

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180

Zur Untersuchung der Funktion der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 sollten die cytoplasmatischen Domänen (inclusive Transmembrandomäne) beider Isoformen in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert werden. Desweiteren sollten beide cytoplasmatischen Domänen in einem prokaryontischen Expressionssystem ohne Transmembrandomäne überexprimiert werden. Dazu wurde die cytosolische NCAM-cDNA mit und ohne Transmembrandomäne aus PC12-Zellen und Rattenhirn in der PCR amplifiziert, in den Klonierungsvektor pCR.2.1 ligiert und anschließend in die entsprechenden Expressionsvektoren umkloniert.

3.1.1. DNA-Amplifizierung der cytosolischen Domänen von NCAM aus PC12-Zellen und Rattenhirn

RNA wurde aus PC12-Zellen und Rattenhirn isoliert und mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die in den PCR-Reaktionen als Template eingesetzt wurde. Als Vorlage für die Primerkonstruktion diente die NCAM 140-cDNA der Ratte. Zur Amplifizierung der cytosolischen NCAM-cDNA mit oder ohne Transmembrandomäne wurde die Pfu-Polymerase und die Primer P1 und P3 bzw. das Primerpaar P2 und P3 verwendet (siehe Abb. 7A). Die Upstream-Primer P1 und P2 verfügen im 5'-Bereich über Erkennungssequenzen für das Restriktionsenzym Bam HI und der Downstream-Primer P3 verfügt über zwei Bgl II- Erkennungssequenzen. Mit den Primern P1 und P3 bzw. P2 und P3 konnten in der PCR cDNA-Fragmente der NCAM 140-Isoform amplifiziert werden (cytNCAM 140 mit 405 bp; TMcytNCAM 140 mit 465 bp, inclusive Primersequenzen) (siehe Abb. 7B). CytNCAM 180 dagegen konnte mit diesen Primern sowohl unter Verwendung von PC12-cDNA als auch Hirn-cDNA als Template nicht amplifiziert werden, obwohl die Primer theoretisch auch an die NCAM 180-cDNA binden müßten, da sie an Sequenzen außerhalb des NCAM 180-spezifischen Bereichs binden. Um auch für NCAM 180 PCR-Produkte zu erhalten, wurden zusätzliche Primer konstruiert, die in dem NCAM 180-spezifischen Insert, das 801 bp umfaßt, binden. Da für die Spezies Ratte bisher nur die cDNA-Sequenz der NCAM 140-Isoform veröffentlicht ist, diente für die Auswahl dieser Primer die NCAM 180-cDNA der Maus als Vorlage, deren Sequenz unter den bisher veröffentlichten der Ratte am ähnlichsten ist. Im NCAM 180-spezifischen Insert wurde nach einer spezifischen Schnittstellensequenz gesucht, die nicht in der restlichen cytNCAM-Sequenz und auch nicht im Klonierungsvektor pCR.2.1 vorkommt. Die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Kpn 2I erfüllte diese Bedingungen. Es wurden nun zwei Primer konstruiert, die beide diese Kpn 2I- Schnittstellensequenz enthielten (siehe Abb. 7A). Der eine konnte als Upstream-Primer (P4) mit P3 in der PCR kombiniert werden, um das 449 bp große 3'-Fragment von cytNCAM 180 zu amplifizieren, und der andere als Downstream-Primer (P5) mit P2 oder P1,

um das 849 bp bzw. 789 bp große 5'-Fragment von cytNCAM 180 zu amplifizieren (in Abb. 7C nur das 789 bp-PCR-Produkt gezeigt, da mit diesem weiter gearbeitet wurde). Da NCAM 180 fast ausschließlich im Hirn vorkommt, wurde cDNA des Rattenhirns in der PCR für die Generierung der cytNCAM 180-cDNA-Fragmente verwendet. Die cytNCAM 140-PCR-Produkte haben dagegen ihren Ursprung aus PC12-Zellen.

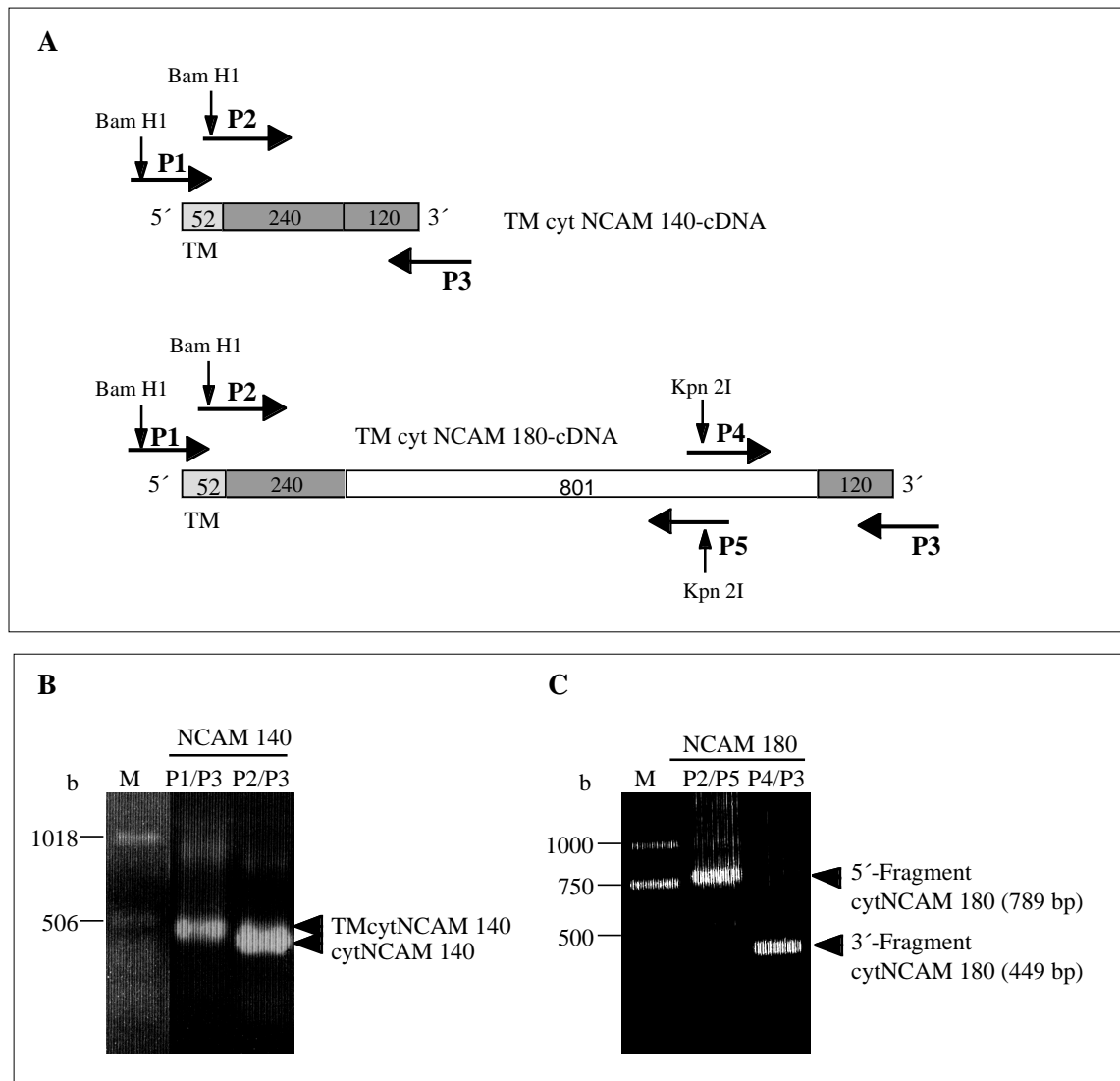


Abb. 7: Amplifizierung der cytNCAM 140-cDNA, TMcytNCAM 140-cDNA und des 5'- und 3'-Fragments von cytNCAM 180 in der PCR.

A) Darstellung der Hybridisierungsorte der Primer P1 bis P5 in der NCAM-cDNA.

B) PCR-Produkte von cytNCAM 140 und TMcytNCAM 140. Mit den Primern P2/P3 konnte ein 405 bp-großes, mit den Primern P1/P3 ein 465 bp-großes PCR-Fragment amplifiziert werden, welche die Sequenzen von cytNCAM 140 (360 bp) bzw. TMcytNCAM 140 (414 bp) enthalten.

C) PCR-Produkte des 5'- und des 3'-Fragments von cytNCAM 180. Mit den Primern P2/P5 konnte ein 789 bp-großes Fragment, das die Sequenz des 5'-Fragments von cytNCAM 180 (767 bp) enthält, und mit den Primern P4 und P3 ein 449 bp-großes Fragment, welches das 3'-Fragment von cytNCAM 180 (412 bp) enthält, amplifiziert werden.

Das cytNCAM 140-cDNA-PCR-Produkt ohne Transmembrandomäne war nur für die Expression im prokaryontischen Vektor vorgesehen und wurde daher nach Schneiden mit Bam H1 und Bgl II direkt in den ebenso geschnittenen prokaryontischen Expressionsvektor pRSET C kloniert und anschließend sequenziert. Dabei mußte auf die korrekte Orientierung des inserierten PCR-Produkts geachtet werden, da zwei Bgl II-Schnittstellen mittig eine Bam H1-Schnittstelle ergeben.

Die cytNCAM 180-cDNA-Fragmente und die TMcytNCAM140-PCR-Produkte dagegen wurden zunächst in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert. Dazu wurde den PCR-Produkten mit Hilfe der Taq-Polymerase und A-Nucleotiden ein A-Überhang angefügt, um die Ligation in pCR2.1 zu ermöglichen. Die erfolgreiche Ligation konnte durch Herausschneiden der PCR-Fragmente mit Bam H1 und Eco R1 bestätigt werden. Die positiven Klone wurden sequenziert und die Orientierung des Einbaus überprüft.

Zur vollständigen, lückenlosen Vereinigung der cytNCAM 180-cDNA in einem pCR-Vektor, wurde das 5'-cytNCAM 180-Fragment mit Bam H1 und Kpn 2I herausgeschnitten und in den das 3'-Fragment enthaltenen, Bam H1-/Kpn 2I-geschnittenen pCR-Vektor ligiert. Da zwei hintereinander gereichte Bam H1-Schnittstellensequenzen mittig eine Kpn 2I-Schnittstelle ergeben, wurde zuerst mit Bam H1 geschnitten.

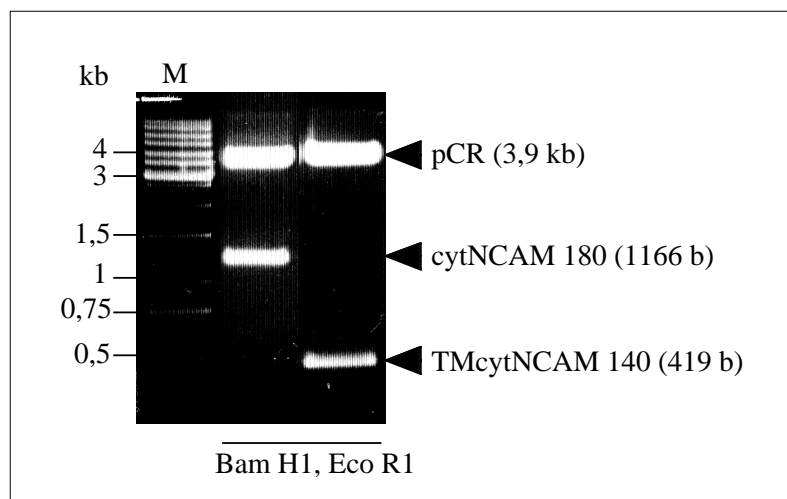


Abb. 8: Klonierung der TMcytNCAM 140-cDNA und der vollständigen cytNCAM 180-cDNA in den Klonierungsvektor pCR.

Zur Bestätigung der erfolgreichen Ligation wurde die TMcytNCAM 140-cDNA (419 bp) und die vollständige cytNCAM180-cDNA (1166 bp) mit Bam H1 und Eco R1 aus dem pCR-Vektor (3.9 kb) herausgeschnitten. M: Marker.

3.1.2. Klonierung der cytNCAM-cDNAs in den prokaryontischen Expressionsvektor pRSET C

Die cytosolischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 sollten in einen prokaryontischen Expressionsvektor kloniert werden, um sie in *E. coli* überexprimieren zu können. Dafür wurde der pRSET C-Vektor gewählt, der stromaufwärts der Multiplen Cloning-Site eine Ribosomen-Bindungssequenz, ein Startcodon und sechs aufeinanderfolgende Histidin-Codons, die für die Reinigung des Fusionsproteins nützlich sein können, enthält. Die cytNCAM 140-cDNA wurde wie oben bereits beschrieben direkt als geschnittenes PCR-Produkt in pRSET C kloniert. Die vollständige cytNCAM 180-cDNA wurde mit Bam H1 und Eco R1 aus dem pCR-Vektor herausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen pRSET C-Vektor ligiert. Nach nochmaliger Sequenzierung wurden die positiven Expressionsvektoren in Zellen des *E. coli*-Stammes BL21 transformiert.

3.1.3. Klonierung der TMcytNCAM-cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1

Für eine gezielte membranassoziierte Expression der cytoplasmatischen Domänen von NCAM in einer eukaryontischen Zelllinie muß die proteinkodierende Sequenz sowohl die Transmembrandomäne von NCAM, als auch die Information eines entsprechenden Signaleptids enthalten, um die Translokation des synthetisierten Proteins zur Membran zu ermöglichen.

Da die mit der cytNCAM-cDNA-inserierten pCR-Vektoren nicht geeignete Restriktionsstellen aufwiesen, die für eine Umklonierung der DNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 nötig gewesen wären, mußte nochmals die TMcytNCAM-cDNA in der PCR amplifiziert werden, wobei Primer benutzt wurden, die passende Schnittstellensequenzen enthielten. Da außerdem für NCAM 180 nur eine fehlerfreie cytNCAM-cDNA ohne Transmembrandomäne vorhanden war, mußte zunächst die TMcytNCAM 180-cDNA mittels Restriktionsverdau durch Verwendung der Vektoren pCR/TMcytNCAM 140 und pRSET C/cytNCAM 180 zusammengesetzt werden (siehe Klonierungsschema Abb. 9A).

Dazu wurde mit dem Restriktionsenzymen Apa I, das im cytNCAM 140-spezifischen Bereich stromaufwärts des cytNCAM 180-spezifischen Inserts schneidet, und Bam H1 ein 5'-Fragment aus dem pCR/TMcyt 140 Vektor herausgeschnitten (enthält die Information für die TM-Domäne) und in den Bam H1- und Apa I-verdauten pRSET C/cytNCAM 180-Vektor ligiert (Abb. 9A, B).

So konnte die vollständige TMcytNCAM 180-cDNA im pRSET C-Vektor als Template für weitere PCR-Reaktionen genutzt werden.

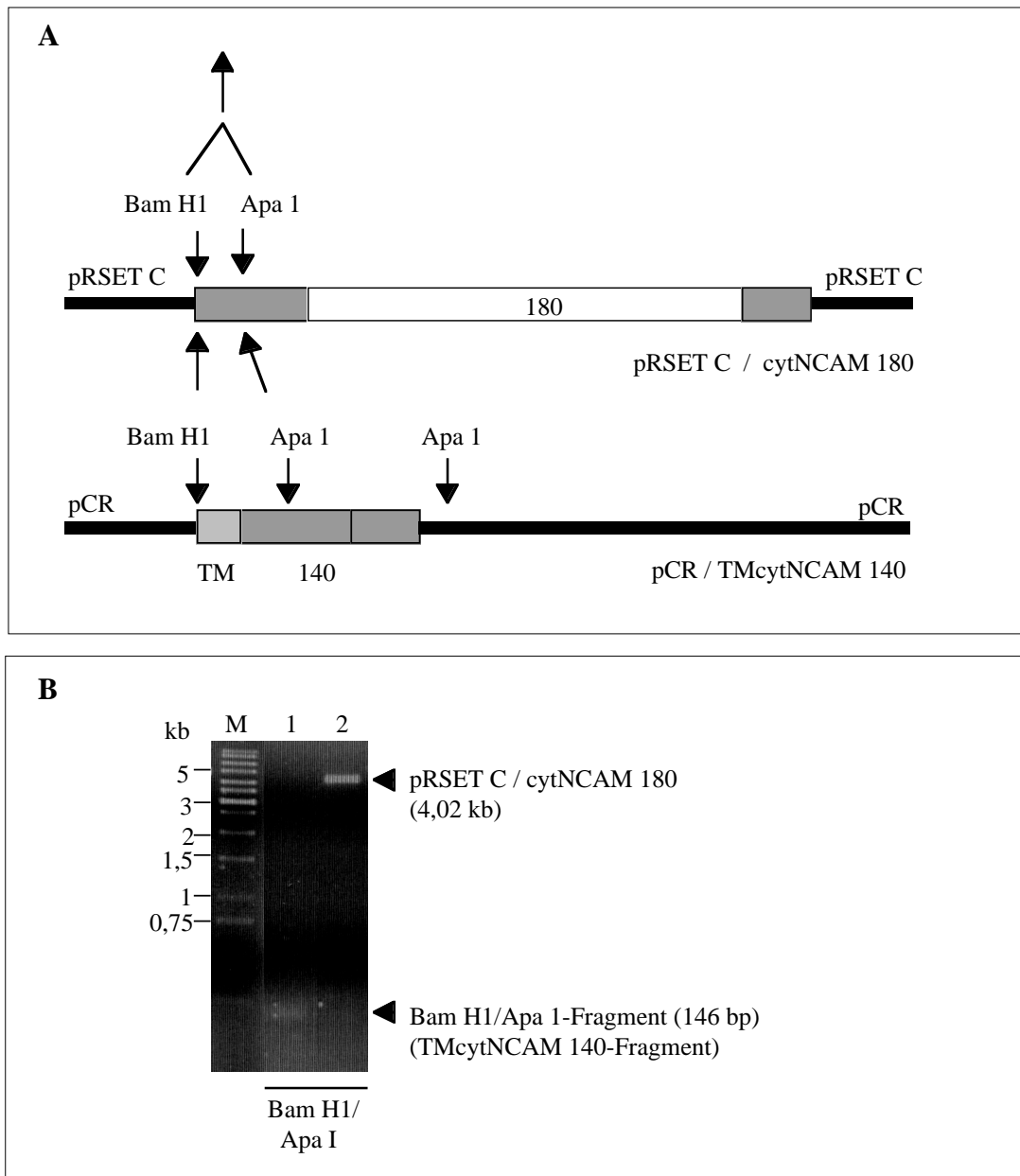


Abb. 9: Klonierung zur Vervollständigung der TMcytNCAM 180-cDNA-Sequenz.

A: Klonierungsschema. Mit Apa I und Bam HI wird ein kleines Stück der cytNCAM 180-cDNA herausgeschnitten und verworfen. Das mit Bam HI und Apa I aus dem TMcytNCAM 140/pCR-Vektor herausgeschnittene Fragment enthält die Transmembran-cDNA-Sequenz und wird in den Apa I/Bam HI-verdauten cytNCAM 180/pRSET C-Vektor ligiert.

B: Restriktionsverdau. Mit Bam HI und Apa I wird ein die TM-Domäne enthaltendes 5'-Fragment von TMcytNCAM 140 aus dem pCR/TMcytNCAM 140-Vektor herausgeschnitten (Spur 1). CytNCAM 180/pRSET C wurde mit Apa I und Bam HI geschnitten (Spur 2). M: Marker.

Die Signalpeptid-cDNA der langen Isoform von CEACAM1 (Carcinoembryonic-Antigen-Related-Cell-Adhesion-Molecule), die in dem Vektor pRC/CMV vorlag wurde in der PCR mit Hilfe des Upstream-Primers Psig1, der über zwei Hind III-Schnittstellensequenzen, und dem Downstream-Primer Psig2, der über zwei Eco RV-Schnittstellensequenzen verfügt, amplifiziert. Das Signalpeptid-PCR-Fragment wurde mit Hind III und Eco RV geschnitten und in den ebenso geschnittenen Expressionsvektor pcDNA3.1-Vektor ligiert.

