

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum in PC12-Zellen untersucht. Die Resultate der Versuche zeigen, daß die cytoplasmatische Domäne von NCAM 140 Neuritenwachstum stimuliert, während die cytoplasmatische Domäne von NCAM 180 dazu nicht in der Lage ist und möglicherweise sogar einen anti-neuritogenen Effekt ausübt, also das Neuritenwachstum hemmt und als Gegenspieler von NCAM 140 agiert.

Weiterhin konnten neue potentielle intrazelluläre Bindungspartner für NCAM 180 und NCAM 140 durch Ligandenaffinitätschromatographie identifiziert werden.

Sowohl für die Ligandenaffinitätschromatographie als auch für die Experimente zum NCAM-vermittelten Neuritenwachstum wurde die cytosolische NCAM-cDNA beider Isoformen der Ratte benötigt. Da für die Spezies Ratte bisher keine veröffentlichte cDNA-Sequenz der NCAM 180-Isoform in den Datenbanken vorlag, werden zunächst die Unterschiede zwischen der in dieser Arbeit erhaltenen Ratten-NCAM 180-cDNA-Sequenz und der bekannten Maus-NCAM 180-cDNA-Sequenz diskutiert.

### 4.1. Die Primärstruktur von NCAM 180 der Ratte

Die cDNA der cytosolischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 wurden mit und ohne Transmembrandomäne aus PC12-Zellen und Rattenhirn in der PCR amplifiziert. In dem NCAM 180-spezifischen Insert weist die Ratten-cDNA-Sequenz 25 andere Basen auf als die Maus-cDNA-Sequenz, wobei 13 dieser Basenunterschiede zu anderen Aminosäuren führen. Dagegen führen nur zwei der 17 Basenunterschiede in der Ratten-cytNCAM 140-cDNA zu anderen Aminosäuren. Weiterhin kommen im Ratten-NCAM 180-spezifischen Insert zusätzliche 12 Basen vor, die auf Proteinebene zum Einbau eines zusätzlichen Prolinrestes (hinter einem anderen Prolin) und an einer anderen Stelle zum Einbau des Tripeptids Serin-Valin-Serin führen (siehe 3.1.5.). Auf Proteinebene ist demnach die Aminosäurenabweichung innerhalb des cytNCAM 180-spezifischen Inserts mit 5,6% größer als in den flankierenden cytoplasmatischen Bereichen bzw. als in der cytNCAM 140-Aminosäuresequenz (1,5%). Die zusätzlichen Basenpaare innerhalb der cDNA könnten das Resultat alternativen Splicens der prä-mRNA sein. Möglicherweise existieren auch für die Maus derartige Splicevarianten, die zu zusätzlichen Aminosäuren innerhalb der cytoplasmatische Domäne von NCAM 180 führen. Daß Insertionen solch kleiner Oligonukleotide als Resultat eines möglichen Splice-mechanismus auftreten können, zeigt die extrazelluläre Domäne von NCAM selbst. Zwischen Exon 12 und Exon 13 kann an der Splicestelle a alternativ das Trinukleotid AAG und/oder 15, 48 oder 42 Nukleotide inseriert werden [Barthels et al., 1992]. Das Trinukleotid AAG kann außerdem auch zwischen Exon 13 und 14 alternativ inseriert werden. Das NCAM 180-spezifische cytoplasmatische Insert wird jedoch von nur einem einzigen großen Exon (Exon 18) kodiert. Ob auch innerhalb eines Exons Miniexons eingebaut werden können, ist fraglich. Nach dem gängigen Splice-Modell dürften innerhalb eines Exons keine zusätzlichen Exons

insetiert werden, da in der prä-mRNA zwischen den Exons immer Introns liegen, die an ihren Enden jeweils zwei konservierte Nukleotide besitzen, die für die Genauigkeit des Schneidens verantwortlich sind (5'GU-Intron-AG-3'). Vielleicht existieren aber noch andere posttranskriptionelle Mechanismen, welche auch den Einbau eines Miniexons in ein Exon zulassen. Da viele der veröffentlichten Aminosäuresequenzen für NCAM von den Nukleinsäuresequenzen der Transkripte hergeleitet wurden, ist nicht klar, ob diese auch als Proteine in der Zelle tatsächlich vorliegen. Es ist also nicht auszuschließen, daß die Ratten-cytNCAM 180-Aminosäuresequenz von einem gespliceten Transkript abgeleitet wurde, das eigentlich noch einer weiteren posttranskriptionellen Modifikation bedurft hätte, bevor es translatiert wird oder eines, das gar nicht translatiert wird.

Das Auftreten der zusätzlichen vier Aminosäuren im cytNCAM 180-spezifischen Insert der Ratte könnte auch art-spezifisch bedingt sein. Die NCAM 180-Aminosäuresequenz ist in der Datenbank nur für die Spezies Maus und dem Amphib *Xenopus laevis* zu finden, die auch von der DNA-Sequenz hergeleitet wurde. Tonissen et al. (1993) identifizierten in *Xenopus laevis* zwei NCAM-kodierende Gene [Tonissen & Krieg, 1993]. Dies steht im Gegensatz zu den Säugern und dem Huhn, bei denen nur ein NCAM-Gen existiert. Beim Vergleich der beiden NCAM-Sequenzen (NCAM 1 und NCAM 2) von *Xenopus* mit der NCAM 180-Sequenz der Maus fällt die extreme Diversität der Aminosäuren innerhalb des NCAM 180-spezifischen Inserts auf. Während in den flankierenden Regionen 18% bzw. 21% (NCAM 1 bzw. NCAM 2 von *Xenopus* im Vergleich zu Maus NCAM 180) Aminosäureaustausche vorhanden sind, die Anzahl der Aminosäuren aber konstant ist, liegen im NCAM 180-spezifischen Insert 34% bzw. 46% Aminosäureaustausche vor. Es fehlen weiterhin in der *Xenopus*-NCAM-Sequenz an unterschiedlichen Stellen Aminosäuren, so daß die *Xenopus*-NCAM-Sequenz über insgesamt 25 (NCAM 1) bzw. 17 (NCAM 2) weniger Aminosäuren innerhalb des NCAM 180-spezifischen Inserts verfügt als die NCAM 180-Sequenz der Maus. Dies könnte dafür sprechen, daß es sich bei den zusätzlichen Aminosäuren innerhalb der NCAM 180-Sequenz der Ratte genauso wie bei den fehlenden Aminosäuren der *Xenopus*-Sequenz um artspezifische Veränderungen der NCAM-Sequenz handelt, die durch Mutationen entstanden sind. Auch die Rinder-NCAM 140-Sequenz besitzt in dem vom Exon 19 kodierenden Proteinbereich 3 Aminosäuren weniger (am Stück) innerhalb der cytoplasmatischen Domäne als die beiden Nagersequenzen (jeweils 119AS) und hat dadurch nur eine 116 Aminosäuren-lange cytoplasmatische Domäne.

## **4.2. Die Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM bei der neuronalen Differenzierung**

### **4.2.1. Transiente Expression der cytoplasmatischen Domänen von NCAM in PC12-Zellen**

Als eukaryontisches Zellsystem für die funktionelle Untersuchung der cytoplasmatischen Domänen von NCAM wurden PC12-Zellen gewählt. Diese Zellen stammen aus dem Nebennierenmark der Ratte und differenzieren nach NGF-Induktion zu einem neuronalen Phänotyp. Sie stellen neben primären Neuronen ein gängiges Zellsystem zur Untersuchung des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums dar. PC12-Zellen exprimieren endogen nicht-polysialyliertes NCAM 140 und NCAM 180.

Nach Transfektion von PC12-Zellen mit TMcytNCAM 140- und 180-cDNA ist die Expression der cytoplasmatischen Domänen im Westernblot und in der Immunfluoreszenz nachgewiesen worden. Die cytoplasmatischen Domänen werden bereits 24 h nach Transfektion stark exprimiert. Die Überexpression der TMcytNCAM-Domänen hat keinen Einfluß auf die Expression der endogenen NCAM-Moleküle. Dagegen führt die Stimulation der PC12-Zellen mit NGF zu einer Abnahme der Expression des endogenen NCAM ([Park et al., 1997], diese Arbeit).

Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden TMcytNCAM-transfizierte PC12-Zellen anhand ihrer Immunfluoreszenz-Intensitäten quantifiziert. Der anti-NCAM-Antikörper 5B8 erkennt sowohl endogenes als auch transfiziertes NCAM und reagiert demnach mit allen PC12-Zellen. Jedoch zeigte eine Subpopulation der PC12-Zellen eine besonders intensive Oberflächenfluoreszenz, die sich von der schwächeren Immunfluoreszenz der nicht transfizierten Zellen stark absetzte und auf die Überexpression der TMcytNCAM-Domänen zurückzuführen sein mußte. Daher wurden intensiv gefärbte Zellen als TMcytNCAM-transfizierte PC12-Zellen interpretiert. Wie bereits durch Westernblot-Analyse ermittelt, reguliert NGF die endogene NCAM-Expression herunter. Dies könnte die verhältnismäßig schwache Immunfluoreszenz des endogenen NCAM der nicht-transfizierten Zellen und der Kontrollzellen (PC12 Wildtyp und Vektor-transfizierte PC12-Zellen) erklären. Die kalkulierten Transfektionseffizienzen der mit TMcytNCAM 140-transfizierten PC12-Zellen betrug 24,3% und der mit TMcytNCAM 180-transfizierten Zellen 22,8%, was eine für PC12-Zellen übliche Transfektionsrate unter Verwendung des Lipofectamin-Reagenzes ist.

### **4.2.2. Untersuchungen zum NCAM-vermittelten Neuritenwachstum in PC12-Zellen**

Das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in PC12-Zellen wurde mit löslichen NCAM stimuliert. Dieses NCAM stammt aus dem Huhn. Viele Arbeitsgruppen verwenden jedoch NCAM-Fc-Chimere zur Stimulation des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums.

Son et al. (2002) zeigten, daß lösliches NCAM aus dem Huhn in hippocampalen Neuronen die Aktivierung der MAPK ERK induziert [Son et al., 2002]. Daher erschien es wahr-

scheinlich, daß lösliches NCAM ebenso wie NCAM-Fc-Chimeren Neuritenwachstum stimulieren kann.

Lösliches NCAM konnte das Neuritenwachstum von PC12-Zellen auf Kollagen IV in der Gegenwart von 3 oder 10 ng/mL NGF um 100% steigern. Es zeigte sich, daß eine geringe NGF-Konzentration für die Initiation der PC12-Differenzierung und der Neuritenbildung notwendig ist, da NCAM in der Abwesenheit von NGF das Neuritenwachstum nur wenig fördert. Das beobachtete basale, NCAM-unabhängige Neuritenwachstum in der Gegenwart von NGF wird durch die Kollagen IV-induzierte Integrin- sowie durch die NGF-induzierte TrkA-Rezeptor-Stimulation vermittelt. In den Neuritenwachstumsassays wurden 2,5 µg/mL lösliches NCAM verwendet. Meiri et al. (1998) zeigten, daß bereits 1 µg/mL NCAM-Fc das Neuritenwachstum von Kleinhirnneuronen signifikant steigert, während eine maximale Neuritenverlängerung mit 5 µg/mL erzielt wird. Auch sie beobachteten nahezu eine Verdopplung der Neuritenlängen (in Kleinhirnneuronen) bei Stimulation mit 5 µg/mL NCAM-Fc [Meiri et al., 1998].

Zur Untersuchung der Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM wurde das Neuritenwachstum der mit den TMcytNCAM-Konstrukten transfizierten PC12-Zellen mit dem Neuritenwachstum der Leervektor-transfizierten PC12-Zellen verglichen. Bei der Quantifizierung der Neuritenlänge wurden sowohl transfizierte als auch nicht-transfizierte Zellen innerhalb eines Transfektionsansatzes für die Ermittlung der Neuritenlängen ausgewertet. Da TMcytNCAM 140- und TMcytNCAM 180-transfizierte PC12-Zellen ähnliche Transfektionseffizienzen als auch eine ähnliche Expression der überexprimierten Domänen aufweisen und innerhalb der photographierten Ausschnitte alle Zellen ausgewertet wurden, können die Effekte der verschiedenen transfizierten Zellen auf das Neuritenwachstum miteinander verglichen werden.

In TMcytNCAM 140-transfizierten PC12-Zellen ist das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum im Vergleich zu Vektor-transfizierten Zellen um 33% reduziert. Die Inhibition des Neuritenwachstums läßt sich folgendermaßen erklären:

Die zusätzlichen membranassoziierten cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 konkurrieren mit dem endogenen NCAM 140 um potentielle intrazelluläre Bindungspartner, wie z.B. um die Signalmoleküle p59fyn und p125FAK. Dadurch werden viele endogene NCAM 140-Moleküle daran gehindert, nach extrazellulärer NCAM-Ligandenbindung Neuritenwachstums-fördernde Signale ins Zellinnere weiterzuleiten. Die fehlende intrazelluläre Interaktion von fyn oder anderer nach NCAM-Stimulation an NCAM-rekrutierender Signalmoleküle verhindern die Weiterleitung der Signaltansduktion. Voraussetzung für dieses Modell ist, daß die Signalmoleküle unabhängig von der Konformation des überexprimierten TMcytNCAM 140 an diesem binden müssen. Die Bindung der Signalmoleküle an TMcytNCAM 140 muß unabhängig von einer extrazellulären NCAM-Stimulation der Zelle erfolgen. Da fyn konstitutiv an NCAM 140 assoziiert ist, also unabhängig von einem extrazellulären Stimulus, ist es gut möglich, daß der größte Teil der sonst an endogenen NCAM 140 assoziierten fyn-Moleküle an den mengenmäßig stärker vertretenen, überexprimierten TMcytNCAM 140-Molekülen assoziiert ist. Die src-Kinase fyn ist stark in „lipid rafts“ angereichert. Beggs et al. (1997) zeigten in Immunpräzipitationsstudien, daß nur ca. 1% der fyn-Moleküle konstitutiv mit NCAM 140 assoziiert sind (im Maus-Kleinhirn) [Beggs et

al., 1997]. Außerdem sind nur etwa 3% aller NCAM 140 Moleküle mit fyn assoziiert [Beggs et al., 1997]. Dieser Anteil an fyn-assoziierten NCAM 140-Molekülen stimmt mit dem kürzlich ermittelten Anteil von NCAM 140-Molekülen in „lipid rafts“ (2%) [Niethammer et al., 2002], dem fyn-NCAM-Interaktionsort, überein. Nur diese 2-3% der NCAM 140-Moleküle aktivieren über fyn den FAK-Ras-Raf-ERK-Signalweg und sind für die Stimulation des Neuritenwachstums entscheidend. Eine Rekrutierung von FAK an den fyn-NCAM-Komplex erfolgt vermutlich erst, wenn fyn aktiviert wird bzw. nach einer extrazellulären NCAM-Stimulation.

Daß die Inhibition des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums in den TMcytNCAM 140-exprimierenden PC12-Zellen nicht vollständig ist, also nicht auf das basale, NCAM-unabhängige Neuritenwachstum reduziert wird, kann daran liegen, daß nur knapp ein Viertel der ausgewerteten Zellen mit TMcytNCAM 140 transfiziert sind. Wenn alle ausgewerteten Zellen transfiziert wären, würde man wahrscheinlich eine vollständige Inhibition des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums sehen.

Interessant ist, daß auch das NCAM-unabhängige Neuritenwachstum der TMcytNCAM 140-überexprimierenden PC12-Zellen leicht, aber signifikant, reduziert ist. Die Überexpression von transmembranären cytNCAM 140 scheint also auch das Integrin- und / oder das NGF-vermittelte Neuritenwachstum zu beeinflussen. Möglicherweise bindet cytNCAM 140 auch Bindungspartner, die bei der Signaltransduktion der Integrine eine Rolle spielen. So ist z.B. bekannt, daß einige Integrine über Caveolin, ein in „lipid rafts“ stark angereichertes Transmembranprotein, p59fyn aktivieren können, welches wiederum über die Adapterproteine Shc und Grb2/SOS den Ras/MAPK-Weg aktiviert [Wary et al., 1998]. Dieser Signalweg wird von den Integrinen allerdings hauptsächlich genutzt, um Zellproliferation zu stimulieren. Unabhängig davon ist FAK ein zentrales Signalmolekül der Integrin-vermittelten Signaltransduktion in den fokalen Zelladhäsionskontakten und spielt eine Rolle in der Organisation des Cytoskeletts [Aplin et al., 1998].

