren lange cytoplasmatische Domäne – und aufgrund der Beteiligung von NCAM an vielfältigen zellulären Prozessen wie Neuritenwachstum, Axonfascikulierung, Neuroblastenmigration, Synapsenbildung und synaptische Aktivität ist zu erwarten, daß beide Isoformen mit mehr als nur einem Bindungspartner interagieren. Ein wesentlicher Schwerpunkt dieser Arbeit war daher die Suche und Charakterisierung neuer potentieller intrazellulärer Bindungspartner für NCAM 140 und NCAM 180 durch Ligandenaffinitätschromatographie. Dazu sollte die cytoplasmatische NCAM-cDNA aus Rattenhirn oder PC12-Zellen in der PCR amplifiziert und in einen geeigneten prokaryontischen Expressionsvektor kloniert werden. Die cytosolischen Domänen sollten nach Transformation in den *E.coli*-Stamm BL21 als rekombinante Fusionsproteine exprimiert werden. Nach Reinigung und Immobilisierung der Fusionsproteine an Cyanbromid-aktivierter Sepharose sollten verschiedene Rattenhirnfraktionen als Ausgangsmaterial für die Ligandenaffinitätschromatographie eingesetzt werden. Mittels MALDI-TOF-MS und Peptide-Mass-Fingerprinting sollten die potentiellen Bindungspartner für NCAM identifiziert werden und durch Westernblot-Analyse in den Eluaten nachgewiesen werden. In Coimmunpräzipitations- und Pull-down-Experimenten sollte anschließend versucht werden, die Ergebnisse der Ligandenaffinitätschromatographie zu bestätigen.