Die TMcytNCAM-cDNA von NCAM 140 und NCAM 180 wurde mit dem 5'-Primer P6, der über zwei Eco RV-Schnittstellen verfügt, und dem 3'-Primer P7, der über zwei Xho I Schnittstellen verfügt, amplifiziert, wobei pCR/TMcytNCAM 140 und pRSET C/TMcytNCAM 180 als Template diente. Nach Verdau der PCR-Produkte mit Eco RV und Xho I wurden sie in den Signalpeptid-enthaltenen pcDNA3.1-Vektor kloniert. Um ausreichende Mengen Plasmid für Transfektion und Sequenzierung zu erhalten, wurden die Plasmide in INV α F' transformiert und mittels der Midi-Prep-Methode isoliert.

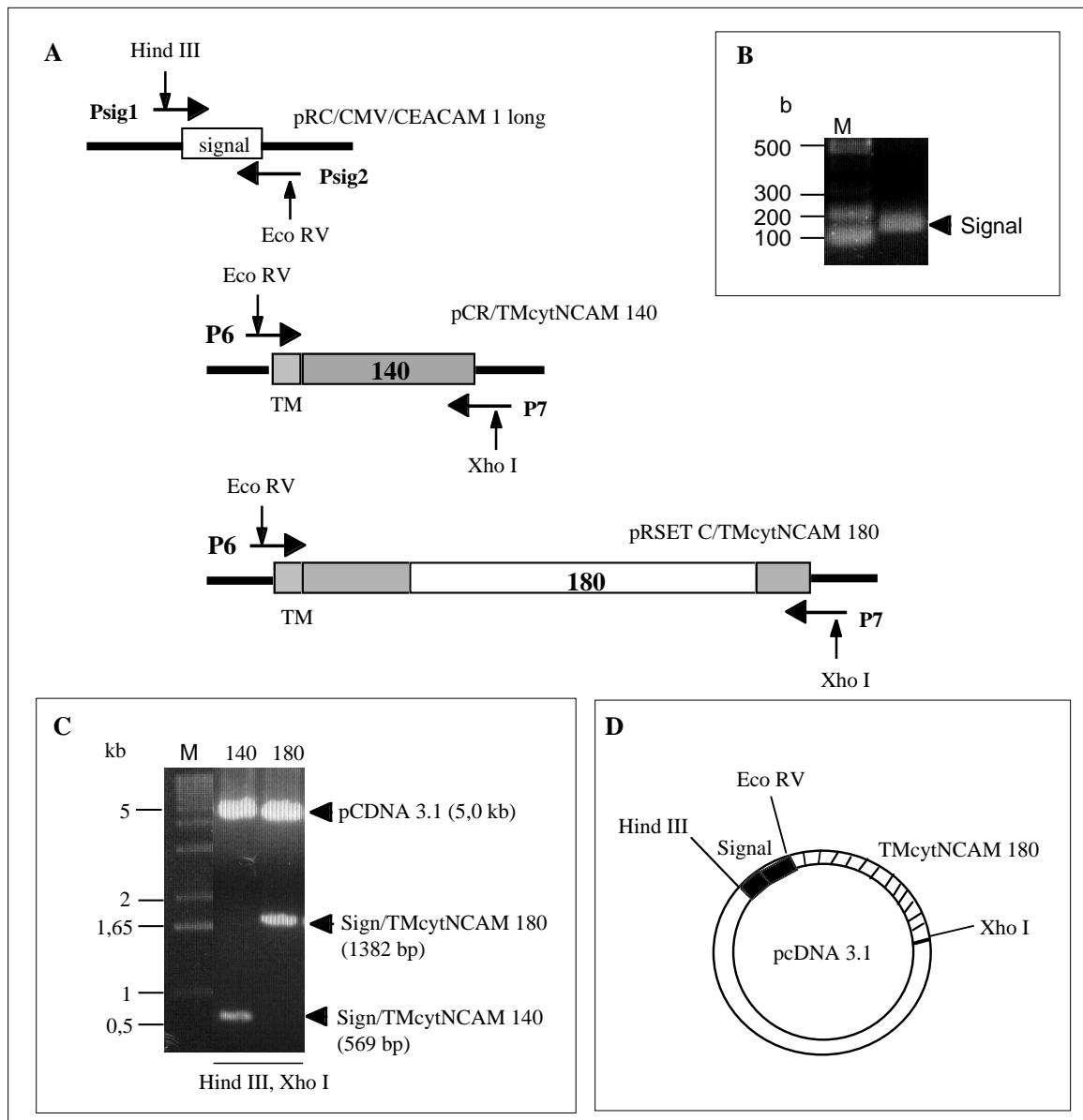


Abb. 10: Amplifizierung und Klonierung der Signalpeptid-cDNA und der TMcytNCAM 140 und TMcytNCAM 180-cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1.

A: Darstellung der Hybridisierungsorte der Primer Psig1, Psig2, P6 und P7.

B: PCR-Produkt der Signalpeptid-cDNA. Mit den Primern Psig1 und Psig2 konnte ein 130-bp großes Fragment amplifiziert werden, welches die Signalpeptid-cDNA (102 bp) enthält.

C: Mit Hind III und Xho I lässt sich Sig/TM/cytNCAM 140 (569 bp) und Sig/TMcytNCAM 180 (1382 bp) aus dem Expressionsvektor pcDNA3.1 heraus schneiden.

D: Darstellung des pcDNA3.1-Vektors mit inserierter Signalpeptid-cDNA und TMcytNCAM-cDNA.

3.1.4. NCAM-Sequenzvergleiche von Ratte und Maus auf cDNA- und Proteinebene

Sequenzvergleiche der cytoplasmatischen NCAM 180-cDNA-Sequenzen zwischen Ratte und Maus zeigen, daß Ratten-NCAM 180 über 44 andere Basenpaare (verteilt über die gesamte cDNA) verfügt als die Maus-cDNA. Diese führen auf Proteinebene zum Austausch von 15 Aminosäuren. Von den 44 Ratten-spezifischen Basen befinden sich zwei im Transmembranbereich, 17 in dem für NCAM 140- und NCAM 180-homologen Bereich und 25 in dem NCAM 180-spezifischen Insert (siehe Abb. 11). Die Sequenzhomologie der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 180 (mit TM) zwischen Maus und Ratte liegt auf cDNA-Ebene bei 95,4%. Die Basenunterschiede von Ratte und Maus in dem für NCAM 140 und NCAM 180 identischen Bereichen sind bereits bekannt, die Sequenzen liegen in der Datenbank vor. Die NCAM 180-cDNA der Ratte dagegen ist noch nicht veröffentlicht. Von den 25 Basenunterschiede, die sich im NCAM 180-spezifischen Insert der Ratte vorfanden, führen 13 zu anderen Aminosäuren im Vergleich zur Maus. Dies ließ sich in drei unterschiedlichen Klonen nachweisen. Dagegen führen nur zwei der 17 Basenunterschiede der NCAM 140-cDNA-Sequenzen zu anderen Aminosäuren. Weiterhin befinden sich im NCAM 180-spezifischen Insert der Ratte insgesamt 12 zusätzliche Basen. Diese liegen einmal als Dreierkombination, einmal als Sechserkombination, einmal als einzelne Base und einmal als Zweierkombination vor (Abb. 11), so daß die Rattensequenz über vier zusätzliche Aminosäuren verfügt.

In Tab. 2 sind die Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene von Gesamt-NCAM oder TMcytNCAM für Ratte, Maus und Mensch gezeigt.

Gesamt NCAM-Sequenz	% Sequenzhomologie	TmcytNCAM-Sequenz	% Sequenzhomologie	AS-Unterschiede im cyt Bereich
Ratte 140-Maus 140	96,5	Ratte 140- Maus 140	98,5	2
Ratte140-human 140	91,4	Ratte 140- human 140	93,4	9
Maus 140-human 140	92,7	Maus 140-human 140	93,4	9
		Ratte 180-Maus 180	95,4	19

Tab. 2: Sequenzhomologien auf Proteinebene von Gesamt-NCAM und dem intrazellulären Bereich für Ratte, Maus und Mensch.

Vergleicht man die NCAM 140-Sequenzen der verschiedenen Spezies miteinander, so fällt auf, daß für NCAM 140 ausgeprägtere Aminosäurenabweichungen im extrazellulären Bereich von NCAM vorkommen als im cytoplasmatischen. Für die cytoplasmatische Domäne von NCAM 180 dagegen ist die Aminosäurenabweichung innerhalb des 180-spezifischen Inserts größer als im Gesamtmolekül (Vergleich Ratte-Maus). Zwischen Maus und Mensch besteht im Gesamtmolekül eine stärkere Sequenzhomologie als zwischen Ratte und Mensch, innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140 dagegen unterscheiden sich die Sequenzhomologien nicht (Vergleich Maus-Mensch und Ratte-Mensch).

1	GGCGCCATTG	TGGGCATCCT	CATTGTCATC	TTCGTCCTGC	TCCTGGTGGT	CATGGACATC	60	M
			?	?				
1	GGCGCCATTG	TGGGCATCCT	CATTGTCATT	TTCGTCCTAC	TCCTGGTGGT	CATGGACATC	60	R
61	ACCTGCTACT	TCCTGAACAA	GTGTGGCCTG	CTCATGTGCA	TCGCTGTTAA	CCTGTGTGGC	120	M
						?		
61	ACCTGCTACT	TCCTGAACAA	GTGTGGCCTG	CTCATGTGCA	TCGCTGTTAA	CCTGTGCGGC	120	R
121	AAAGCTGGGC	CCGGAGCCAA	GGGCAAAGAC	ATGGAGGAGG	GCAAGGCTGC	TTTCTCGAAA	180	M
	?							
121	AAAGCGGGGC	CCGGAGCCAA	GGGCAAAGAC	ATGGAGGAGG	GCAAGGCTGC	TTTCTCGAAA	180	R
181	GATGAGTCAA	AAGAACCCAT	TGTGGAGGTC	CGAACGGAGG	AAGAACGGAC	TCCAAACCAT	240	M
	?		?		?			
181	GATGAGTCTA	AAGAACCCAT	TGTAGAGGTC	CGAACGGAGG	AGGAACGGAC	TCCAAACCAT	240	R
241	GATGGGGGGA	AGCACACAGA	GCCCAACGAG	ACCACGCCGC	TGACAGAACC	CGAGCTGCCT	300	M
	? ?			?	?			
241	GACGGAGGGA	AGCACACAGA	GCCCAACGAG	ACCACACCAC	TGACAGAGCC	CGAGCTGCCT	300	R
301	GCCGACACCA	CAGCCACTGT	CGAGGACATG	CTGCCTTCTG	TCACCACCGT	CACCACTAAC	360	M
301	GCCGACACCA	CAGCCACTGT	CGAGGACATG	CTGCCTTCTG	TCACCACCGT	CACCACTAAC	360	R
361	TCTGACACTA	TCACCGAAAC	CTTTGCCACT	GCTCAGAACA	GCCCTACCAG	TGAGACCACC	420	M
						?		
361	TCTGACACTA	TCACCGAAAC	CTTTGCCACT	GCTCAGAACA	GCCCTACCAG	TGAGACCACC	420	R
421	AACTGACCT	CCAGTATTGC	CCCACCGGCC	ACAACTGTGC	CAGACTCAA	TTCTGTGCC	480	M
					?			
421	AACTGACCT	CCAGTATTGC	CCCACCGGCC	ACAACTGTGC	CAGAGTCAA	TTCTGTGCC	480	R
481	GCTGGTCAGG	CCACCCCTTC	CAAGGGTGTC	ACTGCTTCAT	CCTCGT__C	CCCAGCCTCA	537	M
					? ::			
481	GCTGGTCAGG	CCACCCCTTC	CAAGGGTGTC	ACTGCTTCAT	CCTCCTCGCC	CCCAGCCTCA	540	R
538	GCCCCAAAG	TTGCTCCTCT	GGTTGACCTG	AGTGATACTC	CAACTTCAGC	TCCCTCTGCT	597	M
	? ?	?	?	?	?			
541	GTCCAAAAG	TTGCCCTCT	TGTTGACCTG	AGTGATAACC	CAACTTCAGC	TCCCTCTGCT	600	R
598	AGCAATCTGT	CCTCCACTGT	CTTGGCTAAC	CAAGGAGCTG	TACTCAGTCC	TAGCACCCCT	657	M
	?		?			?		
601	AACAATCTGT	CCTCCACTGT	CCTGGCTAAC	CAAGGAGCTG	TACTCAGTCC	TAGCACACCT	660	R
658	GCCAGTGCGG	GAGAGACCTC	CAAGGCCCTT	CCAGCCAGTA	AGGCCTCCCC	TGCTCCCACC	717	M
			?	? ?	?	?		
661	GCCAGTGCGG	GAGAGACCTC	CAAGGTCCCT	GCAACCAGTA	AGCCCTCCCC	TACTCCCACC	720	R
718	CCCACTCCAG	CTGGGGCAGC	CAGCCCCTTA	GCAGCAGTAG	CCGCCCTGTC	CACAGATGCC	777	M
		?				?		
721	CCCACTCCAG	CCGGGGCAGC	CAGCCCCTTA	GCAGCAGTAG	CCGCCCTGTC	CACAGAAGCC	780	R
778	CCCCAGGCCA	AGCAGGAAGC	CCCCAGCACC	AAAGTCCGG	ACCCAGAGCC	CACCCAGCCT	837	M
781	CCCCAGGCCA	AGCAGGAAGC	CCCCAGCACC	AAAGTCCGG	ACCCAGAGCC	CACCCAGCCT	840	R
838	GGCACCGTGA	AGAACCACC	TGAGGCAGCC	ACAGCCCTG	CTAGCCCGAA	GAGCAAGGCT	897	M
		?						
841	GGCACCGTGA	AGAACCACC	TGAGGCAGCC	ACAGCCCTG	CTAGCCCGAA	GAGCAAGGCT	900	R
898	_____G_CA	__ACCACAAA	CCCTTCCCAG	GGCGAGGACT	TAAAAATGGA	CGAAGGGAAC	948	M

3.2. Die Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 bei der neuronalen Differenzierung

Die Funktion der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 sollte zunächst in einem eukaryontischen Zellsystem untersucht werden. Die PC12-Zelllinie (Pheochromocytomzellen) stellt dafür ein geeignetes Untersuchungssystem dar. Bei diesen Zellen handelt es sich um Nebennierenmarkszellen der Ratte, die durch Induktion mit NGF zu einem neuronalen Phänotyp differenzieren und Neuriten ausbilden. Die NGF-induzierte Neuritenbildung wird sowohl über Aktivierung des Ras-MAPK-Signaltransduktionsweges vermittelt [Hagag et al., 1986] wie auch über die Aktivierung des kleinen G-Proteins Rac 1 via der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) [Nusser et al., 2002]. Zu den wichtigsten Funktionen von NCAM gehört dessen Beteiligung an der Induktion und Elongation von Neuriten, an der Wanderung von Neuronen und an der Bündelung von Axonen. In den funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstums gelegt.

Dazu wurde die im pcDNA3.1-Vektor vorliegende TMcytNCAM 140- und TMcytNCAM 180-cDNA mittels Lipofektion in PC12-Zellen transfiziert. Anschließend wurde der Einfluß der überexprimierten NCAM-Domäne auf das Neuritenwachstum untersucht.

PC12-Wildtyp-Zellen exprimieren endogen NCAM ohne Polysialinsäure [Horstkorte et al., 1999].

Den geplanten Experimenten liegt folgende Idee zugrunde: Die überexprimierten cytoplasmatischen Domänen von NCAM konkurrieren mit den endogen exprimierten vollständigen NCAM-Molekülen um intrazelluläre Bindungspartner, wodurch es zu einer Störung des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums kommt.

3.2.1. Expression der cytoplasmatischen Domänen von NCAM in PC12-Zellen

3.2.1.1. Nachweis der transienten Expression von TMcytNCAM 140 und TMcytNCAM 180 in PC12-Zellen mittels Westernblot-Analyse

Die erfolgreiche Transfektion der TMcytNCAM-Domänen in PC12-Zellen wurde auf Proteinexpressionsebene im Westernblot überprüft. Hierfür wurde der monoklonale NCAM-Antikörper 5B8 verwendet, der an eine Peptidsequenz innerhalb des für NCAM 140 und NCAM 180 identischen cytoplasmatischen Bereiches bindet. Da sich die überexprimierten TMcytNCAM-Domänen in ihrer Größe von den endogenen, vollständigen NCAM-Molekülen unterscheiden, ist die Westernblot-Analyse nicht nur für den Nachweis der Expression geeignet, sie liefert außerdem eine Vorstellung der Mengenrelation zwischen endogen exprimierten- und transfizierten NCAM.

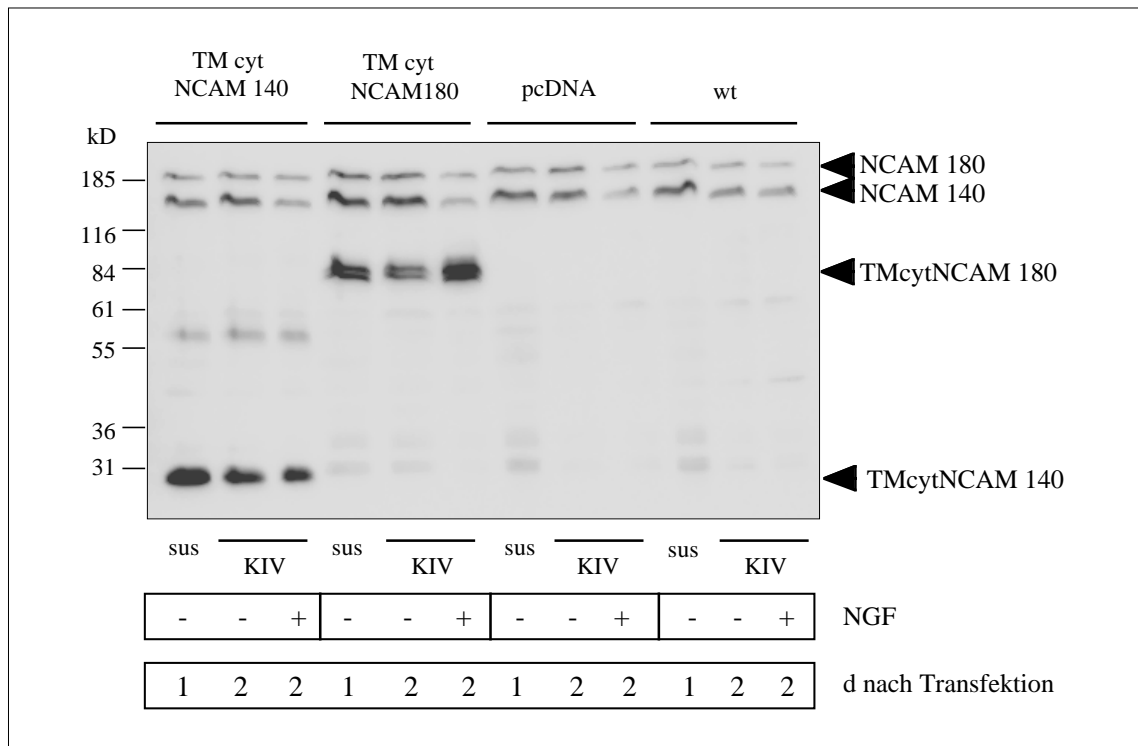


Abb. 13: Nachweis der Expression der transfizierten cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 in PC12-Zellen durch Westernblot-Analyse.

Lysate der in Suspension (sus) oder auf KIV kultivierten (+/- 100 ng/mL NGF), mit TMcytNCAM 140-, TMcytNCAM 180-, Vektor-transfizierten-Zellen und PC12-Wildtyp-Zellen wurden in einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Hilfe des monoklonalen NCAM-Antikörpers 5B8 analysiert.

In Abb. 13 ist zu erkennen, daß TMcytNCAM 140 als 29 kD-Bande und TMcytNCAM 180 als 84 kD-Bande erscheint. Die sichtbaren Massen liegen damit um etwa 100% höher als die theoretischen molekularen Massen von 14,8 und 41 kD.

Bereits 24 h nach Transfektion werden die cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und 180 stark exprimiert. Die Expression ist nach 48 h-Kultivierung auf Kollagen IV unverändert. Die Anwesenheit von NGF beeinflusst die Expression der transfizierten TMcytNCAM 140-Domäne nicht, während die Expression von TMcytNCAM 180 unter NGF-Behandlung leicht zunimmt. Die Expression des endogen exprimierten NCAM 140 und NCAM 180 wird durch die Überexpression der cytoplasmatischen Domänen nicht beeinflusst.