Im Gegensatz zur TMcytNCAM 140-Überexpression führt die Überexpression von TMcytNCAM 180 in PC12-Zellen zu einer Zunahme des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums um 38%. Wie läßt sich dieses Phänomen erklären? Während nur für NCAM 140 die Interaktion mit der src-Kinase p59fyn gezeigt wurde, ist NCAM 180 mit Spectrin assoziiert, einem Cytoskelettprotein, das Membranproteinkomplexe mit filamentösen Actin verbindet [Pollerberg et al., 1987]. Die intrazelluläre Kopplung von endogenen NCAM 180 an das Cytoskelett und die extrazelluläre cis-Interaktionen mit weiteren Transmembranproteinen wie L1 oder über L1 mit CD 9 und  $\beta$ 1-Integrinen [Schmidt et al., 1996] haben vermutlich einen stabilisierenden Effekt auf die Form/Gestalt der Zelle. Dieser Zellform-stabilisierende Effekt wiederum könnte die Bereitschaft der Zelle, an dynamischen Prozessen teilzunehmen, vermindern (dem Cytoskelett-mobilisierenden Prozeß des Neuritenwachstums entgegenwirken), so daß endogenes NCAM 180 als Gegenspieler von NCAM 140 angesehen werden kann. In TMcytNCAM 180-überexprimierenden PC12-Zellen binden nun die Cytoskelettelemente, wie z.B. Spectrin, vor allem an den zusätzlichen membranassoziierten cytoplasmatischen Domänen von NCAM 180 und weniger an endogenes NCAM 180 oder anderen Cytoskelett-assoziiierenden Adhäsionsmolekülen. Dies inhibiert die Funktion von endogenen

NCAM 180, sich und andere Membranproteine an das Cytoskelett zu koppeln, so daß es zu einer Destabilisierung der Verbindungen zwischen der Zellmembran mit seinen Zelladhäsionsmolekülen und dem Cytoskelett kommt. Vermutlich ist die Anwesenheit der extrazellulären Domäne von NCAM 180 und damit auch die cis-Interaktionen zu anderen Proteinen notwendig, um durch Kopplung an das Cytoskelett die Zellgestalt zu stabilisieren. Die zusätzlichen cytNCAM 180-Domänen können zwar an Cytoskelettproteine binden, doch vermögen sie nicht, den gleichen Effekt auszuüben wie endogenes NCAM 180. Dadurch wird der anti-neuritogene Effekt von endogenen NCAM 180 minimiert und die über NCAM 140-vermittelte Neuritenbildung kann ungebremst ablaufen. Möglich ist aber auch, daß die an TMcytNCAM 180-gekoppelten Cytoskellelemente anders organisiert sind als bei Bindung an endogenen NCAM 180.

Die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen teilweise die von Kolkova et. al (2000) durchgeführten Studien [Kolkova et al., 2000b]. Sie zeigten, daß die Expression der löslichen cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140 in PC12-Zellen das Neuritenwachstum auf NCAM-exprimierenden Fibroblasten inhibiert. Dagegen beobachteten sie keinen Effekt bezüglich des Neuritenwachstums in cytNCAM 180-exprimierenden PC12-Zellen. Während Kolkova et. al nur die cytoplasmatischen Domänen von NCAM transfizierten, wurden in dieser Arbeit die cytoplasmatischen Domänen mit Transmembrandomäne und Signalsequenz transfiziert, so daß die cytoplasmatischen Domänen membranassoziiert in PC12-Zellen exprimiert werden. Die Membranassoziation von cytNCAM 180 ist also entscheidend dafür, daß diese PC12-Zellen längere Neuriten bilden als die Kontrollzellen. Die überexprimierten löslichen cytNCAM 180-Moleküle bei Kolkova et al. binden vermutlich innerhalb des Cytoplasmas andere Cytoskelettproteine (nicht cortikale) als die membranassoziierten NCAM 180-Moleküle.

Die Interaktion von NCAM 180 mit Spectrin oder anderen Cytoskelettkomponenten könnte dessen Konformation verändern und sterisch den Kontakt des neuritogenen Peptids mit den cytoplasmatischen Liganden verhindern. Die Zunahme des Neuritenwachstums in den TMcytNCAM 180-überexprimierenden PC12-Zellen könnte daher auch so erklärt werden: Durch das Wegfangen von Cytoskelettproteinen, wie z.B. Spectrin, durch die überexprimierten TMcytNCAM 180-Moleküle, sind die endogenen NCAM 180-Moleküle nicht mehr mit Cytoskelettproteinen assoziiert. Dadurch sind Peptidsequenzen innerhalb der cytoplasmatischen Domäne des endogenen NCAM 180 freigelegt, so daß nun cytoplasmatische neuritogene Liganden, die sonst nur an NCAM 140 binden, auch an endogenes NCAM 180 binden können. Das würde bedeuten, daß in den TMcytNCAM 180-exprimierenden PC12-Zellen sowohl endogenes NCAM 140 als auch endogenes NCAM 180 Signale auslösen, die zu einem NCAM-vermittelten Neuritenwachstum führen. Die nun von mehr NCAM-Molekülen ausgelöste neuritogene Signaltransduktion resultiert in einem gesteigerten Neuritenwachstum.

Zusammenfassend läßt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigen, daß endogenes NCAM 180, vermutlich aufgrund seiner Assoziation mit dem Cytoskelett, nicht am NCAM-vermittelten Neuritenwachstum beteiligt ist, während NCAM 140 Neuritenwachstum stimuliert. Weiterführend läßt sich die Hypothese aufstellen, daß die Expression von NCAM 180 nicht nur keinen Beitrag zur NCAM-vermittelten Neuritenwachstum ausübt, sondern

sogar einen anti-neuritogenen Effekt hat. Die Anwesenheit von NCAM 180 innerhalb einer Zelle könnte das von NCAM 140-vermittelte Neuritenwachstum inhibieren. Diese Hypothese führt zu einem Modell, bei welchem das Expressionsverhältnis von NCAM 140 zu NCAM 180 ausschlaggebend für die Intensität des Neuritenwachstums ist. Je mehr NCAM 180 von einer Zelle exprimiert wird, desto geringer wird der NCAM 140-stimulierende Effekt auf das Neuritenwachstum sein. PC12-Zellen, die beide Isoformen exprimieren, sollten nach diesem Modell kürzere Neuriten bilden, als PC12-Zellen, die nur NCAM 140 exprimieren. Zur Bestätigung dieses Modelles müßte das Neuritenwachstum von Wildtyp-PC12-Zellen mit dem Neuritenwachstum von PC12-Zellen, bei denen NCAM 180 „ausgeknockt“ ist, verglichen werden.

Dieses Modell ist auch mit bisherigen Beobachtungen in Einklang zu bringen. So wird NCAM 180 vor allem in ausdifferenzierten Zellen exprimiert [Pollerberg et al., 1985], während NCAM 140 schon früher in der Entwicklung von undifferenzierten Zellen exprimiert wird. Durch Zunahme der NCAM 180-Expression innerhalb einer Zelle könnten auswachsende Neuriten in ihrem Wachstum allmählich gestoppt werden.

### **4.3. Identifizierung neuer potentieller Bindungspartner für die cytoplasmatischen Domänen für NCAM 140 und NCAM 180**

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Ligandenaffinitätschromatographie und anschließender MALDI-TOF-MS- und Westernblot-Analysen neue potentielle cytoplasmatische Bindungspartner für NCAM 180 und NCAM 140 identifiziert. Mittels Immunaaffinitätschromatographie wurden cytNCAM 140 und cytNCAM 180 als rekombinante Proteine mit einem Histidin-Tag gereinigt und nach Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose für die Ligandensuche von intrazellulären Interaktionspartnern verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Ligandensuche diente eine Cytosolfraction von Rattenhirn, sowie eine Membranprotein-haltige und eine Cytoskelettprotein-angereicherte Fraktion des Rattenhirns.

19 der in den cytNCAM 180-Säuleneluatenvorkommenden Proteine wurden in der MALDI-TOF-MS analysiert. Von diesen konnten 10 durch Peptide-Mass-Fingerprinting in der Datenbank identifiziert werden (siehe Tab. 2): MAP 1A,  $\alpha$ -Tubulin,  $\beta$ -Tubulin,  $\beta$ -Actin,  $\alpha$ -Actinin, LANP, TOAD-64, Syndapin I, VCP und die RhoA-bindende Kinase  $\alpha$ . Alle 10 Proteine konnten auch in den Eluatenvon cytNCAM 180 mittels Westernblot-Analyse identifiziert werden. Zusätzlich wurden in den Eluatenvon cytNCAM 180 durch Westernblot-Analyse Tropomyosin, p130Cas und die Enzyme PLC $\gamma$ , PP1 und PP2A als spezifische Bindungspartner von NCAM 180 identifiziert. In den Eluatenvon cytNCAM 140 wurden die Cytoskelettproteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, Spectrin und  $\alpha$ -Actinin identifiziert, nicht aber  $\beta$ -Actin, MAP1A und Tropomyosin. Auch die Enzyme PLC $\gamma$ , PYK2, PP1 und PP2A, sowie die Proteine p130Cas, LANP, Syndapin und VCP wurden in cytNCAM 140-Säuleneluatenvon identifiziert. Dafür konnte die MAPK ERK2 als ein cytNCAM 140-spezifischer Bindungspartner identifiziert werden.

Während bis vor kurzer Zeit nur für die NCAM 180-Isoform eine Assoziation mit dem Cytoskelett-Verbindungsprotein **Spectrin** beschrieben wurde [Pollerberg et al., 1987], konnte

in dieser Arbeit gezeigt werden, daß auch NCAM 140 mit Spectrin assoziieren kann. Dies bestätigen auch die Versuche von Leshyn'ska et al. (2003), die zeigten, daß NCAM 140 und 180 direkt mit  $\beta$ 1-Spectrin interagieren können und innerhalb von „lipid rafts“ auch NCAM 120 in der Lage ist, mit Spectrin Triton X-100-unlösliche Komplexe zu bilden. [Leshchyn'ska et al., 2003]. Diese Autoren zeigten zusätzlich, daß die Proteinkinase C $\beta$  nach NCAM-Aktivierung verstärkt an NCAM-Spectrin-Komplexe bindet. Diese Komplexe konzentrieren sich in „lipid rafts“ und sind für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum notwendig. Spectrin scheint also die Bindung von aktivierter PKC $\beta$  an einen NCAM-Spectrinkomplex zu vermitteln und dadurch Neuritenwachstum zu kontrollieren. Dies zeigt eine neue Eigenschaft der Funktion von Spectrin.

Das für NCAM 140 und NCAM 180 als Bindungspartner identifizierte  **$\alpha$ -Actinin** ist ebenfalls ein Actin-bindendes Cytoskelettprotein, welches für die Bündelung von Actinfilamenten verantwortlich ist. In focalen Adhäsionskontakten bindet  $\alpha$ -Actinin entweder direkt an die  $\beta$ 1-Untereinheit von Integrinen oder indirekt über Vinculin und Talin und vermittelt die Interaktion zu Actinfilamenten [Aplin et al., 1998]. Auch Cadherine werden mittels einer Interaktion von  $\alpha$ -Catenin und  $\alpha$ -Actinin an das Actincytoskelett gekoppelt. Obwohl die beiden actinbindenden Proteine Spectrin und  $\alpha$ -Actinin sowohl im cytNCAM 180- als auch im cytNCAM 140-Säuleneluat anwesend waren, konnten  **$\beta$ -Actin** und das actinstabilisierende Protein **Tropomyosin** nur im Eluat der cytNCAM 180-Säule nachgewiesen werden. Eine Erklärung wäre, daß an NCAM 140 nur  $\alpha$ -Actinin und Spectrinmonomere binden, die nicht an  $\beta$ -Actin assoziiert sind bzw. in einer Konformation vorliegen, in welcher sie kein  $\beta$ -Actin binden. Oder aber  $\beta$ -Actin und/oder Tropomyosin binden direkt an die cytoplasmatische Domäne von NCAM 180 aber nicht an NCAM 140.

Der Kontakt zu Mikrotubuli stellt eine weitere Möglichkeit von Transmembranproteinen dar, mit dem Cytoskelett zu interagieren. Die aus 13 Protofilamenten bestehenden Mikrotubuli, die aus  **$\alpha$ -** und  **$\beta$ -Tubulin**-Monomeren aufgebaut sind, stellen die strukturgebenden Hauptkomponente von Axonen und Dendriten dar und ermöglichen den intrazellulären axonalen Transport von Vesikeln. 10–20% des Protein-Hirnextraktes sind Tubuline. Die Lokalisation der Mikrotubuli, vor allem deren Anreicherung in Neuriten machen eine Interaktion mit NCAM 180 und NCAM 140 wahrscheinlich. Für NCAM 180 konnte in dieser Arbeit außerdem die Interaktion mit MAP 1A gezeigt werden.

**Microtubuli assoziierte Proteine (MAPs)** sind hochmolekulare, langgestreckte Moleküle, die an Mikrotubuli assoziiert sind. Sie stabilisieren die sonst instabilen Microtubuli und sind für die dreidimensionale Mikrotubulianordnung und deren Bündelung z.B. beim Auswachsen der Neuriten verantwortlich [Maccioni & Cambiazo, 1995]. MAP 1A ist in Axonen, Dendriten und dem Zellsoma lokalisiert, also in Bereichen, wo auch NCAM 180 exprimiert wird und stabilisiert vermutlich bereits ausgewachsene Neuriten. MAP 1A wird aber auch eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Neuroblasten zugeschrieben [Oudega et al., 1998].  $\alpha$  und  $\beta$ -Tubulin könnten indirekt über MAP 1A mit NCAM 180 verbunden sein oder direkt mit NCAM 180 und NCAM 140. Im cytNCAM 140-Eluat konnte nur eine ganz schwache MAP 1A-Bande in der Westernblot Analyse nach 30-minütiger Belichtungszeit



gesehen werden, die in Abb. 26 allerdings kaum zu erkennen ist. Ob MAP 1A daher auch ein Bindungspartner für cytNCAM 140 ist, bleibt offen.

Der (auf den ersten Blick) widersprüchliche Befund, daß nicht nur NCAM 180, sondern nun auch NCAM 140 mit dem Cytoskelett verbunden ist, NCAM 180 jedoch das Neuritenwachstum nicht stimulieren kann, könnte am einfachsten dadurch erklärt werden, daß NCAM 180 mengenmäßig mit mehr Cytoskelettproteinen assoziiert ist als NCAM 140 und möglicherweise die gebundenen Cytoskelettelemente anders organisiert sind. Die Cytoskelettproteine könnten auch eine höhere Affinität zu NCAM 180 als zu NCAM 140 haben. Leshynsk`a et al. (2003) zeigten, daß mit NCAM 140 nur etwa 2/3 der Menge an Spectrin präzipitiert werden konnte, die mit NCAM 180 copräzipitiert wurde. Auch die Tatsache, daß  $\beta$ -Actin und Tropomyosin im cytNCAM 180-Säulen-Eluat aber nicht im cytNCAM 140-Säuleneluat identifiziert werden konnte, spricht dafür, daß NCAM 180 verstärkt oder mehr mit Cytoskelettproteinen assoziiert ist als NCAM 140.