Durch Behandlung mit NGF nimmt die Expression des endogenen NCAMs etwas ab. Weiterhin ist zu erkennen, daß die Menge von transfizierten TMcytNCAM die Menge von endogenen NCAM übertrifft, was besonders stark bei den NGF-behandelten PC12-Zellen zutrifft. Man kann demnach von einer Überexpression sprechen, was für die folgenden funktionellen Untersuchungen von Vorteil ist.

3.2.1.2. Nachweis der TMcytNCAM 140- und TMcytNCAM 180-Proteinexpression durch Immunfluoreszenz

Auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz ließ sich überexprimiertes TMcytNCAM in den transfizierten PC12-Zellen mit Hilfe des 5B8-Antikörpers nachweisen. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 2 Tage auf Kollagen IV unter Zugabe von 10 ng/mL NGF kultiviert. Obwohl der Antikörper sowohl endogenes als auch transfiziertes NCAM erkennt, ist in Abb. 14 deutlich zu erkennen, daß die TMcytNCAM-transfizierten Zellen eine viel intensivere Oberflächenfärbung zeigen als PC12-Wildtyp- und die vektortransfizierten Zellen. Die Färbung des endogenen NCAMs ist nur sehr schwach.

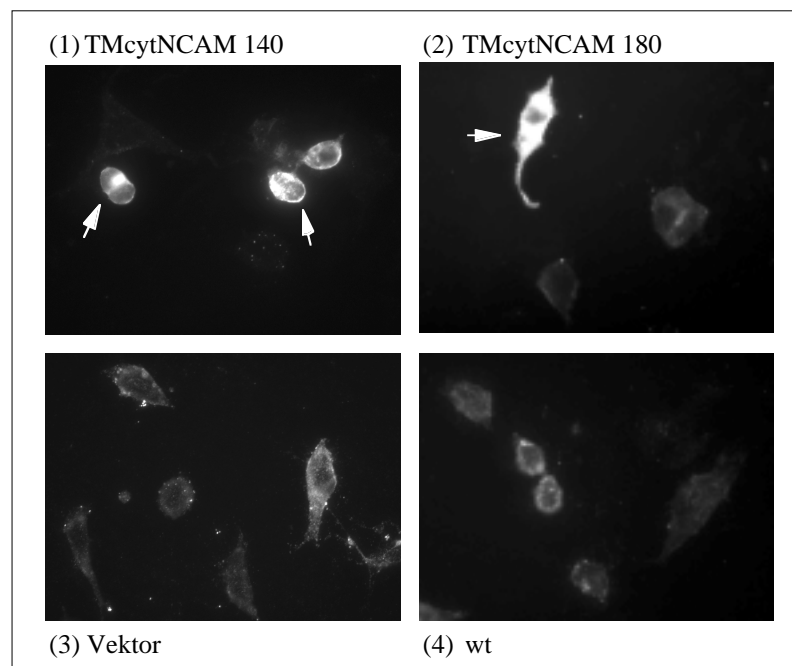


Abb. 14: Nachweis der Expression von transfiziertem TMcytNCAM in PC12-Zellen durch Immunfluoreszenz.

TMcytNCAM-transfizierte Zellen, Vektor-transfizierte- und PC12-Wildtyp-Zellen wurden nach zweitägiger Kultivierung auf KIV fixiert und im permeabilisierten Zustand mit 5B8-Antikörpern inkubiert. Die Färbung erfolgte mit FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörpern. PC12-Wildtyp-Zellen und Vektor-transfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Weiße Pfeile zeigen auf transfizierte Zellen.

Anhand der Verhältnisse von stark fluoreszierenden und schwach fluoreszierenden PC12-Zellen in 160-fach vergrößerten Immunfluoreszenzbildern konnte die Transfektionsrate für cytNCAM 140- und cytNCAM 180-transfizierten PC12-Zellen geschätzt werden (Bilder nicht gezeigt). Bei den mit TMcytNCAM 140-cDNA /Lipofectamin-behandelten Zellen waren von 338 Zellen 82 Zellen stark gefärbt, was einer Transfektionseffizienz von 24,3% entspricht. Bei den mit cytNCAM 180-cDNA/Lipofectamin-behandelten Zellen waren von 228 Zellen 52 stark gefärbt, was einer Transfektionseffizienz von 22,8% entspricht.

3.2.2. Stimulation des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums in PC12-Zellen mit löslichem NCAM

Es gibt mehrere Möglichkeiten, NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum bzw. NCAM-Interaktionen *in vitro* bei primären Neuronen oder PC12-Zellen zu induzieren. Zum einen können Zellen mit NCAM-Antikörpern, die NCAM im extrazellulären Bereich erkennen, inkubiert werden, was ein Clustering der NCAM-Moleküle auf der Zelloberfläche bewirkt. Eine andere Möglichkeit ist die Kultivierung von PC12-Zellen oder Neuronen auf einer Monolayer von NCAM-transfizierten Fibroblasten [Kolkova et al., 2000b]. NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum kann aber auch durch Zugabe von löslichen NCAM oder NCAM-Fc-Chimeren ins Medium induziert werden, wie für primäre Kleinhirnneurone gezeigt werden konnte [Walsh et al., 1997]. Ronn et al. (1999, 2000) verwenden seit einiger Zeit einen synthetischen Peptidliganden, das C3-Peptid, welches an die N-terminale Ig-Domäne von NCAM bindet und Neuritenwachstum in PC12-Zellen und Neuronen des Hippocampus durch Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege stimuliert [Ronn et al., 1999] [Ronn et al., 2000].

In dieser Arbeit wurde im Handel erhältliches, lösliches NCAM für die Differenzierungsassays verwendet. Zunächst wurden die optimalen Bedingungen für ein Differenzierungsassay mit PC12-Wildtypzellen ermittelt.

PC12-Zellen wurden ohne und unter Zugabe von suboptimalen NGF-Konzentrationen (3 und 10 ng/mL) auf Kollagen IV kultiviert und mit 2,5 µg/mL NCAM für zwei Tage inkubiert. Als Kontrolle dienten NCAM-unbehandelte Zellen. Nach Färben mit Kristallviolett wurden Ausschnitte bei einer 160-fachen Vergrößerung photographiert. In Abb. 15 sind Bilder von PC12-Zellen, die mit und ohne NCAM behandelt wurden, gezeigt.

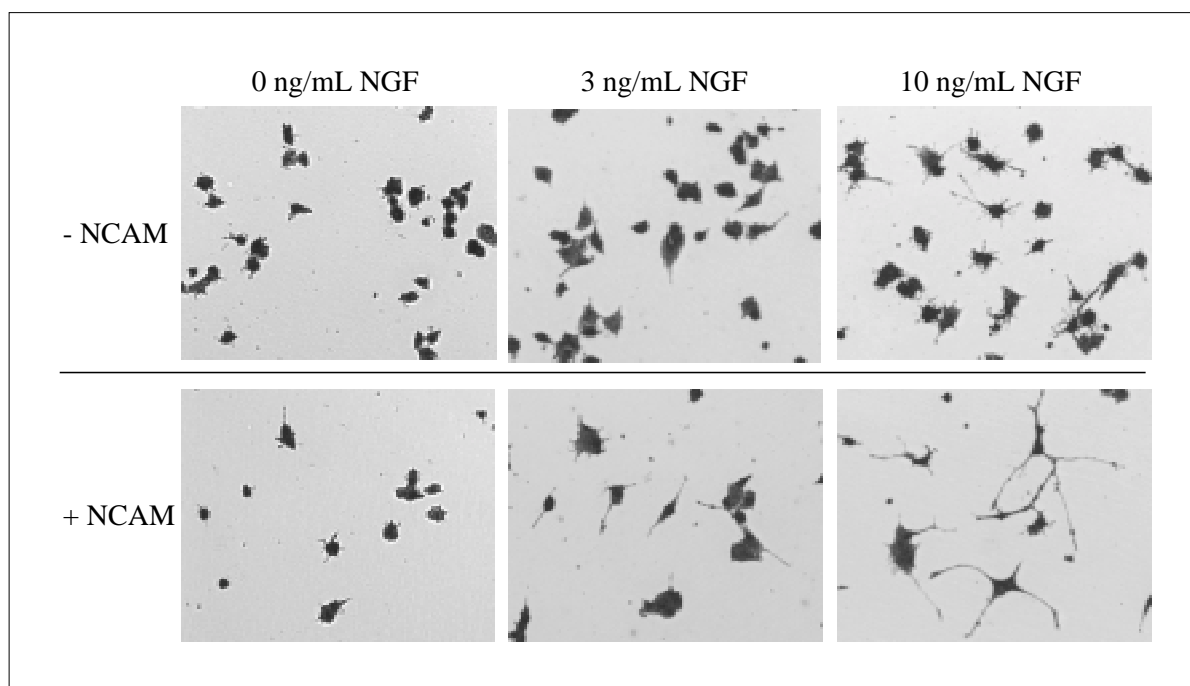


Abb. 15: Stimulation von Neuritenwachstum in PC12-Zellen mit löslichen NCAM.

Ausgewählte Bilder von PC12-Zellen, die mit 0, 3 oder 10 ng/ml NGF und ohne oder mit NCAM (2,5 µg/mL) behandelt wurden. Die Ausschnitte wurden bei einer 160-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die Quantifizierung der Neuritenlänge pro Zelle ergab, daß lösliches NCAM das Neuritenwachstum von PC12-Zellen in der Gegenwart von 3 und 10 ng/mL NGF um etwa 100% steigert im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. 16). Dagegen stimuliert NCAM kaum das Neuritenwachstum, wenn den Zellen kein NGF angeboten wird. Geringe Mengen NGF scheinen für die Initiation der Neuritenbildung in PC12-Zellen wichtig zu sein. Alle folgenden Experimente wurden daher in der Gegenwart von 3 ng/mL NGF durchgeführt.

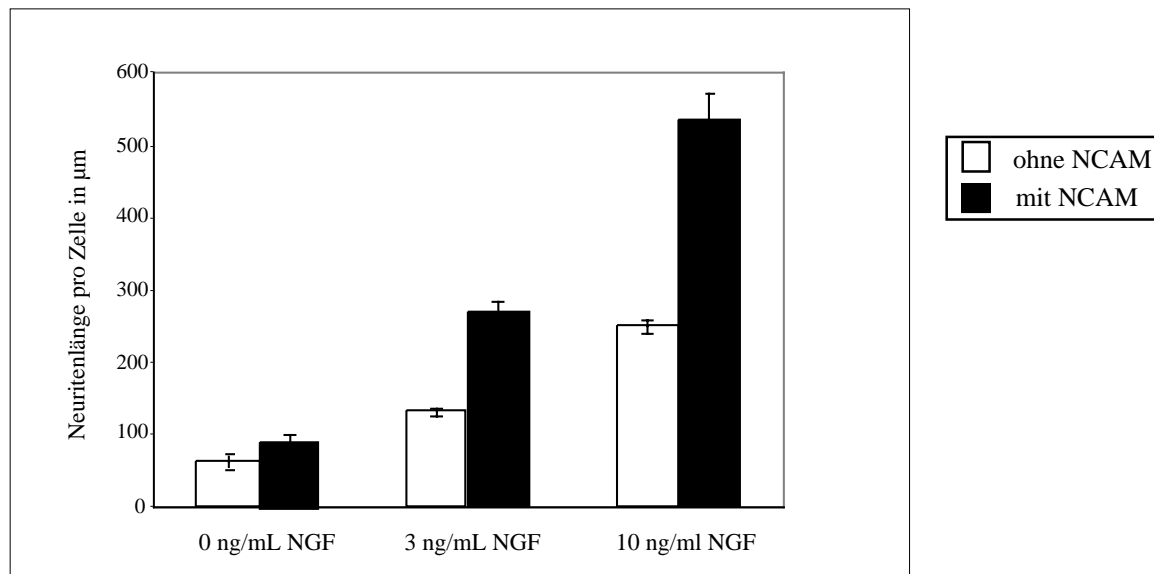


Abb. 16: Quantifizierung des Neuritenwachstums von NCAM-stimulierten und unstimulierten PC12-Zellen.

PC12-Zellen wurden mit NGF unterschiedlicher Konzentrationen (0, 3, 10 ng/mL) und ohne (weiße Balken) oder mit 2,5 µg/mL NCAM (schwarze Balken) behandelt. Die Kultivierung erfolgte für 2 Tage auf Kollagen IV.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der Neuritenlängen pro Zelle in µm der verschiedenen behandelten PC12-Zellen. Für die Mittelwertberechnung wurden 20 Bilder mit mindestens 60 Zellen pro Bild ausgewertet.

3.2.3. NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum in TMcytNCAM-transfizierten PC12-Zellen

Als nächstes wurde der Einfluß der überexprimierten TMcytNCAM-Domänen auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum untersucht. TMcytNCAM 140-, TMcytNCAM 180- und vektortransfizierte Zellen als Kontrolle wurden 16 h nach Transfektion unter Anwesenheit von 3 ng/ml NGF mit und ohne NCAM auf Kollagen IV kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. In Abb. 17 sind 6 photographierte Ausschnitte der verschieden behandelten Zellen gezeigt. Für die Analyse der Neuritenlängen wurden alle Zellen eines Transfektionsansatzes innerhalb der photographierten Ausschnitte ausgewertet, das heißt, nicht nur transfizierte sondern auch nicht-transfizierte Zellen gingen in die Ermittlung der durchschnittlichen Neuritenlänge ein.

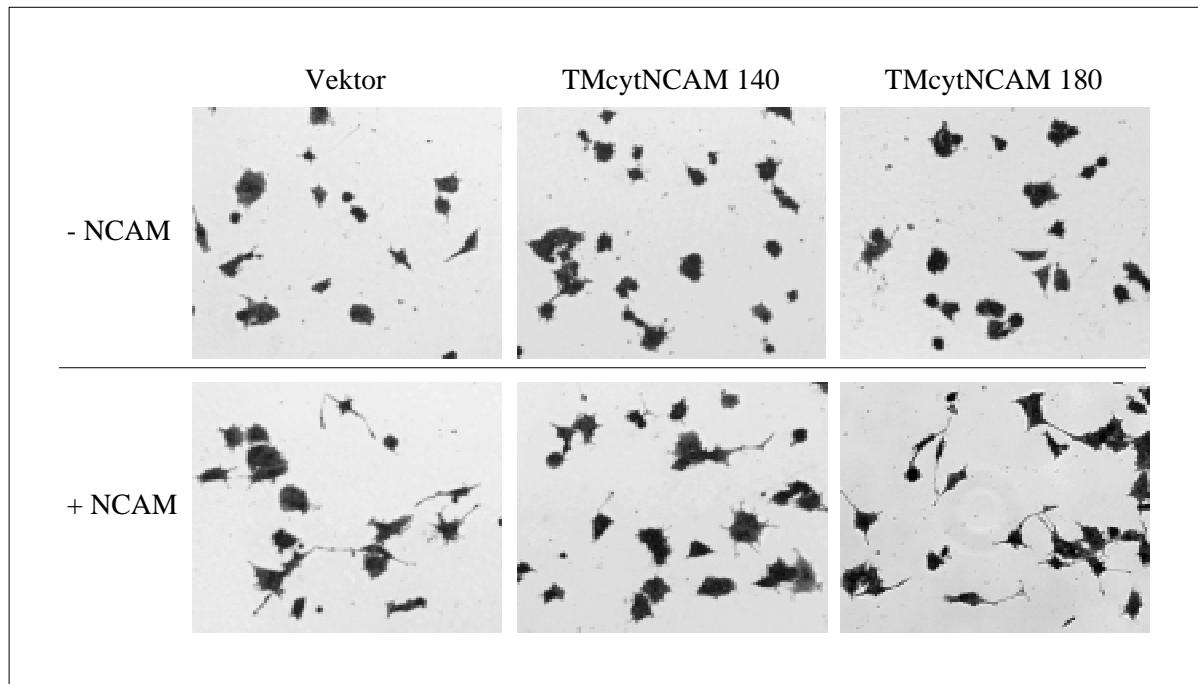


Abb. 17: Neuritenwachstum von PC12-Zellen nach Transfektion mit Vektor, TMcytNCAM 140 und TMcytNCAM 180.

Auswahl einiger Bilder von vektortransfizierten, TMcytNCAM 140- und TMcytNCAM 180-transfizierten PC12-Zellen, die mit und ohne NCAM-Behandlung für zwei Tage auf Kollagen IV kultiviert wurden. Die Ausschnitte wurden bei einer 160-fachen-Vergrößerung aufgenommen.

Das Ergebnis der Quantifizierung des Neuritenwachstums ist in Abb. 18A zu sehen. Der Mittelwert der Neuritenlängen der mit NCAM-behandelten vektortransfizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt. In einer anderen Art der Darstellung wurde das NCAM-unabhängige Neuritenwachstum jeweils für vektortransfizierte, TMcytNCAM 140- und TMcytNCAM 180-transfizierte Zellen auf 100% gesetzt, um die Steigerung des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums innerhalb der jeweilig transfizierten Zellen zu betrachten (Abb. 18B). Innerhalb der vektortransfizierten Zellen bewirkt NCAM eine Verlängerung der Neuriten um 57%, was eine geringere Steigerung des Neuritenwachstums darstellt, als die in der vorherigen Untersuchung beobachtete Verdoppelung der Neuritenlänge in Wildtypzellen. Die geringere Neuritenverlängerung könnte durch die stressreiche Transfektionsprozedur bedingt sein.

Für die TMcytNCAM 140-überexprimierenden Zellen läßt sich eine Reduktion des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums um 33% im Vergleich zu vektortransfizierten Zellen erkennen (Abb. 18A). Oder anders betrachtet: Wenn man NCAM-unabhängiges und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum innerhalb der cytNCAM 140-transfizierten Zellen vergleicht, so induziert NCAM eine Neuritenverlängerung von nur 40% (im Vergleich zu 57% bei Vektortransfizierten) (Abb. 18B). Auch das NCAM-unabhängige Neuritenwachstum ist in cytNCAM140-transfizierten PC12-Zellen leicht, aber signifikant vermindert im Vergleich zu vektortransfizierten Zellen (Abb. 18A; *3).

In TMcytNCAM 180-transfizierten Zellen ist das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum um 38% höher im Vergleich zu den vektortransfizierten Zellen. Oder anders ausgedrückt: Innerhalb der TMcytNCAM 180-transfizierten Zellen stimuliert NCAM das Neuriten-

wachstum um 82%. Das NCAM-unabhängige Neuritenwachstum der TMcytNCAM 180-transfizierten Zellen unterscheidet sich dagegen nicht vom Neuritenwachstum der unbehandelten vektortransfizierten Zellen.