Das **Leucine-Rich-Acidic-Nuclear-Protein (LANP)** wurde als spezifischer Bindungspartner für NCAM 140 und NCAM 180 in der Ligandenaffinitätschromatographie identifiziert. In Pull-down-Experimenten mit GST-fusionierten LANP (pp32) und rekombinanten cytNCAM konnte eine direkte Assoziation von LANP mit NCAM 140 und NCAM 180 nachgewiesen werden. Bei LANP handelt es sich um ein 31 kD großes Protein, das erstmals 1994 aus Ratten-Cerebellum isoliert wurde [Matsuoka et al., 1994]. Es wird in frühen Stadien der postnatalen Entwicklung verstärkt im ZNS und dort vor allem in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns exprimiert. Aufgrund der zelltypspezifischen Expression könnte LANP eine Rolle in Signaltransduktionsprozessen spielen, welche die Differenzierung von Cerebellum-Neuronen steuern. Strukturell zeichnet sich LANP durch N-terminale Leucin-reiche Wiederholungen, die wahrscheinlich Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, und einer sauren C-terminalen Domäne, in der sich ein Kernlokalisierungssignal (NLS; Sequenz: KKKRK) befindet, aus. Ulitzer et al. (1997) zeigten, daß das humane Protein Mapmodulin homolog zu Ratten-LANP ist und identisch mit humanen PHAP-1 (Putative Human-Leukocyte-Antigen-Class II-Associated-Protein; ) [Ulitzur et al., 1997]. Ein drittes Synonym für das humane LANP ist pp32 [Brennan et al., 2000]. Die Aminosäuresequenzhomologie zwischen Mapmodulin und Ratten-LANP beträgt 83,6%. Während LANP von Matsuoka et al. als ein hauptsächlich im Nucleus lokalisiertes Protein beschrieben wurde, konnte Mapmodulin im Cytoplasma als auch membranassoziiert an ER und Golgi-Komplexen (3-5 %) gefunden werden. Phosphoryliertes Mapmodulin ist in der Lage, an die Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP 2, MAP 4 und tau über deren Mikrotubuli-bindende Domäne zu binden [Ulitzur et al., 1997]. Mapmodulin vermag dadurch freie MAPs daran zu hindern an Mikrotubuli zu binden und ermöglicht die Translokation von Organellen. Neueste Studien zeigten, daß LANP während der neuronalen Differenzierung beim Prozeß der Neuritenbildung den Kern verläßt und ins Cytoplasma transloziert [Opal et al., 2003]. Dort kann es mit einer der leichten Ketten von MAP 1B interagieren und erlaubt dadurch vermutlich eine größere Flexibilität des neuronalen Cytoskeletts und somit Neuritenwachstum [Opal et al., 2003]. MAP 1A und MAP 1B zeigen eine hohe Sequenzhomologie (80%) insbesondere innerhalb der leichten Kette. MAP 1B wird etwas früher in der Entwicklung exprimiert als

MAP 1A, wenn das Cytoskelett noch sehr dynamisch ist. MAP 1A spielt wahrscheinlich eine Rolle in der dauerhaften Stabilisierung von Neuriten. Da LANP mit diversen MAPs interagieren kann, ist es denkbar, daß LANP als Verbindungsprotein zwischen NCAM 180 und MAP 1A fungiert. Zwar wird LANP in der Maus /Ratte vor allem in der ersten und zweiten postnatalen Woche synthetisiert, doch wird im adulten Tier immerhin noch 1/3 des LANP-Expression-Maximums exprimiert. Da LANP direkt an NCAM 140 zu binden scheint, könnte LANP auch ein neues Signalmolekül in der NCAM 140-vermittelten Signaltransduktion darstellen.

Interessant ist, daß das zu Ratten-LANP homologe humane PHAP-1 (oder  $I_1^{PP2A}$ ) ein hitzestabiler Inhibitor der Proteinphosphatase 2A ist. Dagegen kann PHAP-1 *in vitro* in der Gegenwart von  $Mn^{2+}$  die Dephosphorylierung bestimmter Substrate durch die Proteinphosphatase 1 stimulieren [Katayose et al., 2000] [Li et al., 1996]. LANP bzw. PHAP-1 kann demnach als eine regulatorische Untereinheit der PP2A und der PP1 angesehen werden.

Sowohl **PP1** als auch **PP2A** konnten als mögliche Bindungspartner für NCAM 140 und NCAM 180 identifiziert werden. Bisher sind 100 Säugerproteine bekannt, die direkt oder indirekt an die katalytische Untereinheit der Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A binden [Bollen, 2001]. So bindet eine PP1-Isoform an FAK und an  $\alpha 5$ -Integrine. Die cytoplasmatische Domäne von NCAM 180 verfügt über 28 potentielle Serin- und 21 potentielle Threonin-Phosphorylierungsstellen, die cytoplasmatische Domäne von NCAM 140 über 5 potentielle Serin- und 6 potentielle Threonin-Phosphorylierungsstellen. Eine Dephosphorylierung der phosphorylierten Serin-/Threonin-Reste durch PP1 oder PP2A ist daher gut vorstellbar. LANP könnte dabei als Regulator der Dephosphorylierung von NCAM fungieren. Z.B. könnte an NCAM gebundenes LANP die Dephosphorylierung von Serin-/Threonin-Resten durch PP2A inhibieren, während nicht mit LANP assoziiertes NCAM von PP2A dephosphoryliert werden kann.

**Syndapin I (Synaptic-Dynamin-Associated-Protein)** ist ein weiterer interessanter Bindungspartner von NCAM 140 und NCAM 180. Erstmals wurde Syndapin I 1998 als ein im Rattenhirn stark angereichertes Protein von 52 kD beschrieben. Syndapin bindet an Dynamin, eine GTPase, die an der Clathrin-vermittelten Endocytose von synaptischen Vesikeln an den präsynaptischen Endigungen beteiligt ist [Qualmann et al., 1999]. (Nach Fusion der synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Membran werden diese ca. 20 s später wieder durch Endocytose aufgenommen.) Da Syndapin über eine SH3-Domäne im C-Terminus und über 2 coiled-coil-Stretches verfügt, wird vermutet, daß Syndapin an vielen Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. So sind neben der Bindung an Dynamin die Interaktionen mit Synaptojanin, Synapsin und dem neuronalen Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP), welches eine Rolle in der Reorganisation des Actin-Cytoskeletts spielt, bekannt. Durch Aktivierung von Arp2/3 via N-WASP kann Syndapin auch die Formierung actin-reicher Filopodien vermitteln [Qualmann & Kelly, 2000]. N-WASP interagiert und aktiviert den Arp 2/3-(Actin-related Protein)-Komplex, welcher die Bildung von Actin-filamenten (Actinpolymerisierung) stimuliert. Die Syndapin-WASP-Interaktion und die resultierende lokale Actinpolymerisierung scheinen aber auch für den Vorgang der Ein-

schnürung und der Bewegung der Clathrin-beschichteten Vesikel von der Zellmembran weg wichtig zu sein [Kessels & Qualmann, 2002]. Syndapin kann daher als ein Protein betrachtet werden, welches die endocytotische Maschinerie mit dem Actincytoskelett koppelt.

Die Endocytose stellt einen von der Biosynthese-unabhängigen Mechanismus dar, die Menge an Zelloberflächen-exprimierten Proteinen zu kontrollieren. Viele membranständige Rezeptoren werden durch Clathrin-vermittelte Endocytose oder durch Clathrin-unabhängige Endocytose (z.B. Proteine innerhalb der „lipid rafts“, Caveolae), internalisiert. Lern- und Gedächtnisprozesse konnten mit schnellen und vorübergehenden Änderungen der PSA-NCAM-Oberflächenexpression in Zusammenhang gebracht werden [Cremer et al., 1994b]. Diese Änderungen werden wahrscheinlich durch Endo- und Exocytose reguliert. NCAM wird vermutlich über Clathrin-vermittelte Endocytose internalisiert. So konnten Minana et al. (2001) in Immunfluoreszenz-Untersuchungen eine Colokalisation von internalisierten NCAM und PSA-NCAM mit Clathrin und  $\alpha$ -Adaptin, eine Untereinheit des AP-2-Komplexes (Adapter-Komplex) sowie mit Transferrin beobachten [Minana et al., 2001]. Transferrin wird Clathrin-abhängig endocytiert und wird gewöhnlich als Marker für frühe Endosomen benutzt [Klausner et al., 1983]. Weiterhin konnte Clathrin und  $\alpha$ -Adaptin mit NCAM coimmunpräzipitiert werden [Minana et al., 2001]. Die in dieser Arbeit gefundene Assoziation von NCAM mit Syndapin liefert einen weiteren Hinweis für eine Internalisierung von NCAM durch Clathrin-vermittelte Endocytose. Viele Proteine, die Clathrin-abhängig endocytiert werden, wie z.B. L1 [Kamiguchi et al., 1998] und CD3 [Dietrich et al., 1997], besitzen in der cytoplasmatischen Domäne ein Internalisierungssignal, an welches  $\alpha$ -Adaptin des AP-2-Komplexes bindet und die Endocytose einleitet. Bei diesem Signal handelt es sich entweder um die Tyrosin-haltige Consensussequenz oder ein Dileucinmotiv [Kirchhausen et al., 1997]. Es ist noch nicht bekannt, mit welcher NCAM-Region AP-2 interagiert; doch besitzen NCAM 140 und 180 ein Dileucinmotiv (LLMCIAVNLC) [Small et al., 1987], das sich 12 Aminosäuren stromabwärts der Transmembrandomäne befindet und als Internalisierungssignal fungieren könnte.

Die Syndapin-NCAM-Interaktion könnte neben der Endocytose auch andere zelluläre Prozesse beeinflussen. Das Vorkommen von NCAM 140 und Syndapin I an der Spitze von auswachsenden Filpodien in Wachstumskegeln [Qualmann & Kelly, 2000] ist ein weiterer Anhaltspunkt für eine mögliche Interaktion und könnte auf eine Zusammenarbeit bezüglich des Auswachsens von Neuriten hindeuten.

SH3-Domänen-tragende Proteine erkennen und binden mit ihrer SH3-Domäne prolinreiche Sequenzen ihrer Bindungspartner. Die SH3-Domäne von Syndapin könnte eine direkte Interaktion mit NCAM vermitteln. Über die gesamte Länge der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 befinden sich viele Prolinreste. Besonders in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 180 ist der Prolinanteil mit 13,9% (54 Prolinreste von 386 Aminosäuren) außerordentlich hoch. Im cytNCAM 180-spezifischen Insert befindet sich außerdem eine 66-Aminosäuren lange prolinreiche Region. Die cytoplasmatische Domäne von NCAM 140 enthält 12 Prolinreste was einem prozentualen Anteil von 8,7% entspricht und auch noch relativ hoch ist. In der NCAM 180-Sequenz befinden sich an drei Stellen das potentielle SH3-Bindemotiv PxxP. Eine über die SH3-Domäne vermittelte direkte Interaktion

von Syndapin mit den prolinreichen Regionen von NCAM ist daher vorstellbar. In dieser Arbeit konnte außerdem im LANP-Pull-down eine Syndapin-LANP-Interaktion nachgewiesen werden. Möglich wäre daher auch eine indirekte Interaktion von NCAM mit Syndapin über LANP.

Das **Valosin-Containing-Protein (VCP)** oder p97, ein weiterer möglicher Bindungskandidat für beide transmembranären NCAM-Isoformen, gehört zur großen Proteinfamilie der ATPasen mit diversen Funktionen (AAA-Familie: *ATPase associated with a variety of cellular activities family*) [Zalk & Shoshan-Barmatz, 2003]. VCP ist am intrazellulären Vesikeltransport und der Fusion von Vesikeln beteiligt und moduliert dabei vermutlich Protein-Protein-Interaktionen. Eine kleine Fraktion von VCP wurde im Komplex mit Clathrin gefunden [Pleasure et al., 1993]. VCP weist auch strukturelle und katalytische Ähnlichkeiten mit Chaperonen auf. Außerdem spielt VCP eine Rolle bei der Degradation von ubiquitinierten Proteinen; über seine N-terminale Domäne assoziiert VCP mit den Ubiquitin-Ketten und lenkt die markierten Proteine zu den Proteasomen [Dai & Li, 2001].

**TOAD-64 (Turned-On-After-Division)** ist ein Mitglied der TUC-Familie (TOAD/Ulip/CRMP) (Ulip = UNC 33-Like-Protein) (CRMP: „Collapsin-Response-Mediator-Protein). Proteine dieser Familie sind homolog zu dem in *Caenorhabditis elegans* vorkommenden UNC-33-Protein [Quinn et al., 1999]. TUCs werden in der embryonalen und der frühen postnatalen Entwicklung in neuralen Geweben stark hochreguliert. TOAD-64 wird von postmitotischen Neuronen exprimiert und hat sein Expressionsmaximum während des Neuritenwachstums [Geschwind et al., 1996]. Die Abnahme der TOAD-Expression nach beendeten Neuritenwachstum, als auch die Reexpression von TOAD-64 in Ischiasneuronen, deren Axone durchtrennt wurden, lassen vermuten, daß TOAD-64 eine Rolle im Neuritenwachstum spielt [Minturn et al., 1995]. Im adulten Organismus wird TOAD-64 im Gyrus dendatus des Hippocampus, wo zeitlebens Neurogenese stattfindet, von unreifen Neuronen exprimiert. Daher gilt TOAD-64 auch als Marker für unreife Neuronen. TOAD-64 ist ein cytoplasmatisches Protein, kann aber auch an der Membran assoziiert sein, so daß die Möglichkeit einer Interaktion mit NCAM besteht. In den Immunfluoreszenzuntersuchungen dieser Arbeit wurde TOAD-64 in Membrannähe entlang der Neuriten aber auch am Zellsoma lokalisiert, Bereiche, in denen auch NCAM exprimiert wird. Byk et al. (1996) beschrieben eine starke Anreicherung von TOAD-64 in den Neuriten und Wachstumskegeln [Byk et al., 1996]. TUCs scheinen für die Collapsin-1/Semaphorin D-Signaltransduktion notwendig zu sein [Goshima et al., 1995], allerdings ist noch nicht klar, wie oder über welche Interaktionen TOAD-64 in diesem Signaltransduktionsweg beteiligt ist. Es ist vorstellbar, daß TOAD-64 auch als Signalmolekül in der NCAM-vermittelten Signaltransduktion fungiert. Da NCAM 140 und TOAD-64 beim Neuritenwachstum eine Rolle spielen, ist es allerdings verwirrend, daß TOAD-64 die Interaktion mit NCAM 180 bevorzugt. Im cytNCAM 140-Säuleneluat konnte kein TOAD-64 in der Westernblot-Analyse nachgewiesen werden.

Die **Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ )** konnte in der Ligandenaffinitätschromatographie als weiterer Bindungspartner von NCAM 140 und NCAM 180 identifiziert werden. PLC $\gamma$  konnte außer-