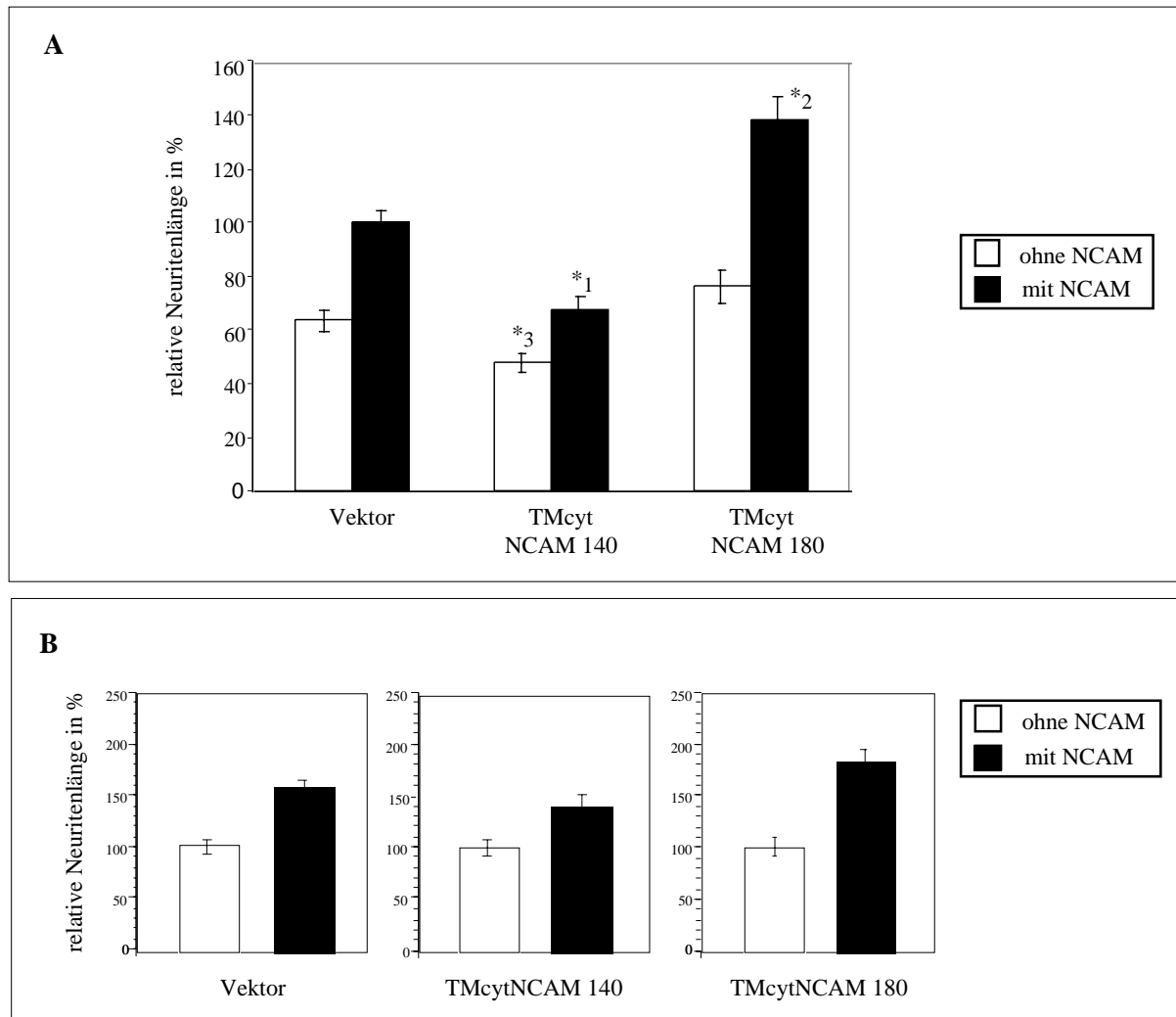


Abb. 18: Quantifizierung des Neuritenwachstum von TMcytNCAM 140-, TMcytNCAM 180- und Vektor-transfizierten PC12-Zellen .

Die mit Vektor-, TMcytNCAM 140- oder TMcytNCAM 180-cDNA transfizierten PC12-Zellen wurden ohne (weiße Balken) oder mit 2,5 µg/mL NCAM (schwarze Balken) behandelt und unter Anwesenheit von 3 ng/mL NGF auf Kollagen IV kultiviert. Nach zwei Tagen wurde die Neuritenlängen quantifiziert. Die Balken representieren die Mittelwerte der relativen Neuritenlänge/Zelle in % +/- Standardfehler. Für die Mittelwertberechnung wurden 25 Bilder ausgewertet, die mindestens 40 Zellen enthielten. Die 25 Bilder stammen aus zwei durchgeführten Experimenten.

A: Der Mittelwert der mit NCAM-behandelten vektortransfizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt. Die Signifikanzen wurden zum Niveau $\alpha = 0,01$ berechnet ($p \leq 0,01$).

*1: Unterschied in den Mittelwerten von TMcytNCAM 140-transfizierten und Vektor-transfizierten Zellen bezüglich des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums.

*2: Unterschied in den Mittelwerten von TMcytNCAM 180-transfizierten und Vektor-transfizierten Zellen bezüglich des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums.

*3: Unterschied in den Mittelwerten von TMcytNCAM 140-transfizierten und Vektor-transfizierten Zellen bezüglich des NCAM-unabhängigen Neuritenwachstums.

B: Die Mittelwerte des NCAM-unabhängigen Neuritenwachstum wurde jeweils für Vektor-, TMcytNCAM 140- und TMcytNCAM 180-transfizierte Zellen auf 100% gesetzt.

3.3. Identifizierung und Charakterisierung intrazellulärer Bindungspartner von NCAM 140 und NCAM 180

Mit Hilfe der Ligandenaffinitätschromatographie sollten neue intrazelluläre Bindungspartner von NCAM 140 und NCAM 180 gefunden und durch anschließendes Peptide-Mass-Fingerprinting identifiziert werden. Für die Ligandenaffinitätschromatographie wurden größere Mengen (einige mg) von cytNCAM 140 und cytNCAM 180 benötigt. Die cytosolischen Domänen beider Isoformen wurden in *E.coli* als Fusionsproteine mit einem Poly-Histidin-Tag überexprimiert und anschließend gereinigt. Um spezifische Bindungspartner von unspezifischen unterscheiden zu können, wurde eine weitere Ligandenaffinitätschromatographie mit einem Kontrollprotein durchgeführt. Als Kontrollprotein wurde das vom leeren pRSET C-Expressionsvektor kodierende Protein verwendet, welches aus 70 Aminosäuren besteht und N-terminal ebenfalls den His-Tag-Fusionsanteil enthält.

3.3.1. Expression der rekombinanten cytNCAM-Fusionsproteine in *E.coli*

CytNCAM 140 und cytNCAM 180 ließen sich erfolgreich als Fusionsproteine in dem *E.coli*-Stamm BL21 exprimieren. Zur Ermittlung optimaler Proteinausbeuten wurde der zeitliche Verlauf der Proteinexpression in einer Pilotexpression untersucht. Im Westernblot konnte unter Verwendung des Anti-XpressTM-Antikörpers, welcher ein bestimmtes Epitop im Fusionsanteil erkennt, als auch mit dem NCAM-spezifischen Antikörper 5B8, der ein Epitop der cytoplasmatischen Domäne erkennt, die Expression der cytNCAM-Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 19). Beide NCAM-Isoformen lassen sich sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion der aufgearbeiteten Zellen nachweisen.

Das cytNCAM 140-Fusionsprotein erscheint als 29 kD-Bande. Die entsprechend theoretisch erwartete molekulare Masse liegt sehr viel niedriger bei 17,2 kD. Oft zeigen Proteine aber in der SDS-PAGE ein anderes Laufverhalten, als ihr theoretisches Gewicht erwarten läßt. CytNCAM 140 läßt sich bereits 1 h nach Induktion mit IPTG in maximaler Menge in der löslichen Fraktion nachweisen. 3 h nach Induktion nimmt der Proteingehalt in der löslichen Fraktion wieder ab, während in der unlöslichen Fraktion die Menge an cytNCAM 140 zunimmt.

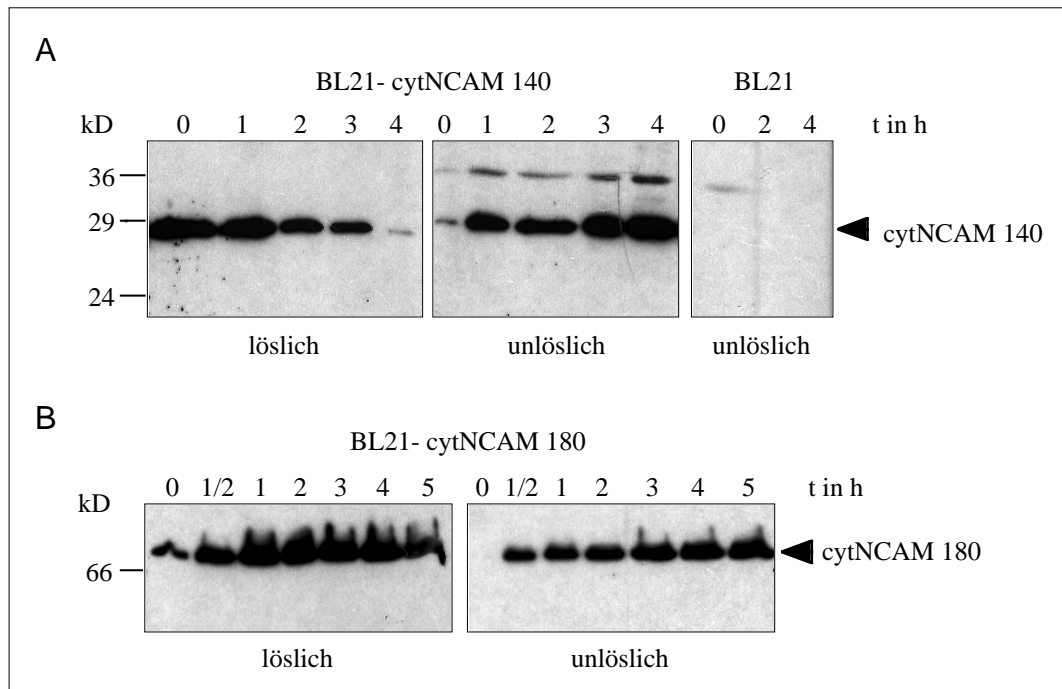


Abb. 19: Nachweis des überexprimierten cytNCAM 140- und cytNCAM 180-Fusionsproteins im Westernblot mit dem monoklonalen NCAM-Antikörper 5B8.

Aliquots der aufgearbeiteten löslichen und unlöslichen Fraktionen der cytNCAM 140- (A) und cytNCAM 180-(B) transformierten BL21-Zellen wurden in einem 12%-igen bzw. 10%-igen SDS-PAGE (cytNCAM 140: 12%; cytNCAM 180: 10%) aufgetrennt und geblottet. Die aufgetragenen Proteinmengen sind antiproportional zur OD, welche die Bakterienkultur zu dem jeweiligen Zeitpunkt hatte. Als Negativ-Kontrolle sind die löslichen Fraktionen einer nicht transformierten BL21-Kultur eingesetzt worden.

Das cytNCAM 180-Fusionsprotein, für das theoretisch eine molekulare Masse von 46,4 kD erwartet wird, erscheint kurz oberhalb der 66 kD-Markerbande. Auch cytNCAM 180 wird bereits 1 h nach Induktion mit IPTG in maximalen Mengen exprimiert. Bis zu 4h bleibt die nachweisbare Menge in den löslichen Fraktionen in etwa konstant und nimmt nach 5 h etwas ab. Etwa die Hälfte des überexprimierten cytNCAM 140- und cytNCAM 180-Fusionsproteins erscheint in der unlöslichen Fraktion. Die Banden zum Zeitpunkt $t = 0$ h zeigen, daß bereits vor Induktion mit IPTG das cytNCAM-Gen transkribiert und translatiert wird. Für die Expression in großem Maßstab wurde für cytNCAM 140 und cytNCAM 180 eine Expressionszeit von 2 h gewählt.

3.3.2. Expression des Kontrollproteins in *E.coli*

Nach Transformation des insertlosen pRSET C-Vektors in den *E.coli*-Stamm BL21 konnte die Expression des Kontrollproteins durch IPTG stimuliert werden. Mit Hilfe des Anti-Xpress-Antikörpers ließ sich im Westernblot das Kontrollprotein als 14 kD-Bande nachweisen. Die apparente molekulare Masse weicht damit nur geringfügig von der theoretischen molekularen Masse von 11,9 kD ab. Der Schmier unterhalb der Bande könnte unvollständig translatiertes oder abgebautes Kontrollprotein darstellen. Der größte Teil des Kontrollproteins verbleibt nach Zellaufschluß in der löslichen Fraktion. Bereits 0,5 h nach Induktion mit IPTG wird das Kontrollprotein stark exprimiert, wobei mit fortschreitender Inkubationszeit die Expressionsintensität bis $t = 5$ h unverändert bleibt.

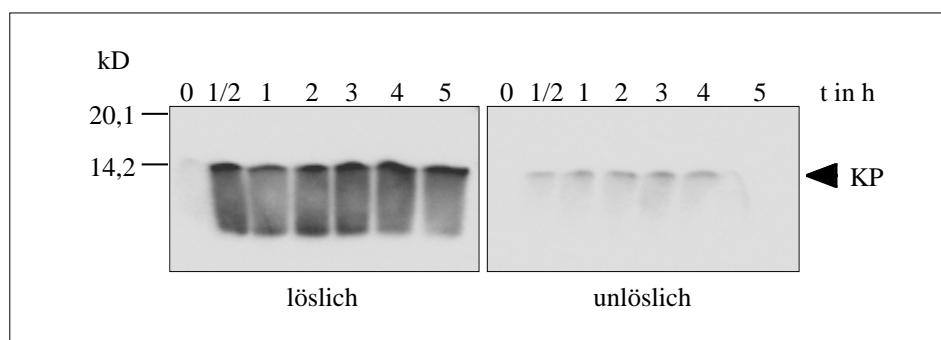


Abb. 20: Nachweis des überexprimierten Kontrollproteins im Westernblot mit dem Anti-X-Press-Antikörper.

Die aufgearbeiteten löslichen und unlöslichen Fraktionen der BL21-Transformanten wurden in einem 15%-igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und geblottet. Die aufgetragenen Proteinmengen sind antiproportional zur OD, welche die Bakterienkultur zu dem jeweiligen Zeitpunkt hatte.

Für die Expression in großem Maßstab wurde für das Kontrollprotein eine Expressionszeit von 3 h gewählt.

3.3.3. Reinigung der rekombinanten cytNCAM-Fusionsproteine

Um für die Ligandenaffinitätschromatographie möglichst reines cytNCAM-Fusionsprotein zu erhalten, wurden verschiedene chromatographische Methoden der Proteinreinigung wie Ni²⁺-NTA-Chromatographie, Immunaaffinitätschromatographie, Anionenaustausch- (Mono Q- (Trimethylaminoethyl)-HPLC) und Kationenaustauschchromatographie (Mono S (Sulfo-methyl)-HPLC) getestet. Diese Aufreinigungsmethoden wurden zunächst für die Reinigung des cytNCAM 180-Fusionsproteins angewandt. Die Reinigung über Ni²⁺-NTA-Chromatographie erwies sich als nicht erfolgreich. Das cytNCAM 180-Fusionsprotein ließ sich sowohl bei einstündiger als auch bei mehrstündiger Inkubation mit ausreichender Menge an Ni²⁺-NTA-Agarose nicht gut koppeln. Im Überstand nach der Kopplung war noch reichlich NCAM vorhanden (nicht gezeigt). Bei der Elution, die über einen Imidazol-Stufengradienten von 50-500 mM Imidazol erfolgte, eluierte cytNCAM 180 mit vielen anderen Proteinen (bakterielle Wirtsproteine) über den gesamten Imidazolgradienten, am stärksten zwischen 125-200 mM. Obwohl der Anteil an Bakterienproteinen mit oberflächennahen Histidinen nur äußerst gering sein soll, scheinen sehr viele Bakterienproteine an die Ni²⁺-NTA zu koppeln. Dies scheint vom Fusionsprotein abhängig zu sein, da mit dieser Methode andere Fusionsproteine viel sauberer gereinigt werden konnten.

Sowohl in der Anionen- als auch in der Kationenaustauschchromatographie adsorbierte cytNCAM 180 vollständig an die Säule, was darauf hinweist, daß cytNCAM 180 sowohl anionisches als auch kationisches Verhalten aufweist. In der Anionenaustauschchromatographie eluierte cytNCAM 180 über den gesamten NaCl-Gradienten (0-1 M NaCl), am stärksten bei einer NaCl-Konzentration von 280-440 mM NaCl (keine Abb.). Allerdings eluierten in diesem Bereich auch wieder sehr viele bakterielle Wirtsproteine des Lysats, was sich auch bei einem langsameren Anstieg der NaCl-Konzentration in diesem Bereich nicht änderte. Auch diese Methode war also für die Reinigung von NCAM ungeeignet. In der Kationenaustauschchromatographie eluierte cytNCAM 180 zwar etwas sauberer als in der MonoQ-HPLC, allerdings waren die Mengenverluste groß, so daß auch diese Aufreinigung nicht in Frage kam. Als einzige erfolgreiche Methode erwies sich die Reinigung von cytNCAM über Immunaaffinitätschromatographie.

3.3.3.1. Aufreinigung von rekombinanten cytNCAM über Immunaaffinitätschromatographie

Der monoklone NCAM-Antikörper 5B8 erkennt eine Peptidsequenz innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140 und NCAM 180 und ist daher für die Aufreinigung der cytosolischen Domänen von NCAM in der Immunaaffinitätschromatographie gut geeignet. Die über Protein-G-Sepharose aus Zellkulturüberstand gereinigten 5B8-IgGs wurden an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelt und für die Immunaaffinitätschromatographie verwendet. Nach Rezirkulation des NCAM-haltigen Bakterienlysates über die Säule und ausgiebigen Waschen ließen sich cytNCAM 140 und cytNCAM 180 unter basischen und salz-

reichen Bedingungen gut eluieren, allerdings eluierten auch geringe Mengen anderer unspezifisch gebundener Proteine. Da cytNCAM in einem Durchgang nicht vollständig aus dem Lysat isoliert werden konnte und die Kapazität der Säule mit 5 mg gekoppelten 5B8 vermutlich nicht ausreichte, wurde die Affinitätschromatographie mit den Durchläufen mehrfach wiederholt.

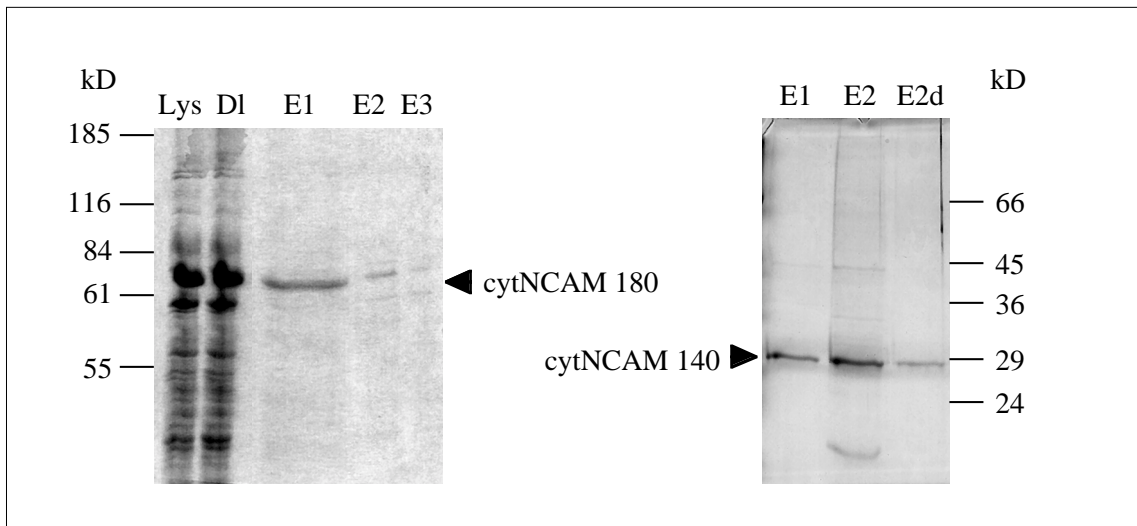


Abb. 21: Reinigung von rekombinanten cytNCAM-Fusionsprotein durch Immunaффinitätschromatographie.

16 μ L Aliquots der Eluate und je 4 μ L vom Ausgangslysat (Lys) und dem Durchlauf (D1) wurden in einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Elutionsbedingungen in den Eluaten E1-E3: E1: 0,1 M Tris/HCl pH 11,5; E2: 3 M NaCl; E3: 0,1 M Glycin pH 2,5; E2d: dialysiertes Eluat 2.

Die cytNCAM-haltigen Eluate wurden gepoolt, dialysiert und konzentriert. Mit der Immunaффinitätschromatographie konnte für cytNCAM 140 und cytNCAM 180 eine Ausbeute von ca. 1 mg gereinigtes Protein pro Liter Bakterienkultur erzielt werden.

3.3.4. Reinigung des Kontrollproteins durch Ni^{2+} -NTA-Chromatographie

Das Kontrollprotein wurde unter nativen Bedingungen über Ni^{2+} -NTA-Aффinitätschromatographie gereinigt. Im Gegensatz zu rekombinanten cytNCAM 180 ließ sich das Kontrollprotein gut an Ni^{2+} -NTA koppeln. Bei einer Imidazolkonzentration von 75-175 mM Imidazol eluierte das Kontrollprotein vollständig (Abb. 22). Die kontrollproteinhaltigen Eluate enthielten nur zwei bakterielle Wirtsproteine als Verunreinigung, die im SDS-PAGE bei ca. 70 kD und 25 kD liefen.