dem mit NCAM aus Maushirnsolubilisat coimmunpräzipitiert werden, was einen weiteren Hinweis für eine Interaktion liefert. Durch Verwendung verschiedener PLC $\gamma$ 1-Konstrukte, die unterschiedliche strukturelle Bereiche der PLC $\gamma$ 1 abdecken, konnte in Pull-down-Experimenten die Interaktion mit NCAM lokalisiert werden. Sowohl NCAM 140 als auch NCAM 180 binden an die PH-Domäne und an die C-terminale SH2-Domäne von PLC $\gamma$ 1. Dabei scheint NCAM 140 eine höhere Bindungsaffinität für die C-terminale SH2-Domäne zu haben als NCAM 180, da relativ mehr NCAM 140 als NCAM 180 an die SH2-Domäne band. In PLC $\gamma$ -Pull-down-Experimenten mit gereinigten cytNCAM-Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, daß es sich bei der NCAM-PLC $\gamma$ -Interaktion um eine direkte Interaktion handelt und daß NCAM die Interaktion mit der C-terminalen SH2-Domäne gegenüber der PH-Domäne bevorzugt. Die PLC $\gamma$  wird generell durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Nicht-Rezeptor-tyrosinkinasen aktiviert und moduliert den Gehalt an membranverankerten Phosphoinositiden, den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Gehalt und die Proteinkinase C-Aktivierung [Rhee & Bae, 1997]. Der Phosphoinositid-Metabolismus spielt eine wichtige Rolle für die Kontrolle vieler zellulärer Prozesse, wie Zellteilung, Differenzierung, Überleben der Zellen, Zellgestalt und der Zellmigration [Divecha & Irvine, 1995]. PLC $\gamma$  hydrolysiert das Phosphoinositid PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und Diacylglycerol, wobei IP<sub>3</sub> einen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem ER induziert und Diacylglycerol zusammen mit Ca<sup>2+</sup> die PKC aktiviert (siehe Einleitung). Während eine der SH2-Domänen von PLC $\gamma$  die Bindung an die autophosphorylierte Tyrosin-Bindungsstelle des stimulierten Wachstumsfaktorrezeptor vermittelt, induziert die PH-Domäne die Dirigierung der PLC $\gamma$  zur Membran und bindet an membraninternes PIP<sub>3</sub>. Falasca et al. zeigten, daß die PH-Bindung an PIP<sub>3</sub> für die Aktivierung der PLC $\gamma$  genauso notwendig ist wie die SH2-vermittelte PLC $\gamma$ -Bindung an den Wachstumsfaktorrezeptor. Dabei hängt die PH-PIP<sub>3</sub>-Bindung von der Aktivierung der PI3-Kinase ab, die ebenfalls an eine autophosphorylierte-Tyrosinbindungsstelle des Wachstumsfaktorrezeptors bindet und Phosphoinositide der Membran phosphoryliert. Ein Hauptprodukt der PI3-Kinase ist PIP<sub>3</sub>, an welches die PH-Domäne von PLC $\gamma$  bindet [Falasca et al., 1998]. Da die PH-Domänen von Signalmolekülen im allgemeinen Phosphoinositide wie PIP<sub>2</sub> und PIP<sub>3</sub> erkennen, ist es fraglich, ob die PH-Domäne von PLC $\gamma$  tatsächlich direkt an NCAM bindet, wie es die PLC $\gamma$ -Pull-down-Experimente mit gereinigten cytNCAM zeigen. Die C-terminale SH2-Domäne hat jedoch eine höhere Affinität zu NCAM als die PH-Domäne (Abb. 32) und bevorzugt die Interaktion mit NCAM 140 gegenüber NCAM 180. Erstaunlich ist, daß weder NCAM 140 noch NCAM 180 über eine potentielle Tyrosinphosphorylierungsstelle verfügen, an welche die SH2-Domäne binden könnte. Vermutlich bindet in diesem Fall die SH2-Domäne unabhängig von einer phosphorylierten-Tyrosinbindungsstelle an NCAM. Der einzige in NCAM vorkommene Tyrosinrest befindet sich 5 Aminosäuren stromabwärts der Transmembrandomäne, weist aber nicht die für Phosphorylierung typische Konsensussequenz auf. In dieser Arbeit konnte erstmals eine PLC $\gamma$ -NCAM-Interaktion gezeigt werden. Während für Neurone und PC12-Zellen bisher noch keine veröffentlichten Daten vorliegen, die eine Interaktion zwischen PLC $\gamma$  und NCAM beweisen, konnte in einer NCAM-exprimierenden  $\beta$ -Zell-Tumorlinie des Pankreas PLC $\gamma$  mit NCAM coimmunpräzipitiert werden [Cavallaro et al., 2001]. In jenem Fall wird vermutet, daß in den

pankreatischen  $\beta$ -Tumorzellen NCAM nicht direkt mit PLC $\gamma$  interagiert, sondern indirekt über den ebenfalls präzipitierbaren FGF-Rezeptor.

In dieser Arbeit konnte erstmals PLC $\gamma$  mit NCAM aus Hirnsolubilisat coimmunpräzipitiert und eine direkte Interaktion zwischen beiden Molekülen mittels Pull-down nachgewiesen werden. Nach dem gängigen Modell stimuliert NCAM nach Ligandenbindung über die direkte Interaktion mit dem FGF-Rezeptor indirekt die PLC $\gamma$ . Möglich ist, daß PLC $\gamma$  mit seiner C-terminalen SH2-Domäne gleichzeitig an NCAM und an den FGF-Rezeptor bindet, oder aber die PLC $\gamma$  ist über die C-terminale SH2-Domäne an NCAM und über die N-terminale SH2-Domäne an den FGF-Rezeptor gebunden. Ähnlich wie PIP<sub>3</sub> könnte stimuliertes NCAM die Rekrutierung der PLC $\gamma$  zur Membran induzieren. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß PLC $\gamma$  konstitutiv mit NCAM assoziiert ist und nach NCAM-NCAM-Interaktion eine Konformationsänderung erfährt und aufgrund der Lokalisation schneller oder auch mit höherer Affinität an den FGF-Rezeptor bindet.

Die MAPK **ERK** spielt eine entscheidende Rolle in der NCAM 140-vermittelten Signaltransduktion. Die ERKs stellen eine der drei Subfamilien der MAPK-Superfamilie dar. Für die MAPK-Kaskade ist die serielle Aktivierung dreier Proteinkinasen, die sich durch gegenseitige Phosphorylierung regulieren charakteristisch. Die ERKs spielen eine zentrale regulatorische Rolle in der Zellteilung und der Differenzierung [Sweatt, 2001]. ERKs sind aber auch in postmitotischen Funktionen differenzierter Zellen involviert, z.B. werden sie in allen Neuronen des reifen ZNS exprimiert und spielen eine Rolle beim Lernen und Gedächtnis [Sweatt, 2001]. Viele verschiedene Stimuli, zu denen Wachstumsfaktoren, Cytokine, Virus Infektionen, Liganden G-Protein gekoppelter Rezeptoren, transformierende Agentien und Carcinogene gehören, aktivieren den ERK1- und ERK2-Signalweg [Johnson & Lapadat, 2002]. Dabei wird ERK entweder über Ras/Raf-1/MEK [Marais & Marshall, 1996] oder cAMP abhängig über PKA/Rap1/B-Raf/MEK [Vossler et al., 1997] aktiviert. Aktivierte ERKs können verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, wie CREB, ELK-1 und c-Myc und regulieren damit die Genexpression.

ERK2 konnte in der Ligandenaffinitätschromatographie als potentieller Bindungspartner für NCAM 140 identifiziert werden. Die Serin-Threonin-Kinase ERK2 könnte NCAM 140 an Serin- und Threonin-Resten phosphorylieren. Die direkte Interaktion der ERK2 mit NCAM oder die mögliche Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten von NCAM könnte die Bindung weiterer Interaktionspartner an NCAM induzieren oder erleichtern. Ebenso könnte auch ERK durch Bindung an NCAM eine Konformationsänderung erfahren, die zu einer veränderten Substratspezifität führen könnte. Es ist aber auch möglich, daß ERK2 nicht direkt an NCAM 140 bindet, sondern in einem Assoziationskomplex vorliegt.

Auch **p130Cas** (Cas = crk-associated substrate) konnte als Bindungspartner von NCAM 140 und NCAM 180 identifiziert werden. p130Cas ist ein Dockingprotein, welches viele SH3- und SH2-Domänen sowie SH2-bindende Motive enthält [Sakai et al., 1994]. Ein Pool von p130Cas ist konstitutiv via der SH3-Domäne mit einer prolinreichen Region von FAK assoziiert, nach Adhäsionsprozessen wird diese Interaktion durch aktivierte Src-Kinase

stabilisiert. p130Cas spielt in der Integrin-vermittelten Signaltransduktion eine Rolle und stellt einen wichtigen Mediator der FAK-vermittelten Zellmotilität dar [Cary et al., 1998]. p130Cas wird von FAK bzw. vom FAK/Src-Komplex phosphoryliert und kann über das Adapterproteine Crk (Nck) eine Verbindung zum JNK/MAPK-Weg als auch zum ERK/MAPK-Weg unabhängig von der Grb2-Bindung an FAK herstellen [Schlaepfer et al., 1997]. Es ist vorstellbar, daß p130Cas auch in der NCAM 140-vermittelten Signaltransduktion eine Rolle spielt und an den NCAM-fyn-FAK-Komplex rekrutiert wird. FAK selber als auch die src-Kinase fyn konnten jedoch weder in den cytNCAM 140- noch in den cytNCAM 180-Säulen-Eluaten identifiziert werden. Gerade in dem cytNCAM 140-Säulen-Eluat wäre die Anwesenheit von FAK und fyn zu erwarten, da FAK nach extrazellulärer NCAM 140-Aktivierung an den NCAM 140-fyn-Komplex rekrutiert.