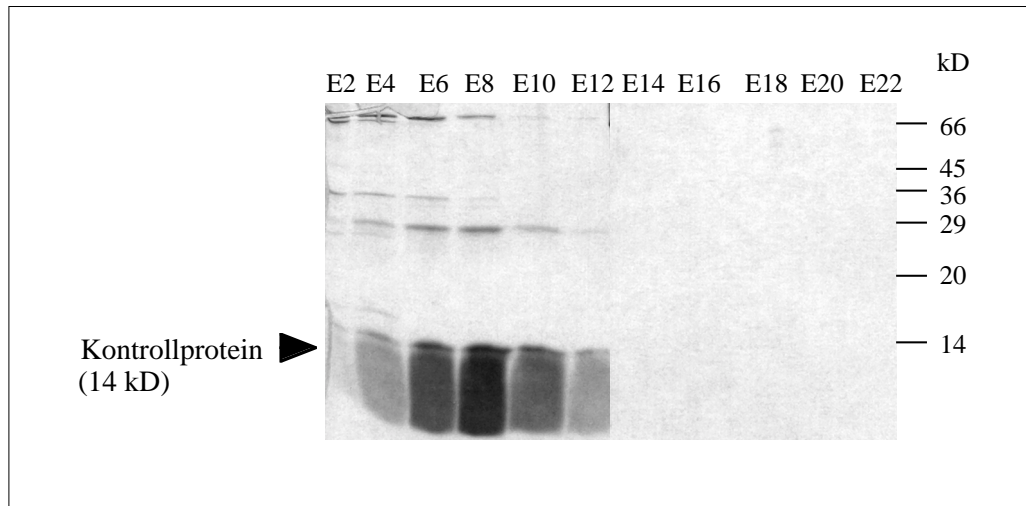


Abb. 22: Reinigung des Kontrollproteins mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Chromatographie.

16 μ L Aliquots der Eluate wurden in einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. NaCl-Konzentrationen in mM in den Eluatfraktionen: E2: 50; E4: 75; E6: 100; E8: 125; E10: 150; E12: 175; E14: 200; E16: 250; E18: 300; E20: 350; E22: 400.

Pro Liter *E.coli*-Kultur konnte 1,2 mg Kontrollprotein durch Ni²⁺-NTA-Chromatographie gewonnen werden.

3.3.5. Identifizierung potentieller cytNCAM-Bindungspartner durch Ligandenaffinitätschromatographie

Für die Suche intrazellulärer Bindungspartner von cytNCAM 140 und cytNCAM 180 wurden die gereinigten Fusionsproteine an CNBr-aktivierter Sepharose gekoppelt. Als Ausgangsmaterial für die Ligandensuche diente Rattenhirncytosol, sowie die membranhaltige und die cytoskeletthaltige Fraktion des Rattenhirns. Die jeweilige Hirnfraktion wurde rezirkulierend über eine Ethanolamin-blockierte Vorsäule und anschließend über die cytNCAM 140- bzw. cytNCAM 180-Säule gepumpt. Um unspezifische Wechselwirkungen von spezifischen unterscheiden zu können wurde parallel dazu eine Ligandenaffinitätschromatographie mit dem Kontrollprotein und vorgeschalteter Ethanolamin-blockierter Vorsäule durchgeführt. Alle Säulen wurden getrennt voneinander gewaschen und anschließend mit steigenden KCl-Konzentrationen (250, 500 und 1000 mM KCl) eluiert. Nach 23-facher Konzentrierung der Eluate wurden Aliquots mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

3.3.5.1. SDS-PAGE-Analyse der cytNCAM-bindenden Proteine

Als erstes wurde die Cytosolfraction des Hirns auf Anwesenheit möglicher Bindungspartner für NCAM untersucht. Da die Ligandenaffinitätschromatographien für NCAM 140 und

NCAM 180 nicht zeitgleich durchgeführt wurden, sind auch jeweils die Eluate der entsprechend verwendeten Kontrollproteinsäulen und Vorsäulen gezeigt.

Im 500 mM KCl-Eluat der cytNCAM 180-Säule können im 10% SDS-PAGE-Gel zwei stärker gefärbte Proteinbanden auf der Höhe von 50 und 31 kD und vier schwächer gefärbte auf der Höhe von 42, 34, 28 und 24 kD identifiziert werden (Abb. 23 A). Im 1 M KCl-Eluat erscheinen weiterhin vier der Proteine. In den Vorsäuleneluates sind keine Proteine zu finden, so daß sich unspezifische Wechselwirkungen mit der Ethanolamin-blockierten CNBr-Sepharose ausschließen lassen. Von der Kontrollproteinsäule eluierten trotz langen Waschens viele Proteine, bei denen unspezifische Wechselwirkungen mit dem Fusionsanteil/Kontrollprotein anzunehmen sind. Nach Auftrennen der Eluate in einem 7,5%-SDS-PAGE-Gel konnte außerdem ein weiteres hochmolekulares Protein von 240 kD im cytNCAM 180-Säulen-Eluat gefunden werden (nicht abgebildet).

Von den Eluaten der cytNCAM 140-Säule waren im Coomassie-Blau-gefärbten Gel nur Proteine im ersten Eluat (250mM KCl-Eluat) zu detektieren (Abb. 23 B). Das Bandenmuster der Proteine ähnelt stark dem des cytNCAM 180-Säulen-Eluates. Die Höhe der Banden stimmen mit den eben beschriebenen überein, so daß vermutlich an cytNCAM 140 die gleichen Proteine gebunden haben wie an cytNCAM 180. Im Vorsäulen- und Kontrollprotein-säuleneluat der cytNCAM 140-Affinitätschromatographie sind im Coomassie-Blau-gefärbten Gel keine Verunreinigungen zu erkennen. Die sechs mit Pfeilen gekennzeichneten Proteinbanden im cytNCAM 180-Säuleneluat und die nicht gezeigte 240 kD-Proteinbande wurden aus dem Gel herausgeschnitten und für MALDI-TOF-MS-(Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight-Massenspektroskopie) Analysen verwendet.

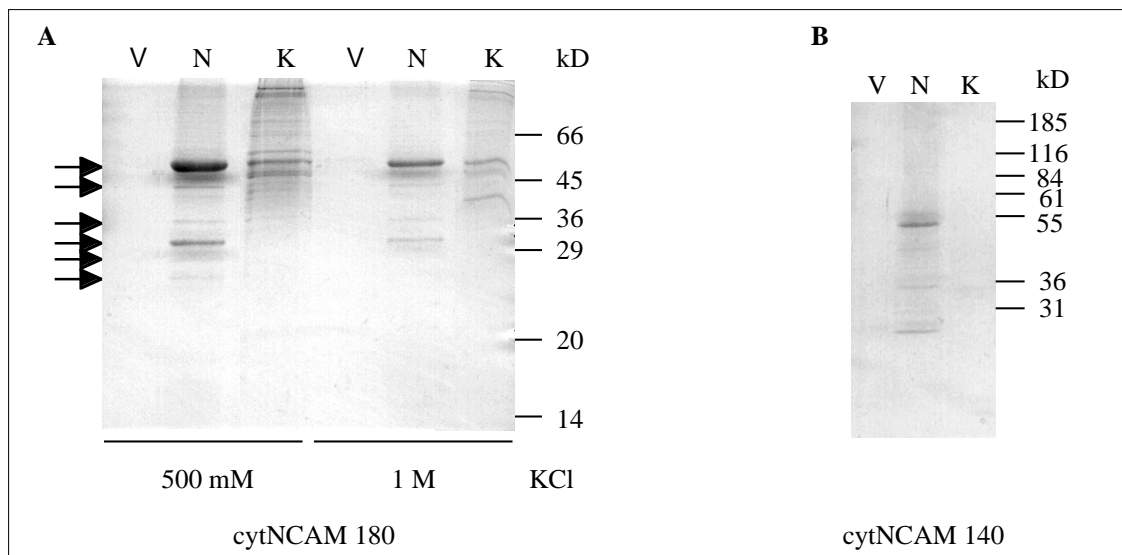


Abb. 23: Eluate der mit der cytosolischen Hirnfraktion durchgeführten Ligandenaffinitätschromatographie.

A: Eluate (500 mM und 1 M KCl) der cytNCAM 180-Säule (N), der Vorsäule (V) und der Kontrollprotein-Säule (K) im Coomassie-Blau gefärbten 10% SDS-PAGE-Gel. Die Pfeile weisen auf Proteinbanden im cytNCAM 180-Säuleneluat hin, die für die MALDI-TOF-MS-Analyse ausgeschnitten wurden. **B:** Eluate (250 mM KCl) der cytNCAM 140-Säule (N), der Vorsäule (V) und der Kontrollprotein-Säule (K) im Coomassie-Blau gefärbten 7,5% SDS-PAGE-Gel. Es wurden jeweils 30 µl-Aliquots der konzentrierten Eluate aufgetragen.

In den Ligandenaffinitätschromatographien, die mit der Membranprotein- bzw. der Cytoskelettprotein-haltigen Fraktion des Rattenhirns durchgeföhrt wurden, eluierten ebenfalls Proteine von den cytNCAM-Säulen. Alle Proteine eluierten bereits bei der ersten Erhöhung der Salzkonzentration von 250 mM KCl. Im 500 mM- und 1M-KCl-Eluat konnten keine Proteine gefunden werden. Wie in Abb. 24 zu erkennen, konnten von der cytNCAM 180-Säule fünf Proteine der Membranfraktion eluiert werden, die im 7,5% SDS-PAGE-Gel auf der Höhe von > 200, 160-170, 100, 65, 55 und ca. 45 kD liefen. Im Eluat der cytNCAM 140-Säule sind nur schwache Proteinbanden auf der Höhe von 160-170, 90, 70, 50, 32 und < 31 kD erkennbar.

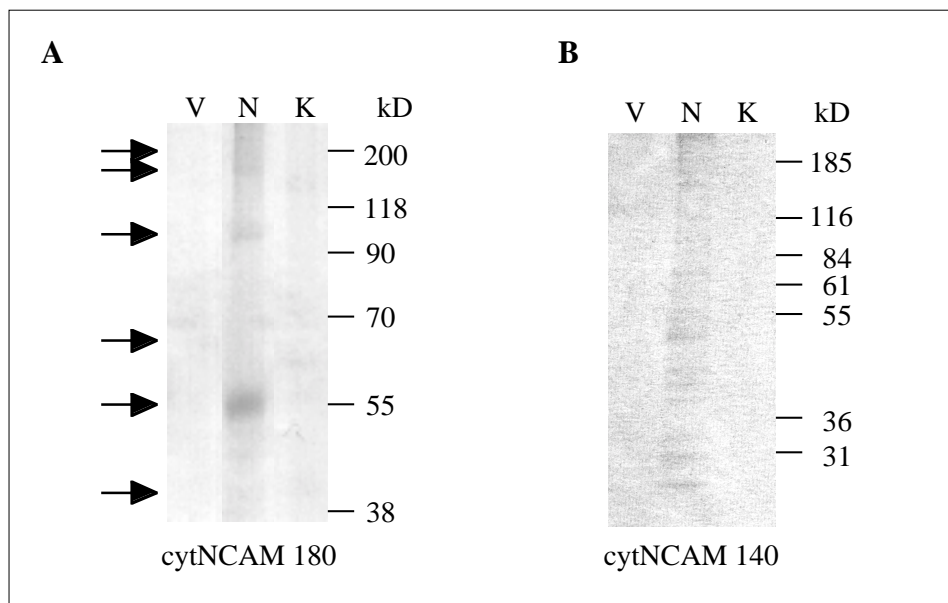


Abb. 24: Eluate der mit der Membranproteinpräparation durchgeföhrt Ligandenaffinitätschromatographie.

A: Eluate (250 mM KCl) der cytNCAM 180-Säule (N), der Vorsäule (V) und der Kontrollprotein-Säule (K) im Coomassie-Blau-gefärbten 7,5% SDS-PAGE-Gel. Die Pfeile weisen auf Proteinbanden im cytNCAM 180-Säuleneluat hin, die für die MALDI-TOF-MS-Analyse ausgeschnitten wurden.
B: Eluate (250 mM KCl) der cytNCAM 140-Säule (N), der Vorsäule (V) und der Kontrollprotein-Säule (K) im Coomassie-Blau gefärbten 7,5% SDS-PAGE-Gel. Es wurden jeweils 30 µl-Aliquots der konzentrierten Eluate aufgetragen.

Im cytNCAM 180-Säuleneluat der Affinitätschromatographie, bei der die Cytoskelettproteinangereicherte Fraktion als Ausgangsmaterial diente, sind deutlich sechs Proteinbanden mit den apparenten Massen von 150, 100, 85, 60, 50 und 38 kD sowie eine schwache Bande bei 57 kD zu erkennen (Abb. 25). Im Eluat der Kontrollproteinsäule ist auch eine schwache Bande auf Höhe von 100 kD zu sehen, die mit der im NCAM-Säuleneluat identisch sein könnte. Trotz gleicher Waschprozedur eluierten erstmals auch Proteine von der Vorsäule, wobei ein Protein von ca. 130 kD besonders stark vertreten war. Im Vorsäuleneluat und Kontrollproteinsäuleneluat der cytNCAM 140-Affinitätschromatographie sind dagegen keine Verunreinigungen zu beobachten.

Im Eluat der cytNCAM 140-Säule ist eine starke Proteinbande von etwa 160 kD zu erkennen, sie scheint nicht identisch mit der 150 kD-Bande im cytNCAM 180-Eluat zu sein. Weiterhin sind schwache Banden auf der Höhe von 90 kD, 75, 55 und 45 kD zu detektieren.

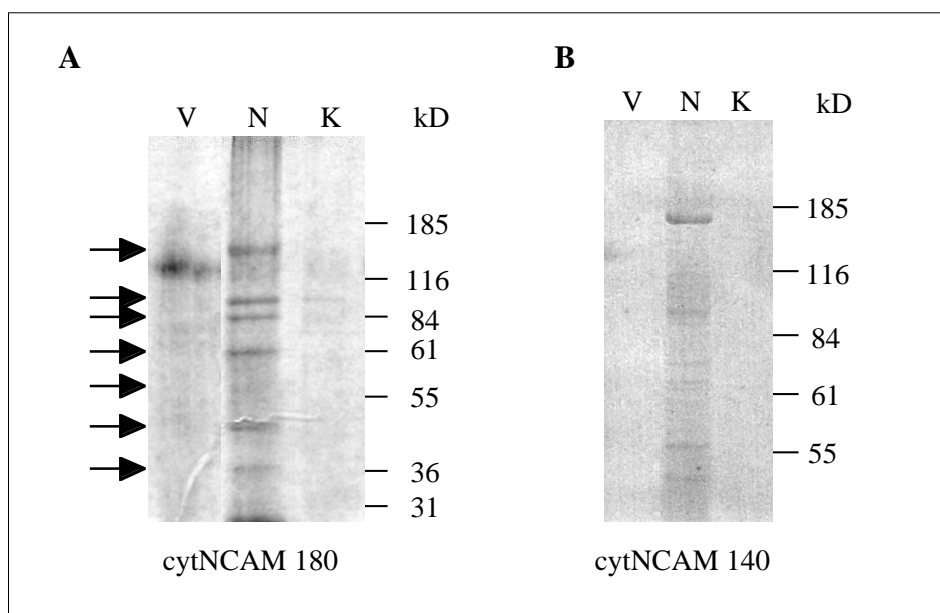


Abb. 25: Eluate der mit der Cytoskelettproteinpräparation durchgeführten Ligandenaffinitätschromatographie.

A: Eluate (250 mM KCl) der cytNCAM 180-Säule (N), der Vorsäule (V) und der Kontrollproteinsäule (K) im Coomassie-Blau-gefärbten 7,5% SDS-PAGE-Gel. Die Pfeile weisen auf Proteinbanden im cytNCAM 180-Säuleneluat hin, die für die MALDI-TOF-MS-Analyse ausgeschnitten wurden.

B: Eluate der cytNCAM 140-Säule (N), der Vorsäule (V) und der Kontrollproteinsäule (K) im Coomassie-Blau gefärbten 7,5% SDS-PAGE-Gel. Es wurden jeweils 30 µl-Aliquots der konzentrierten Eluate aufgetragen.

3.3.5.2. Tryptischer Verdau der Bindungskandidaten und Analyse der Peptide im MALDI-TOF-MS

Alle in Abb. 23, 24 und 25 mit Pfeilen gekennzeichneten Proteine der cytNCAM 180-Säulen Eluate wurden nach Auftrennung in SDS-PAGE-Gelen aus dem Gel herausgeschnitten und mit Trypsin im Gelstück verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden durch MALDI-TOF-MS analysiert. Mit ihr ist es möglich, die Masse von Peptiden, Proteinen und DNA mit einer hohen Genauigkeit anhand ihrer Flugzeit in einer feldfreien Flugröhre (nachdem sie vorher in einem elektrischen Feld beschleunigt wurden) zu bestimmen. Anhand der molekularen Massen der einzelnen Peptide, die durch Verdau eines Proteins mit einer bestimmten Protease (z.B. Trypsin) entstehen, läßt sich in Datenbanken das Protein eindeutig identifizieren. Es muß sich allerdings um ein Protein handeln, dessen Sequenz bekannt ist.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Mascot von Matrix-Science der NCBIr-Datenbank oder mit PeptIdent Peptide-Mass-Fingerprinting der Swiss-Prot-Datenbank.

In Tab. 3 sind alle identifizierten Proteine mit Sequenzabdeckung (sequence coverage) und der Anzahl der mit dem theoretischen tryptischen Verdau in der Masse übereinstimmenden Peptide aufgelistet.

Identifiziertes Protein	MW in kD	beobachtetes (geschätztes) MW in kD	pI	gefunden in Fraktion	Sequenz-Abdeckung	Anzahl der abgedeckten Peptide
MAP1A	300	240	5,46	Cyt	10 %	29
α -Tubulin	50	50-55	4,79	Cyt /M /Csk	22 %	7
β -Tubulin	50	50-55	4,94	Cyt /M /Csk	43 %	16
β -Actin	42	44	5,29	Cyt / Csk	34 %	9
α -Actinin-1	100	100	5,23	Csk	14 %	14
LANP	28,5	28	3,99	Cyt	15 %	5
TOAD-64	62,5	60	5,95	Csk	31 %	12
Syndapin I	50,7	50	5,15	Csk	25 %	9
Valonsin containing protein (VCP)	89,9	100	5,14	M	10 %	8
RhoA-binding kinase α (ROK α)	160	50	5,63	Cyt	10 %	13

Tab. 3: In der MALDI-TOF-MS identifizierte Proteine: Mögliche Interaktionspartner von cytNCAM 180.

Auflistet sind alle im cytNCAM180-Säulen-Eluat vorkommende Proteine, die durch Peptide-Mass-Fingerprinting identifiziert werden konnten. Die untersuchten Proteine stammten aus der Cytosolfraction (Cyt), Membranproteinpräparation (M) oder der Cytoskelettproteinpräparation (Csk) des Rattenhirns. Neben den theoretischen molekularen Massen, sind die im Gel beobachteten, geschätzten Massen der Proteine angegeben, sowie die isoelektrischen Punkte (pI). Die Sequenzabdeckung gibt den Anteil des Proteins an, der durch die Peptide mit übereinstimmenden Peptidmassen des tryptin-verdauten Proteins abgedeckt wird.

Von den 19 in der MALDI-TOF-MS untersuchten Proteinen konnten 10 durch Peptide-Mass-Fingerprinting in der Datenbank identifiziert werden.

Innerhalb der 50 kD-Proteinbande des Eluates der Cytosolpräparation ließen sich massenspektroskopisch drei Proteine nachweisen. Bei diesen handelt es sich um α - und β -Tubulin, sowie um die RhoA-bindenden Kinase α (RhoA-binding kinase α , ROK α), eine Serin-/Threonin-Proteinkinase.

α - und β -Tubulin, die beiden Grundbausteine der Mikrotubuli, besitzen im monomeren Zustand eine theoretische molekulare Masse von 55 kD, was mit der beobachteten gut übereinstimmt.

ROK α dagegen hat eine molekulare Masse von 160 kD. Dieser Wert liegt um das 3-fache höher als die beobachtete Masse von 50 kD. Die Vermutung, daß ROK α schon beim Auftrennen im SDS-PAGE nicht als vollständiges Molekül, sondern in Bruchstücken vorlag, wird dadurch bekräftigt, daß die in der Probe massenspektroskopisch gefundenen und zur Sequenz passenden Peptide alle innerhalb eines bestimmten Abschnitts des Enzyms zu finden sind (zwischen Aminosäure 605 und Aminosäure 1040, von insgesamt 1379 Aminosäuren). Die Proteinbande bei 240 kD konnte als das Mikrotubuli-assoziierte Protein 1A (MAP 1A) der Ratte identifiziert werden. Die eigentliche theoretische Masse von MAP 1A beträgt 300 kD und weicht damit relativ stark vom beobachteten Laufverhalten im SDS-PAGE-Gel ab.

β -Actin ließ sich sowohl in der mit der Cytosolpräparation als auch in der mit der Cytoskelettprotein angereicherten Fraktion durchgeführten Affinitätschromatographie im Eluat der cytNCAM180-Säule massenspektroskopisch nachweisen.

Das 28-kD-Protein konnte als das leucinreiche saure Kernprotein (Leucline-Rich-Acidic-Nuclear-Protein, LANP), von nun ab LANP genannt, bestimmt werden. Die theoretische molekulare Masse von 28,5 kD stimmt sehr gut mit der im Gel beobachteten überein.

Das bei etwa 110 kD laufende Protein der Membranfraktion konnte in der Datenbankrecherche als das "Valosin-containing Protein" (p97/VCP) (oder "Transitional-Endoplasmic-Reticulum-ATPase") identifiziert werden, welches eine theoretische molekulare Masse von 89,9 kD hat. Im Eluat der mit der Cytoskelettprotein-angereicherten Fraktion durchgeführten Affinitätschromatographie ließen sich vier Proteine mit der MALDI-TOF-MS-Analyse nachweisen. Bei diesen Proteinen handelt es sich um α -Actinin (100 kD), β -Actin (42 kD), Syndapin I (50,7 kD) und TOAD-64 (Turned-On-After-Division-64, 64 kD-Protein) auch bekannt als "Dihydropyrimidinase-Related-Protein-2" (DRP-2). α -Actinin ist ein Actinbindendes Cytoskelettprotein, das für die Bündelung von Actinfilamenten verantwortlich ist.

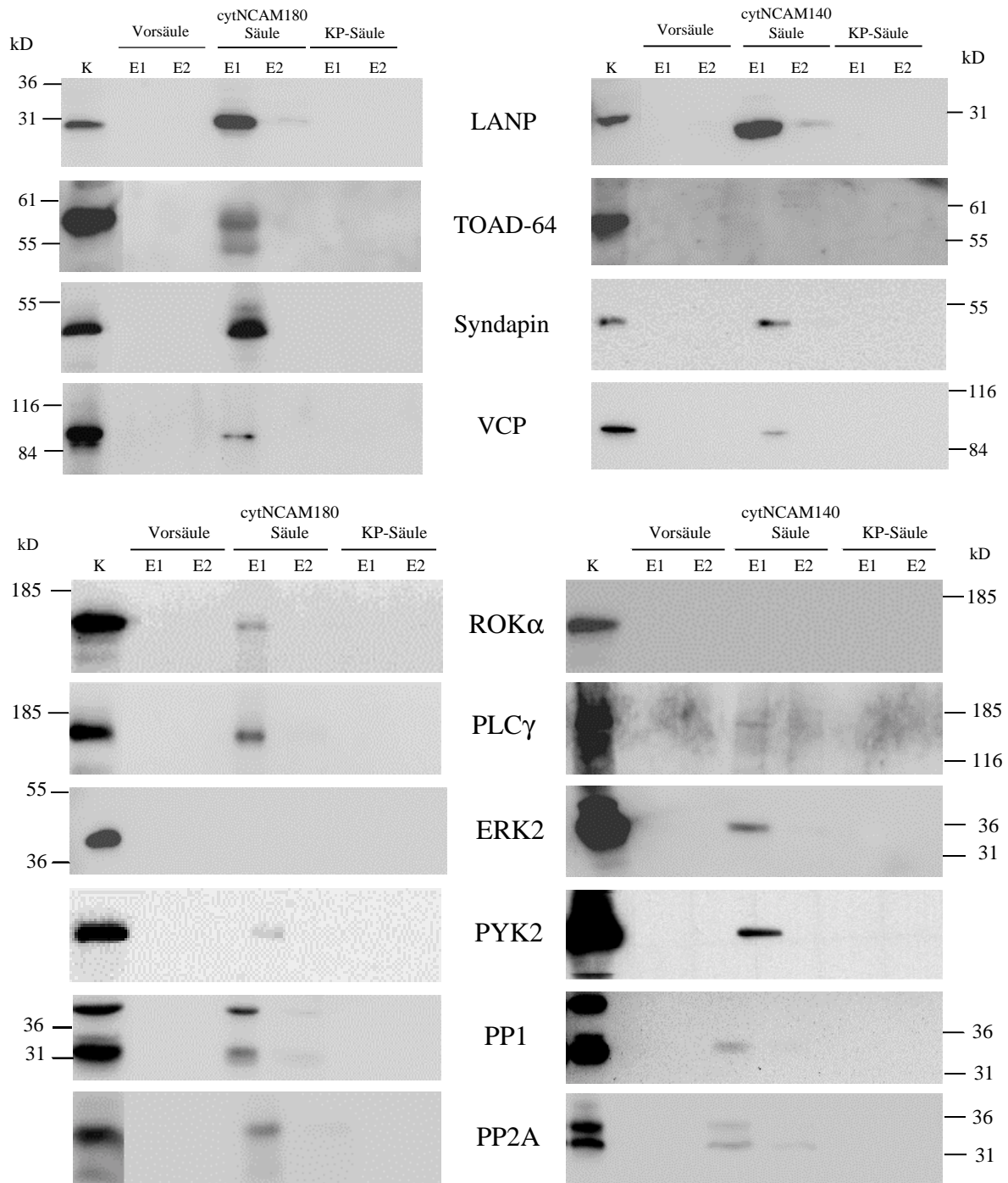


Abb. 26: Nachweis verschiedener Proteine in den cytNCAM-Eluaten im Westernblot.

20 μ L Aliquots der eingegebenen Eluate wurden in einem 7,5% oder 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und geblottet. Als Positivkontrollen dienten 30 μ g der jeweilig verwendeten Proteinpräparationen des Rattenhirns (cyt, M oder csk). Ausnahme: Für α -Actinin wurde 350 ng gereinigtes, kommerziell erhältliches α -Actinin (Sigma) als Positivkontrolle verwendet. Die Blotmembranen wurden mit den verschiedenen primären Antikörpern inkubiert.

Alle massenspektroskopisch identifizierten Proteine konnten auch mittels Westernblot-Analyse in den Eluaten der cytNCAM 180-Säule nachgewiesen werden. α - und β -Tubulin, sowie LANP traten sowohl im 250 mM- als auch im 500 mM-KCl-Eluat auf, was auf eine relativ starke Interaktion hinweist. Alle anderen Proteine eluierten vollständig bei 250 mM KCl. In der MAP 1A-Analyse läßt sich eine ganz schwache MAP 1A-Bande im Eluat der

Kontrollproteinsäule detektieren. Das Signal im cytNCAM 180-Säulen-Eluat ist aber um ein Vielfaches intensiver. Da in den ersten α -Actininblots α -Actinin in der Ausgangslösung (Csk) schwer als distinkte Bande zu erkennen war, wurde als Positivkontrolle 350 ng α -Actinin der Firma Sigma verwendet. ROK α ließ sich in der Westernblot-Analyse sowohl in der Cytosolpräparation als auch im Eluat der cytNCAM 180-Säule als 160 kD-Bande identifizieren. Zusätzlich erschien eine zweite Bande in der Höhe von 50 kD (hier nicht gezeigt). Bei der 160 kD-Bande scheint es sich um die vollständige, intakte ROK α zu handeln, während die 50 kD-Bande, die massenspektroskopisch mit der ROK α -Struktur identifiziert wurde, wahrscheinlich ein Zerfallsprodukt des Enzyms darstellt.

Neben den massenspektroskopisch analysierten Proteinen konnte außerdem das Cytoskelett-Membran-Verbindungsprotein Spectrin, ein bereits beschriebener Bindungspartner für NCAM 180, im cytNCAM 180-Säulen-Eluat nachgewiesen werden; geringere Mengen Spectrin banden allerdings auch an die Kontrollprotein-Säule.

Tropomyosin, ein kleines actinbindendes Protein mit Aktinfaser-stabilisierender Wirkung konnte ebenfalls im cytNCAM 180-Säulen-Eluat detektiert werden. Weiterhin waren Phospholipase C γ (PLC γ , 148 kD), die cytosolische Tyrosinkinase PYK2 (116 kD), sowie die Serin-/Threonin-Phosphatasen PP1 und PP2A in den Eluaten anwesend. In den PP1- und PP2A-Analysen erschienen meistens Doppelbanden bei 34/40 kD (PP1) und 32/35 kD (PP2A). Die theoretische molekulare Masse der katalytischen Untereinheiten der PP2A und PP1, welche von den Antikörpern erkannt wird, beträgt 36 kD. In den Antikörper-Produktbeschreibungen waren in abgebildeten Westernblot-Analysen auch Doppelbanden zu erkennen, wobei es sich im Fall der PP1 bei der unteren Bande um die 36 kD große PP1 und bei der oberen Bande um β -Actin handeln soll. (Der PP1-Antikörper zeigt eine Kreuzreaktion mit β -Actin.)

Von den cytoskelettalen Proteinen ließen sich die Mikrotubulibausteine α - und β -Tubulin, sowie α -Actinin und Spectrin im Eluat der cytNCAM 140-Säule nachweisen. β -Actin und Tropomyosin dagegen waren nicht zu detektieren, was bemerkenswert ist, da α -Actinin ein Bestandteil des Actincytoskeletts ist. Sowohl LANP, Syndapin als auch VCP waren im cytNCAM 140-Säuleneluat anzutreffen, während für TOAD-64 keine distinkte Bande zu detektieren war. Die RhoA-bindende Kinase α scheint ein für cytNCAM 180-spezifischer Interaktionspartner zu sein, da sie im Eluat der cytNCAM 140-Säule nicht nachweisbar war. Die anderen Enzyme, PYK2, PP1 und PP2A sowie PLC γ (als schwache Bande erkennbar), sind ebenfalls potentielle Bindungspartner für cytNCAM 140. Die MAP-Kinase ERK2 (Extracellular-Signal-Regulated-Kinase 2, 42 kD) dagegen war ausschließlich im Eluat der cytNCAM 140-Säule nachweisbar.

Abgesehen von MAP 1A und Spectrin konnte keines der Proteine im Eluat der entsprechenden Vorsäulen und Kontrollproteinsäulen detektiert werden, so daß alle analysierten Proteine mögliche Bindungspartner für cytNCAM 180 bzw. cytNCAM 140 darstellen. In Tab. 4 sind alle massenspektroskopisch- und im Westernblot-analysierten Proteine dargestellt.

Protein	MG in kD	Maldi cytNCAM 180	WB cytNCAM 180	WB cytNCAM 140	Funktion
α -Tubulin	50	+	+	+	Komponente der Mikrotubuli
β -Tubulin	50	+	+	+	Komponente der Mikrotubuli
MAP 1A	300	+	+	-	stabilisiert Mikrotubuli
β -Actin	42	+	+	-	Baustein der Actinfilamente
Spectrin	240	-	+	+	Cytoskelett-Membran-Linker-Protein
α -Actinin-1	100	+	+	+	Bündelung von Actin-filamenten
Tropomyosin	36	-	+	-	Stabilisierung von Actin-filamenten
LANP	28,5	+	+	+	Differenzierung von Kleinhirnneuronen, Rolle in Signaltransduktion ?
TOAD-64	62,5	+	+	-	Axonwachstum, Rolle in Signaltransduktion ?
Syndapin	50,7	+	+	+	Rolle in Clathrin-vermittelter Endocytose synaptischer Vesikel, Cytoskelettdynamik
VCP	89,9	+	+	+	Vesikeltransport und -fusion, Chaperonfunktion, Erkennung von ubiquinierten Proteinen
ROK α	160	+	+	-	Ser-/Thr-Kinase, Stressfaserformierung, Fokale Adhäsionskontakte, Neuritenretraktion,
PLC γ	148	-	+	+	Wachstumsfaktor-induzierte Zellmotilität, Wachstum und Entwicklung
PYK 2	116	-	+	+	Protein-Tyrosinkinase, verwandt mit FAK, aktiviert durch hohe [Ca] und PKC
PP1	36	-	+	+	Säuger-Serin/Threonin-Protein-Phosphatase, synaptische Plastizität
PP2A	36	-	+	+	Säuger-Serin-/Threonin-Protein-Phosphatase
ERK2	42	-	-	+	MAPK, Kontrolle von Proliferation, Differenzierung, Regulation des Cytoskeletts
p130Cas	130	-	+	+	Dockingprot., bindet FAK, PYK2, Crk, Mediator der FAK-vermittelten Zellmotilität

Tab. 4: Potentielle Bindungspartner für cytNCAM 180 und cytNCAM 140.

Aufgelistet sind alle massenspektroskopisch und/oder durch Westernblot-Analyse (WB) untersuchten Proteine, die in den Eluaten der cytNCAM 180- und/oder der cytNCAM 140-Säulen der Affinitätschromatographie identifiziert werden konnten.

3.3.6. Coimmunpräzitations-Studien mit dem NCAM-spezifischen Antikörper H28

Die Ligandenaffinitätschromatographie vermittelt einen Überblick von möglichen Interaktionspartnern für die cytosolischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180. In Coimmunpräzitationsversuchen sollte anschließend versucht werden, die Ergebnisse der Ligandenaffinitätschromatographie zu bestätigen. Die Coimmunpräzitation ist eine beliebte Methode, Bindungspartner nachzuweisen, da durch Verwendung frischer Zell- oder Gewebepreparationen die physiologischen Bedingungen den *in vivo*-Bedingungen sehr nahe kommen. Die Interaktionspartner liegen nativ gefaltet vor und tragen ihre individuellen posttranslationalen Modifikationen. Der monoklonale Antikörper H28 ist für Coimmunpräzitationsversuche ein geeigneter Antikörper, da er ein extrazelluläres Epitop von NCAM erkennt und dadurch die Interaktion der cytoplasmatischen Domäne mit möglichen Interaktionspartner wahrscheinlich nicht beeinträchtigt. Allerdings erkennt H28 alle drei Hauptisoformen von NCAM (NCAM 120, 140 und 180), da diese sich im extrazellulären Bereich nicht unterscheiden. So ist eine Zuordnung der coimmunpräzitierten Proteine zu speziell einer der drei Isoformen nicht möglich. Im Falle eines copräzitierten Transmembranproteins ist außerdem eine mögliche extrazelluläre Interaktion mit NCAM nicht auszuschließen. In Abb. 27 ist zu sehen, daß H28 alle drei NCAM-Isoformen der Maus erkennt, nicht aber die der Ratte. Für die Untersuchungen mußte daher Maushirn als Ausgangsmaterial für die Präzitation verwendet werden.

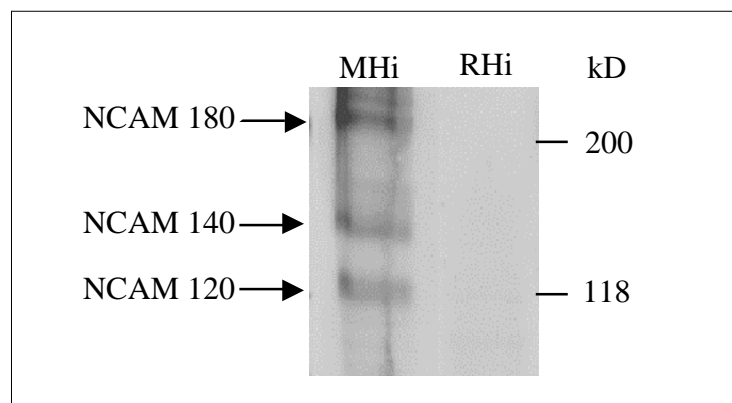


Abb. 27: H28-Antikörper-Test im Westernblot.

20 µg Maushirn-(MHi) und Rattenhirnprotein (RHi) wurden im 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Nitrocellulose wurde mit H28-Zellkulturüberstand inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem Anti-Ratte-IgG-Antikörper.

3.3.6.1. Coimmunpräzitation von PLC γ , ROK α und Spectrin mit NCAM

PLC γ , ROK α und Spectrin ließen sich erfolgreich mit dem H28-Antikörper zusammen mit NCAM aus Maushirnsolubilisat in Anwesenheit von 150 mM NaCl und 0,2% TritonX-100 coimmunpräzitieren (Abb. 28). Daß NCAM nicht in Form von drei distinkten Banden im Blot sichtbar ist, sondern als diffuse Färbung, liegt daran, daß Hirne von 14 d alten Mäusen

für die Immunpräzipitation verwendet wurden. In diesem Lebensstadium ist NCAM noch stark polysialyliert. Durch die Anwesenheit verschieden langer Polysialinsäureketten schwanken die molekularen Massen der einzelnen NCAM-Moleküle.

Alle vier präzipitierten Proteine erscheinen nicht im MAR (Mouse-Anti-Rabbit)-Präzipitat und auch nicht in der Protein-G-Sepharose (PGS)-Probe, so daß eine unspezifische Bindung an IgGs oder PGS auszuschließen ist. Zu bemerken ist, daß hier in der Abbildung die ROK α -Bande im H28-Präzipitat sehr schwach ausgebildet ist, während sie auf dem Röntgenfilm ebenfalls schwach aber als distinkte Bande zu erkennen war.

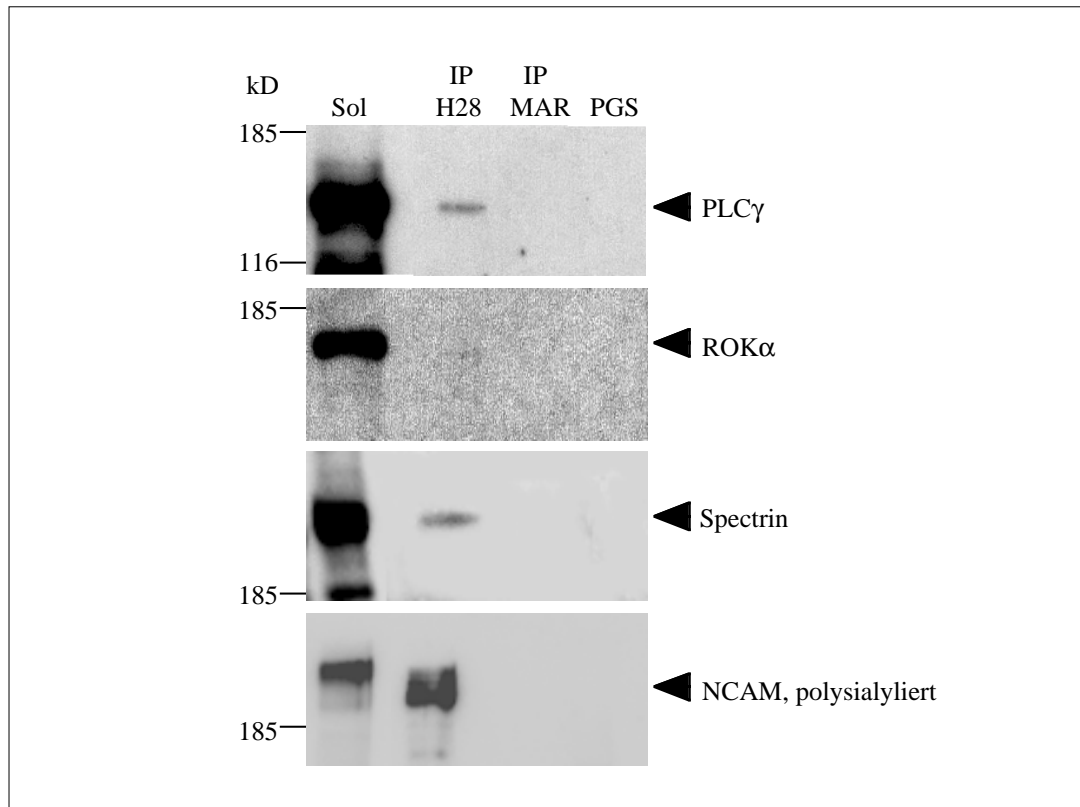


Abb. 28: Coimmunpräzipitation von PLC γ , ROK α und Spectrin mit NCAM aus Maushirnsolubilisat.