Anstelle von FAK konnte eine FAK-verwandte Tyrosinkinase als potentieller Interaktionspartner von NCAM 140 und NCAM 180 nachgewiesen werden: **PYK2** (Proline-rich-tyrosine-Kinase 2), auch beschrieben als focale Zelladhäsionskinase 2 (FADK 2) oder Zelladhäsionskinase  $\beta$  [Avraham et al., 1995]. PYK2 kann durch eine Vielzahl von extrazellulärer Stimuli, die einen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsanstieg induzieren, durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, durch Streßsignale oder durch Integrine aktiviert werden. Im Gehirn wurde die stärkste PYK2-Expression (diffus im Cytoplasma der Zellen) gemessen [Avraham et al., 2000]. FAK wird dagegen in fast allen Zellen exprimiert und ist den focalen Adhäsionskontakten adherierender Zellen lokalisiert [Schlaepfer et al., 1999]. PYK2 kann wie FAK mit p130Cas und Grb2 sowie mit der PI3-Kinase interagieren. PYK2 spielt eine Rolle in der  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Regulation von Ionenkanälen und wie FAK in der Aktivierung des ERK-MAPK-Wegs via Grb2-SOS und des JNK-MAPK-Signalweges via p130Cas, Crk und Rac [Blaukat et al., 1999; Dolfi et al., 1998]. Da PYK2 und p130Cas miteinander interagieren, könnten sie zusammen als Assoziationskomplex von den Säulen eluiert worden sein.

**ROK $\alpha$**  wurde in der Ligandenaffinitätschromatographie als Interaktionspartner für NCAM 180 identifiziert. Die Coimmunpräzipitation von ROK $\alpha$  mit NCAM aus Maushirn bestätigte dieses Ergebnis.

ROK $\alpha$  ist eine Serin-/Threonin-Proteinkinase, die mit der GTP-gebundenen, aktiven Form der kleinen GTPase RhoA interagiert. Als Downstream-Kinase von RhoA ist ROK $\alpha$  in verschiedenen Funktionen von RhoA involviert wie z.B. in der Formierung von Streßfasern und fokalen Adhäsionen [Ridley & Hall, 1992] sowie vermutlich bei der Regulation der Cytokinese. All diese Prozesse beinhalten eine Reorganisation des Cytoskeletts [Leung et al., 1996]. Inaktive ROK $\alpha$  befindet sich gewöhnlich im Cytoplasma und transloziert nach RhoA-vermittelter Aktivierung zur Membran, wo sie mit Actinmikrofilamenten in der Zellperipherie lokalisiert [Leung et al., 1995]. ROK $\alpha$  reguliert die Actinmyosin-Kontraktilität durch Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin (MLC, Myosin-Light-Chain), was zur Induktion der Actin-aktivierten Myosin-ATPase führt. Gleichzeitig phosphoryliert und inhibiert ROK $\alpha$  die Myosin-bindende-Untereinheit der Myosin-Phosphatase.

Während in Neuronen die Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 Neuritenwachstum induzieren (Rac1: fördert die Formierung von Lamellipodien [Ridley et al., 1992], Cdc42 fördert die Formierung von Filopodien), inhibiert RhoA und seine Downstream-Kinase ROK $\alpha$  das Neuritenwachstum und fördert das Kollabieren der Wachstumskegel [Luo, 2000]. Das Kollabieren wird z.T. durch ROK $\alpha$ -vermittelte Phosphorylierung und Aktivierung des Collapsin-Response-Mediator-Proteins (CRMP-2) induziert [Arimura et al., 2000].

Es ist vorstellbar, daß die aktive, membrannähe ROK $\alpha$  in einem Komplex mit NCAM 180 vorliegt, wobei NCAM 180 zur Membran-Rekrutierung der ROK $\alpha$  beitragen könnte. Da ROK $\alpha$  nur als möglicher Bindungskandidat für NCAM 180 und nicht für NCAM 140 gefunden wurde und da NCAM 180 als auch ROK $\alpha$  das Neuritenwachstum inhibieren, wurde untersucht, ob die Inhibition der ROK $\alpha$  sich auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum in PC12-Wildtypzellen und in TMcytNCAM 180-transfizierten PC12-Zellen auswirkt.

In NGF-stimulierten PC12-Zellen kommt es zu einer PI3-Kinase-vermittelten Aktivierung von Rac 1 und zu einer vorübergehenden Rac 1-vermittelten Inaktivierung von RhoA/ROK $\alpha$ , woraufhin RhoA und ROK $\alpha$  dissoziieren und ins Cytoplasma translozieren [Nusser et al., 2002]. Nishiki et al. konnten 1990 zeigen, daß die Inhibition von RhoA durch Clostridium Botulinum C3 Exoenzym, Neuritenwachstum in naiven (nicht mit NGF-behandelten-) PC12 induziert [Nishiki et al., 1990].

In dieser Arbeit wurde ROK $\alpha$  in PC12-Zellen mit dem spezifischen ROK $\alpha$ -Inhibitor Y27632 inaktiviert. Das Neuritenwachstum von PC12-Zellen wird in Gegenwart des ROK $\alpha$ -Inhibitors (100  $\mu$ M) um ein 3,9-faches stimuliert. Die durchschnittliche Neuritenlänge der mit löslichen NCAM und ROK $\alpha$ -Inhibitor behandelten PC12-Zellen war um 23% höher als die Summe der durch die beiden einzelnen Stimuli induzierten durchschnittlichen Neuritenlängen. Da aber die Standardabweichungen der einzelnen Stichproben recht hoch waren, läßt sich nicht eindeutig beweisen, ob sich die beiden neuritenbildung-fördernde Stimuli (extrazelluläres lösliches NCAM + ROK $\alpha$ -Inhibition) signifikant synergistisch auf die Neuritenverlängerung auswirken. Um einen möglichen signifikanten synergistischen Effekt nachzuweisen, sollten die einzelnen Stimuli einen ähnlich starken neuritenverlängernden Effekt zeigen (z.B. 100% Neuritenverlängerung). In zukünftigen Experimenten sollte daher die ROK $\alpha$ -Inhibitor-Konzentration so gewählt werden (<100  $\mu$ M), daß der neuritenverlängernde Effekt dem vom löslichen NCAM (70-100% bei 2,5  $\mu$ g/mL NCAM) ähnelt.

Für die mit TMcytNCAM 140- und TMcytNCAM 180-transfizierten NCAM-stimulierten PC12-Zellen konnte kein Unterschied in der durch Y27632-stimulierten Neuritenverlängerung im Vergleich zu vektortransfizierten Zellen gezeigt werden.

Möglicherweise sind viele der in der Ligandenaffinitätschromatographie identifizierten Proteine Bestandteile eines großen Komplexes, wobei vielleicht nur wenige der Proteine direkt an die cytoplasmatische Domäne von NCAM 180 oder NCAM 140 binden. Andererseits lassen der hohe Anteil von Prolinresten als auch die vielen hydrophilen und geladenen Aminosäuren in der cytoplasmatischen Domäne von NCAM vermuten, daß die Polypeptidkette im Cytosol nicht stark geknäult vorliegt, sondern eher langgestreckt, so daß sterisch viele Interaktionsmöglichkeiten bestehen. Die in der Ligandenaffinitätschroma-



tographie verwendeten cytoplasmatischen NCAM-Domänen wurden als Fusionsproteine in Prokaryonten überexprimiert. Daher ist nicht gewährleistet, daß die Fusionsproteine in ihrer nativen Faltung vorliegen, z.B. können Fusionsproteine, die in *E. coli* exprimiert wurden, intrazelluläre Disulfidbrücken enthalten, die unter nativen Bedingungen in der eukaryontischen Zelle nicht vorkommen würden [Buchner & Rudolph, 1991]. In der Sequenz des cytNCAM 140- und des cytNCAM 180-Fusionsproteins befinden sich 4 Cysteinreste, die intrazelluläre Disulfidbrücken ausbilden könnten. Die Änderung der drei-dimensionalen Proteinstruktur könnte sich auf das Bindungsverhalten der Liganden auswirken, so daß vielleicht Proteine binden, die unter in vivo-Bedingungen nicht binden würden, oder umgekehrt. Daher werden die Interaktionen durch Coimmunpräzipitationen bestätigt. Spectrin, PLC $\gamma$  und ROK $\alpha$  konnten zusammen mit NCAM aus Maushirn coimmunpräzipitiert werden, während dies für alle anderen in der Ligandenaffinitätschromatographie identifizierten potentiellen Bindungspartner bisher noch nicht gelang. Daher muß weiter versucht werden, diese Interaktionen durch Coimmunpräzipitationen zu bestätigen. Bindungsstudien zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten mittels Oberflächen-Plasmonresonanz und Yeast-Two-Hybrid-System-Studien könnten Aufschluß geben, ob die Bindungspartner direkt mit NCAM interagieren.