14 d alte Maushirne wurden solubilisiert und für die Immunpräzipitationen verwendet. Aus dem 0,2% Triton X-100/150 mM NaCl-Solubilisat wurde NCAM mit dem mAk H28 präzipitiert. Als Negativkontrollen diente eine Präzipitation mit einem Maus-anti-Kaninchen (MAR)-Antikörper sowie die Inkubation des Solubilisats mit PGS (Protein-G-Sepharose) allein. Sol: Maushirnsolubilisat, MAR-IP: "Mouse-Anti-Rabbit-IgG"-Immunpräzipitation, PGS: Protein-G-Sepharose.

30 μ g Maushirnprotein und 20 μ L der Präzipitationen wurden im 7,5% SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von PLC γ , ROK α und Spectrin erfolgte im Westernblot mit spezifischen Antikörpern, der von NCAM mit H28.

Alle anderen in der Ligandenaffinitätschromatographie gefundenen Proteine konnten bisher nicht mit NCAM coimmunpräzipitiert werden. Auch durch Änderung der Versuchsbedingungen, z.B. Änderungen der NaCl-Konzentration (50, 75 und 150 mM NaCl), sowie der Gehalt an Triton X-100 (zwischen 0,5% und 0,02%) im Inkubations- und Waschpuffer konnten keine Ergebnisse erzielt werden. Ebenso führte die Anwesenheit eines anderen Detergenz im Puffer, wie z.B. das zwitterionische Detergenz Chaps, zu keinen Erfolgen.

3.3.7. Pull-down-Experimente

Eine weitere Möglichkeit, Interaktionspartner nachzuweisen, bieten Pull-down-Experimente, bei welchen der eine Partner in gereinigten Zustand meist als Fusionsprotein an eine Matrix immobilisiert wird und mit einer Proteinpräparation aus Zellen oder Geweben, welche den anderen Interaktionspartner enthält, inkubiert wird. Für die Experimente standen rekombinante Glutathion-S-Transferase (GST)-fusionierte PLC γ -Konstrukte und GST-fusioniertes LANP als cDNA in prokaryontischen Expressionsvektoren zur Verfügung. Die in *E.coli* überexprimierten GST-fusionierten Proteine lassen sich gut mit Hilfe der Glutathion-Sepharose reinigen. Für die Pull-down-Experimente wurden die Fusionsproteine an die Glutathion-sepharose immobilisiert.

3.3.7.1. Pull-down-Experimente mit rekombinanten GST-PLC γ -Konstrukten

In den PLC γ -Pull-down-Experimenten wurden vier verschiedene GST-PLC γ 1-Konstrukte der Ratte verwendet, die uns von der Arbeitsgruppe M. Falasca zur Verfügung gestellt worden waren [Falasca et al., 1998]. Die Konstrukte decken unterschiedliche strukturelle und funktionelle Bereiche der PLC γ ab, welche schematisch in Abb. 29 dargestellt sind. Es handelt sich hierbei um die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) am N-Terminus, die N-terminale Src-Homologie-(SH)-2-Domäne (N-SH2) und die C-terminale SH2-Domäne (C-SH2). Das vierte Konstrukt enthält beide SH2-Domänen (N-SH2-, C-SH2). Die SH3-Domäne als GST-Fusionsprotein stand uns zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente noch nicht zur Verfügung. Die cDNA-Fragmente der PLC γ 1-Konstrukte lagen in dem prokaryontischen Expressionsvektor pGEX-2T vor. Als Negativkontrolle wurden Pull-downs mit dem GST-Fusionsanteil durchgeführt, der eine molekulare Masse von 26 kD hat.

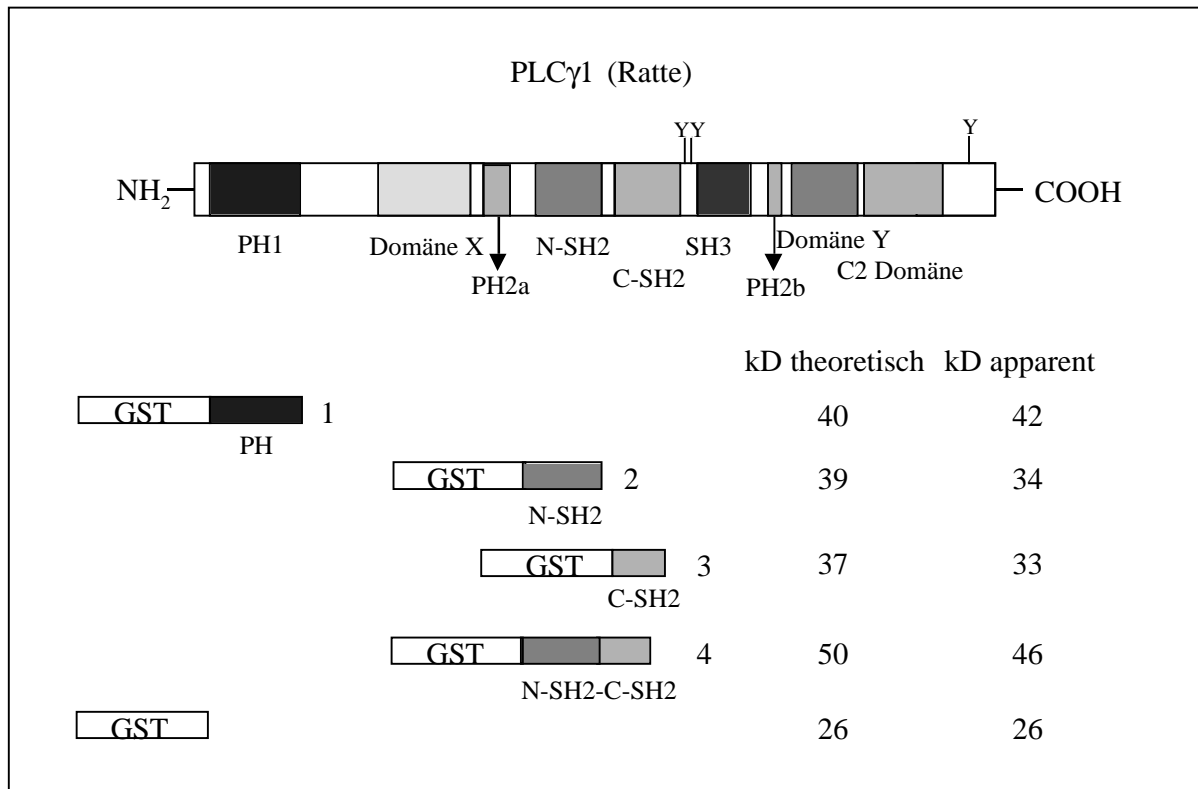


Abb. 29: Schematische Darstellung der PLC γ 1 und der GST-PLC γ 1-Konstrukte.

GST sowie die verschiedenen GST-PLC γ 1-Fusionsproteinkonstrukte wurden in dem *E.coli*-Stamm BL21 nach Induktion mit IPTG exprimiert und anschließend an Glutathion-Sepharose immobilisiert. In Abb. 30 sind die gereinigten von der Glutathion-Sepharose abgekochten Fusionsproteine in einem Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE-gezeigt.

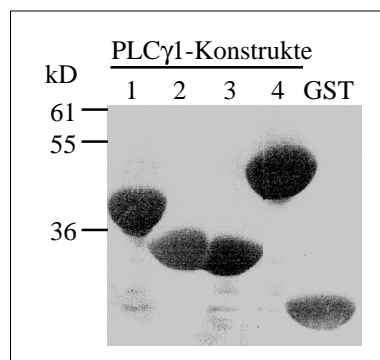


Abb. 30: Nachweis der GST-PLC γ 1-Fusionsproteine und GST im Coomassie-Blau-gefärbten Gel. Die von der Glutathion-Sepharose abgekochten GST-PLC γ 1-Fusionsproteine und GST wurden in einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. PLC γ 1-Konstrukte: 1: GST-PLC γ 1-PH, 2: GST-PLC γ 1-N-SH2, 3: GST-PLC γ 1-C-SH2; 4: GST-PLC γ 1-N-SH2-C-SH2.

In den Pull-down-Experimenten wurde eine Membranprotein-angereicherte Präparation von Rattenhirn mit den an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-PLC γ 1-Fusionsproteinen und gekoppelten GST inkubiert. Beide NCAM-Isoformen konnten mit der PH-Domäne und der C-terminalen SH2-Domäne von PLC γ 1 "gepullt" (von der Glutathion-Sepharose gelöst) werden (Abb. 31). Die N-terminale SH2-Domäne dagegen scheint nicht an NCAM zu binden.

In Abb. 31 ist zu beobachten, daß insbesondere die C-terminale SH2-Domäne bevorzugt mit NCAM 140 interagiert, was man anhand der stärker gefärbten NCAM 140-Bande im Vergleich zur NCAM 180-Bande erkennen kann. Ein weiteres Indiz dafür ist, daß in der Ausgangslösung (Membranprotein-angereicherte Fraktion) mehr NCAM 180 als NCAM 140 vorkommt und dennoch die C-terminale SH2-Domäne die Interaktion mit NCAM 140 bevorzugt. Eine unspezifische Interaktion der NCAM-Isoformen mit GST konnte nicht beobachtet werden.

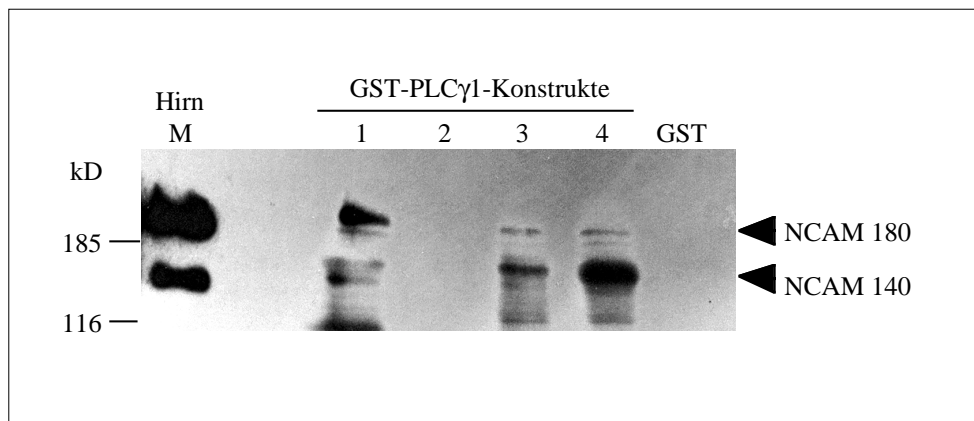


Abb. 31: GST-PLC γ 1-Pull-down mit einer Membranprotein-angereicherten Fraktion des Rattenhirns.

Im SDS-PAGE wurden 20 μ L der Pull-down-Proben und 4 μ g der Membranproteinpräparation aufgetrennt. Der Nachweis der beiden NCAM-Isoformen erfolgte mit dem mAk 5B8 im Westernblot. PLC γ 1-Konstrukte: 1: GST-PLC γ 1-PH, 2: GST-PLC γ 1-N-SH2, 3: GST-PLC γ 1-C-SH2; 4: GST-PLC γ 1-N-SH2-C-SH2.

In weiteren Pull-down-Experimenten sollte getestet werden, ob die PLC γ -Interaktion mit NCAM direkt oder indirekt ist. Dazu wurde gereinigtes His-Tag-fusioniertes cytNCAM 140 und cytNCAM 180 mit den an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-PLC γ 1-Fusionsproteinen inkubiert. Als Pull-down-Negativkontrolle diente die an His-Tag-fusionierte cytosolische Domäne von CEACAM short.

CytNCAM 140 ließ sich zusammen mit der PH-Domäne und der C-terminalen SH2-Domäne der PLC γ 1 von der Glutathion-Sepharose lösen (Abb. 32), was die vorherigen Ergebnisse bestätigt. Dabei scheint cytNCAM 140 eine höhere Bindungsaffinität zur C-SH2-Domäne als zur PH-Domäne zu haben, da an C-SH2 mehr als die doppelte Menge von cytNCAM 140 gebunden hat als an die PH-Domäne. Eine unspezifische Interaktion von cytNCAM 140 mit GST war nicht zu detektieren. CytNCAM 180 wurde mit allen vier PLC γ 1-Konstrukten von der Glutathion-Sepharose gelöst. Ein geringer Anteil von cytNCAM 180 interagierte allerdings auch unspezifisch mit GST. Die stärkste cytNCAM 180-Intensität ließ sich bei Inkuba-

tion mit den PLC γ 1-Konstrukten 3 und 4 erkennen, so daß cytNCAM 180 wie cytNCAM 140 eine bevorzugte Affinität zur C-terminale SH2-Domäne von PLC γ 1 hat. Das Kontrollprotein cytCEACAM short band an keines der PLC γ 1-Konstrukte.

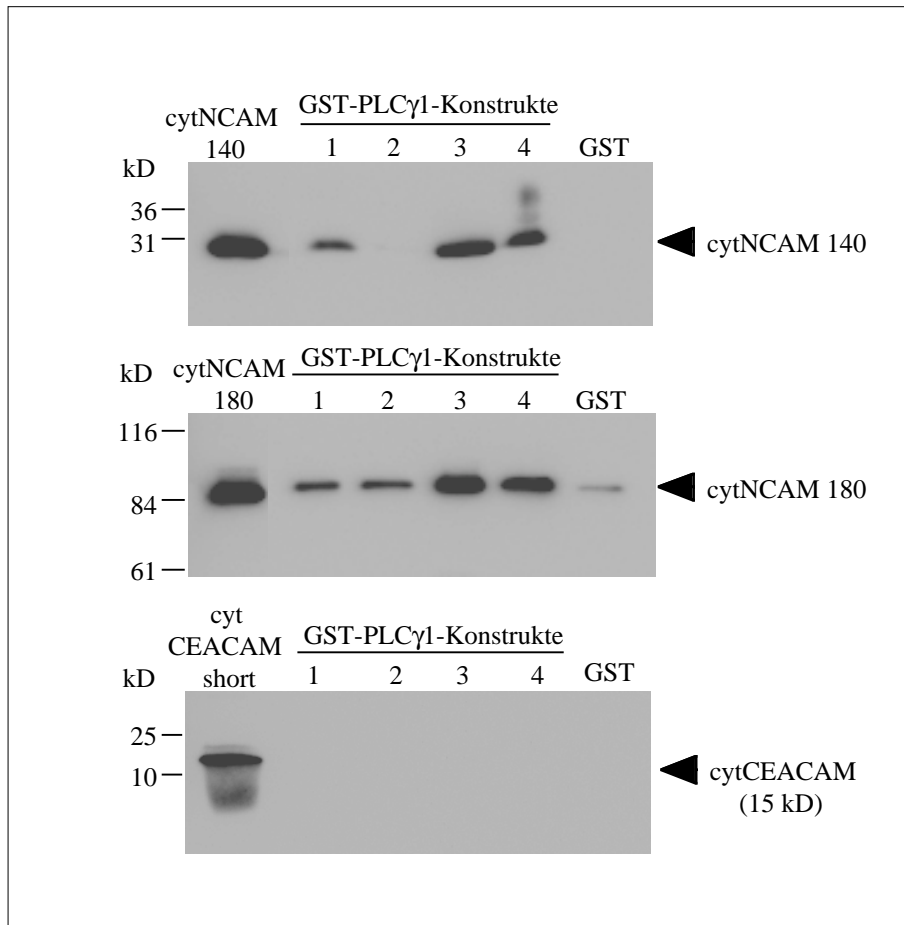


Abb. 32: PLC γ 1-Pull-down mit gereinigtem His-Tag-cytNCAM 140 und His-Tag-cytNCAM 180.

Je 5 μ g gereinigtes rekombinantes His-Tag-cytNCAM bzw. cytCEACAM short wurde mit 50 μ L der mit GST-PLC γ -Konstrukten- bzw. GST-beladenen Glutathion-Sepharose in 300 μ L PBS/0,5% Triton X-100 inkubiert. In der Positivkontrolle des Westernblots wurden 340 ng rekombinantes cytNCAM bzw. cytCEACAM short aufgetragen. Der Nachweis von NCAM im Blot erfolgte mit dem mAk 5B8.

Üb: Überstand nach Pull-down.

3.3.7.2 Pull-down-Experimente mit rekombinanten GST-LANP

Für die GST-LANP-Pull-down-Experimente wurde das dem Ratten-LANP homologe humane LANP (pp32) als GST-fusioniertes Protein verwendet. Die im pGEX-5X-2-Expressionsvektor vorliegende humane LANP-cDNA wurde uns von J.A. Steitz und C.M. Brennan zur Verfügung gestellt [Brennan et al., 2000]. In Abb. 33A ist über Glutathion-Sepharose-gereinigtes GST-LANP und GST im Coomassie-Blau-gefärbten Gel gezeigt. Das GST-LANP-Fusionsprotein zeigt eine apparente molekulare Masse von 56 kD. In den Pull-downs, in denen Membranprotein-Präparationen von Rattenhirn verwendet wurde, war es nicht möglich eine Interaktion von NCAM mit LANP nachzuweisen. Wurde dagegen gereinigtes His-Tag-fusioniertes cytNCAM 140 und cytNCAM 180 mit dem an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST-LANP-Fusionsprotein inkubiert, so konnte eine direkte Interaktion beider NCAM-Isoformen mit LANP beobachtet werden, nicht aber mit dem Fusionsanteil GST (Abb. 33 B).

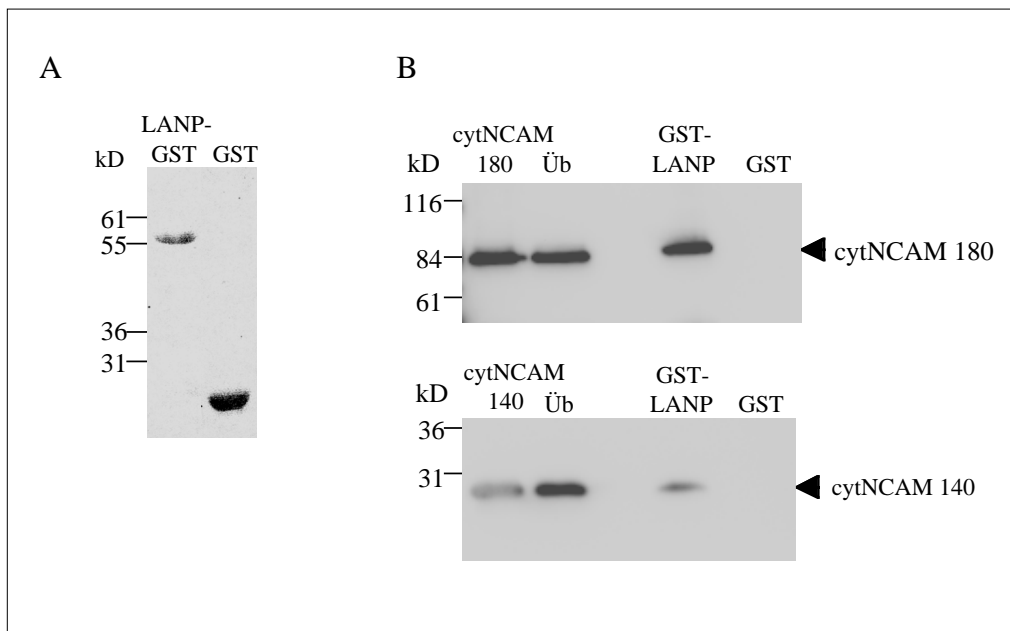


Abb. 33: GST-LANP-Pull-down mit gereinigtem His-Tag-cytNCAM 140 und His-Tag-cytNCAM 180.

A: Nachweis von GST-LANP und GST im Coomassie-Blau-gefärbten 10% SDS-PAGE.

B: Je 5 µg gereinigtes rekombinantes cytNCAM wurde mit 50 µL der mit GST-LANP- bzw GST-beladenen Glutathion-Sepharose in 300 µL PBS/0,5% Triton X-100 inkubiert. In der Positivkontrolle des Westernblots wurden 340 ng rekombinantes cytNCAM aufgetragen. Der Nachweis von NCAM im Blot erfolgte mit dem mAk 5B8. ÜB: Überstand nach Pull-down.

In weiteren Pull-down-Experimenten wurde untersucht, ob eventuell einer der potentiellen NCAM-Bindungspartner an LANP bindet. Bei der Verwendung einer cytoskelettprotein-angereicherten Fraktion des Rattenhirns konnte eine Interaktion von Syndapin mit LANP im Pull-down-Experiment gezeigt werden (Abb. 34).

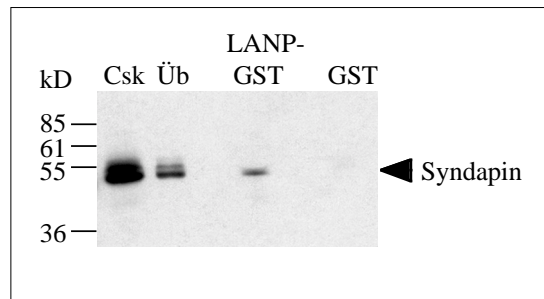


Abb. 34: GST-LANP-Pull-down mit einer Cytoskelettprotein-angereicherten Fraktion des Rattenhirns.

IM SDS-PAGE wurden 20 μ L der Pull-down-Proben und 30 μ g der Cytoskelettprotein-Fraktion (Csk) aufgetragen. Der Nachweis von Syndapin im Blot erfolgte mit einem spezifischen mAk.

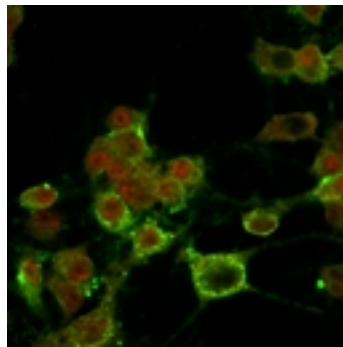
Üb: Überstand nach Pull-down.

3.3.8. Immunfluoreszenz-Analysen der potentiellen intrazellulären Bindungspartner von NCAM

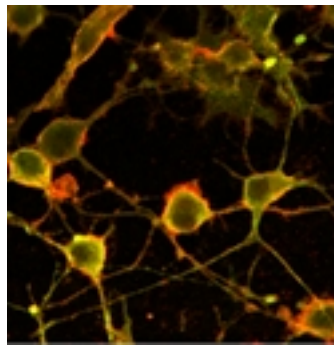
Die lokale Expression der potentiellen Bindungspartner von NCAM wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz am Laser-Scan-Mikroskop untersucht. Gleichzeitig wurde in den Immunfluoreszenzen NCAM angefärbt, um eine mögliche Colokalisation von Bindungspartnern und NCAM aufzuspüren. PC12-Zellen wurden für 2 Tage auf Kollagen IV in Anwesenheit von 250 ng/mL NGF kultiviert und nach Fixierung mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. In Abb. 35 sind einige ausgewählte Immunfluoreszenzbilder dargestellt. In Bild I ist deutlich zu erkennen, daß LANP in den meisten Zellen im Kern lokalisiert ist, wobei bei einer Zelle eine LANP-Färbung auch im Cytoplasma (und nicht im Kern) zu erkennen ist (im oberen rechten Viertel). In anderen hier nicht gezeigten Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte eine überwiegende Lokalisation von LANP im Cytoplasma beobachtet werden. Die Oberflächenexpression von NCAM, in Bild I grün angefärbt, ist deutlich zu erkennen. Eine Gelbfärbung, die sich durch Überlagerung von Grün- und Rotfärbung ergibt und auf eine Colokalisation der Proteine hindeutet, ist hier nicht zu erkennen. In Bild II ist TOAD-64 rot und NCAM grün gefärbt. Beide Proteine werden an der Oberfläche von Zellsoma und Neuriten exprimiert. In den gelb gefärbten Bereichen liegt eine Colokalisation von NCAM und TOAD-64 vor.

Für Syndapin läßt sich eine cytosolische Lokalisation beobachten, die sich bis zu membran-nahen Bereichen erstreckt. Dort kommt es in einigen Zellen zu einer Colokalisation mit NCAM.

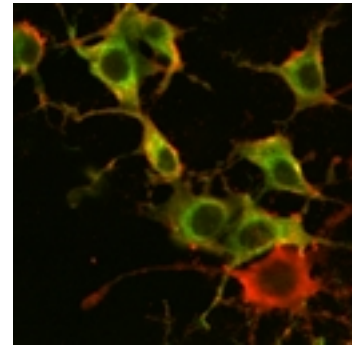
Auch ROK α befindet sich in Bild IV vor allem im Cytoplasma aber auch in Membrannähe, wo es in den gelb gefärbten Bereichen ebenfalls zu einer Colokalisation mit NCAM kommt. Es ist nicht erstaunlich, daß ROK α vor allem im Cytoplasma lokalisiert ist, da in NGF-stimulierten PC12-Zellen ROK α inaktiviert wird und von der Plasmamembran ins Cytoplasma transloziert [Nusser et al., 2002]. Auch die Enzyme PYK2 und PLC γ sind im gesamten Cytoplasma der Zelle verteilt. Ebenso konnte für VCP eine cytoplasmatische Lokalisation beobachtet werden (hier nicht gezeigt).



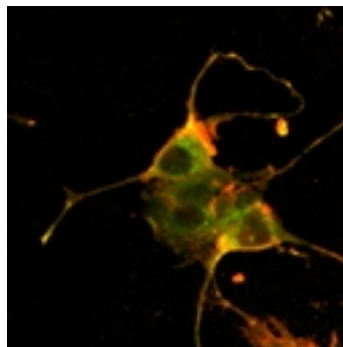
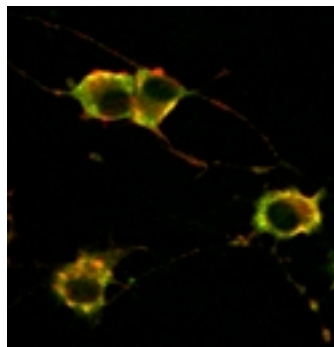
I. LANP: rot; NCAM: grün



II. TOAD-64: rot, NCAM: grün



III. Syndapin: grün; NCAM: rot

IV: ROK α : grün; NCAM: rot

V: PYK2: grün; NCAM: rot

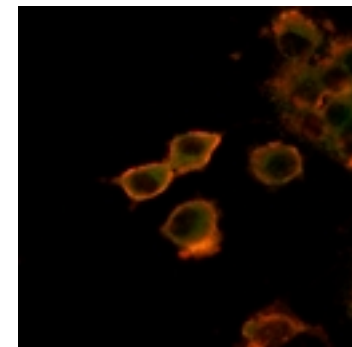
VI: PLC γ : grün; NCAM: rot

Abb. 35: Lokalisation von NCAM und seinen potentiellen Bindungspartnern in PC12-Zellen durch Immunfluoreszenz (Confokale Mikroskopie).

PC12-Zellen wurden für 2d auf Kollagen IV in Anwesenheit von 250 ng/mL NGF inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen LANP, TOAD-64, Syndapin, ROK α , PYK2, PLC γ und NCAM markiert. Monoklonale Antikörper wurden mit FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörpern grün angefärbt. Polyklonale Antikörper wurden mit Rhodamin-TRIC-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörpern rot angefärbt. NCAM wurde entweder mit dem mAk 5B8 oder mit dem polyklonalen NCAM-Antikörper detektiert. I.: LANP: rot; NCAM:grün; II. TOAD-64: rot; NCAM: grün; III: Syndapin: grün; NCAM: rot; IV: ROK α : grün; NCAM: rot; V: PYK2: grün; NCAM: rot; VI: PLC γ : grün; NCAM: rot.

3.3.9. Untersuchungen zum Einfluß der ROK α -Inhibition auf das Neuritenwachstum von PC12-Zellen

Die RhoA-bindende Kinase ROK α konnte in dieser Arbeit als potentieller Bindungspartner von NCAM 180 identifiziert werden, nicht aber von NCAM 140. ROK α spielt eine wichtige Rolle in der Organisation des Cytoskeletts. Es ist bekannt, daß aktives RhoA und sein Downstream-Effektor, die RhoA-bindende Kinase ROK α , in neuronalen Zellen ein Kollabieren der Wachstumskegel, ein Zurückziehen der Neuriten und ein Abrunden der Zellen induziert [Kozma et al., 1997]. Eine Möglichkeit, Rho-abhängige Prozesse zu blockieren, besteht in der Inaktivierung von Rhos Downstream-Effektor ROK α mit Hilfe des spezifischen ROK α -Inhibitors Y27632, ein Pyrimidin-Derivat [Uehata et al., 1997]. Zur Bestimmung der optimalen Inhibitor-Konzentration wurden in einem Vorversuch naive und NGF-stimulierte PC12-Zellen ([NGF] = 3 ng/mL) mit Inhibitorkonzentrationen zwischen 10 μ M und 1mM inkubiert. Bei einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M Y27632 war deutlich eine starke Neuritenbildung bei naiven PC12-Zellen und eine enorme Neuritenverlängerung der NGF-behandelten PC12-Zellen zu erkennen (Abb. 36), so daß die folgenden Untersuchungen mit dieser Inhibitorkonzentration durchgeführt wurden.

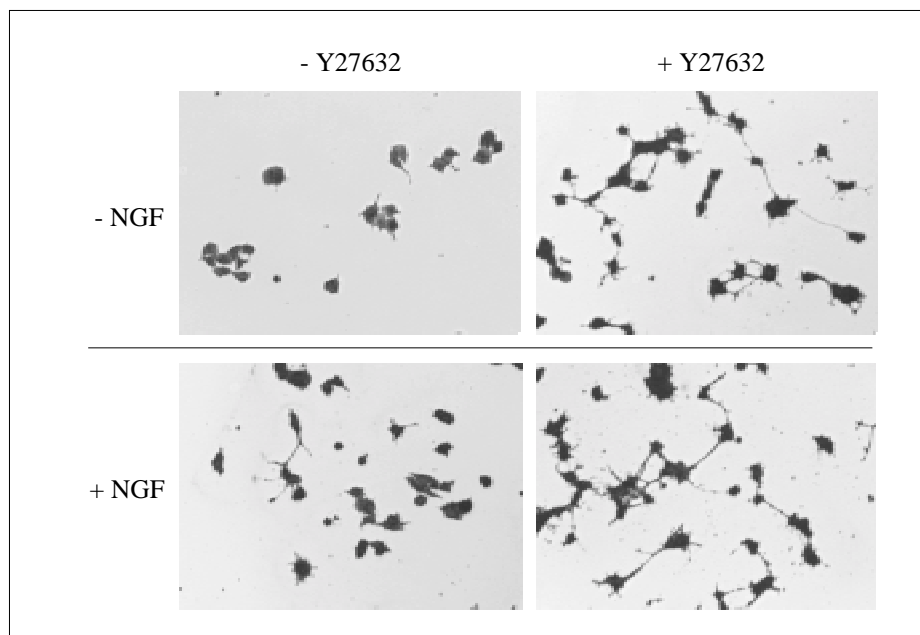


Abb. 36: Y27632-induzierte Neuritenstimulation bei naiven und NGF-stimulierten PC12-Zellen.

Naive oder mit 3 ng/mL NGF-stimulierte PC12-Zellen wurden ohne oder mit 100 μ M spezifischen ROK α -Inhibitor Y27632 für 2d auf Kollagen IV kultiviert. Nach Fixierung wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Die Ausschnitte wurden bei einer 160-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Um einen möglichen Einfluß der ROK α -Inhibition auf das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum zu untersuchen, wurde das Neuritenwachstum von NCAM-stimulierten PC12-Zellen mit und ohne Y27632-Inhibitor mit dem Neuritenwachstum von NCAM-unbehandelten PC12-Zellen verglichen, wobei in allen Ansätzen 3 ng/mL NGF anwesend war. In Abb. 37 sind unterschiedlich behandelte PC12-Zellen gezeigt.

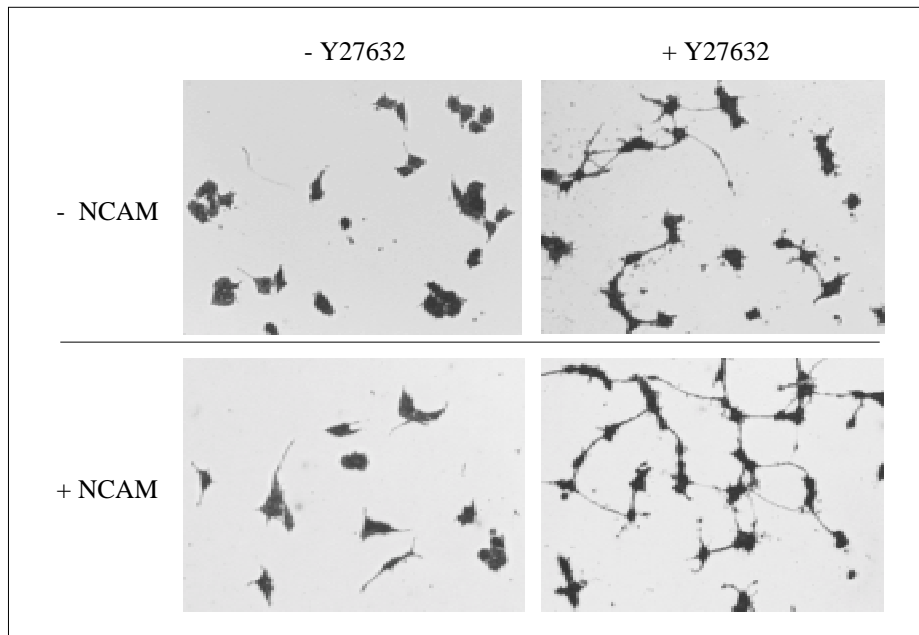


Abb. 37: Stimulation des Neuritenwachstums durch Y27632 bei NCAM-behandelten und unbehandelten PC12-Zellen.

3 ng/mL NGF-stimulierte PC12-Zellen wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von 2,5 μ g/mL NCAM ohne oder mit 100 μ M spezifischen ROK α -Inhibitor Y27632 für 2d auf Kollagen IV kultiviert, anschließend fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Die Ausschnitte wurden bei einer 160-fachen Vergrößerung aufgenommen.

In NCAM-unbehandelten Zellen wird das Neuritenwachstum durch Y27632 um ein 3,9-faches stimuliert (Abb. 38A). NCAM stimuliert das Neuritenwachstum in Abwesenheit des Inhibitors um 78%, was mit den bereits beschriebenen Ergebnissen zum NCAM-vermittelten Neuritenwachstum übereinstimmt. Addiert man das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum (178%) zu dem NCAM-unabhängigen-Y27632-stimulierten Neuritenwachstum (491%), setzt die Summe auf 100% und vergleicht sie mit dem Neuritenwachstum der mit NCAM und Y27632-stimulierten PC12-Zellen, so erhält man eine Steigerung der Neuritenlänge um 23%. Betrachtet man die als Fehlerbalken dargestellte Standardabweichung, so erkennt man, daß es sich hierbei nicht um eine signifikante synergistische Neuritenverlängerung zu handeln scheint. Da allerdings der Inhibitor allein wesentlich stärker das Neuritenwachstum stimuliert (391%) als lösliches NCAM allein (78%) und die Standardabweichungen recht hoch sind, ist es schwer, einen durchaus möglichen signifikanten synergistischen Effekt nachzuweisen.

Beim Vergleich der prozentualen Y27632-induzierten Neuritenlängenzunahme der NCAM-behandelten Zellen (362%) mit der Neuritenlängenzunahme der NCAM-unbehandelten PC12-Zellen (391%) kann kein Unterschied beobachtet werden (Abb. 38B).

Der Versuch zeigt, daß lösliches NCAM und die ROK α -Inhibition unabhängig voneinander Neuritenwachstum in PC12-Zellen stimulieren, wobei ein signifikant synergistischer Effekt nicht auszuschließen ist.

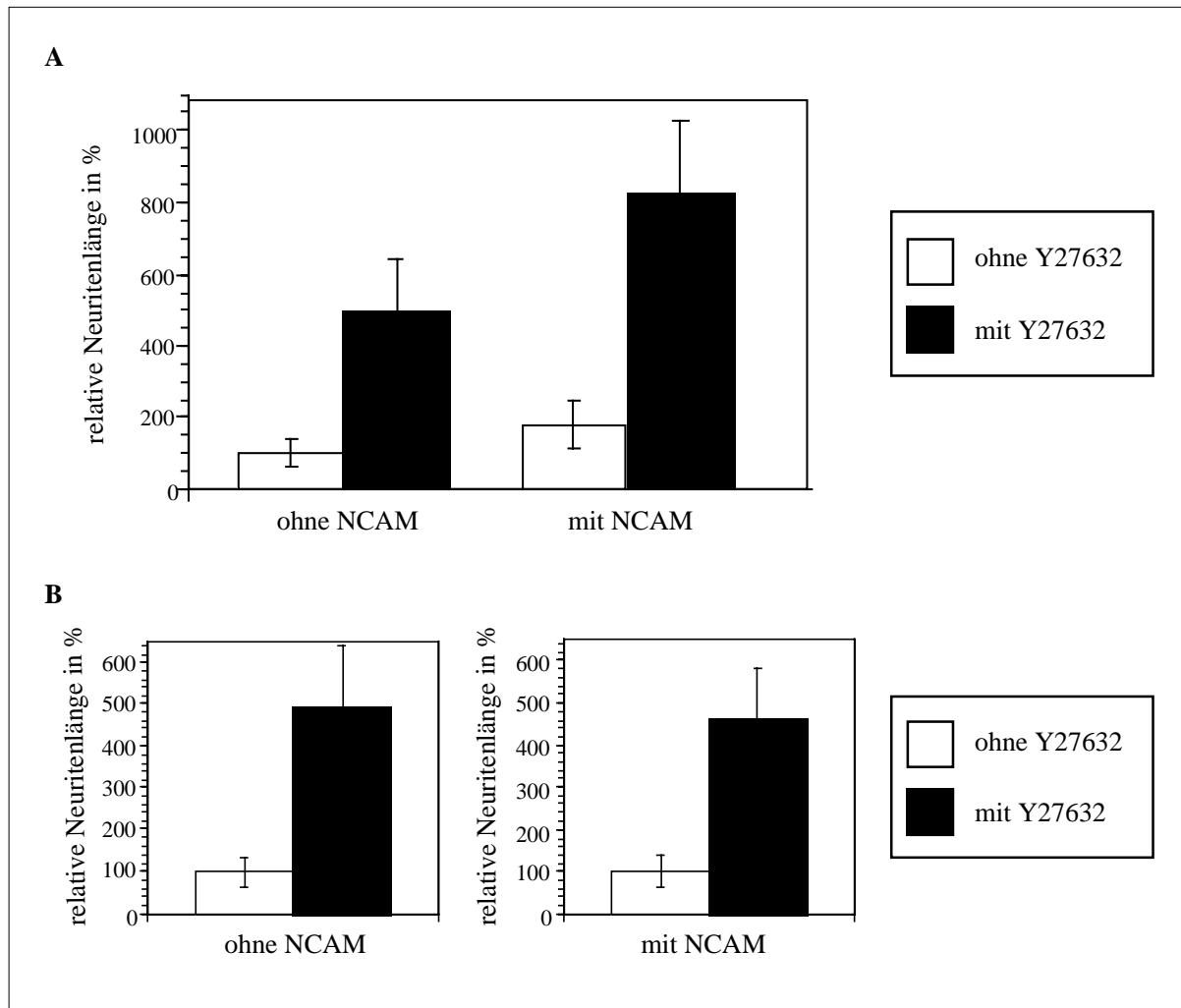


Abb. 38: Quantifizierung des Neuritenwachstums von NCAM-behandelten und NCAM-unbehandelten PC12-Zellen in Anwesenheit oder Abwesenheit des ROK α -Inhibitors Y27632.

PC12-Zellen wurden ohne oder mit NCAM (2,5 μ g/mL) behandelt und ohne (weiße Balken) oder mit ROK α -Inhibitor Y27632 (100 μ M) (schwarze Balken) für 2 Tage auf Kollagen IV in Anwesenheit von 3 ng/mL NGF kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Neuritenlängen quantifiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der relativen Neuritenlänge/Zelle in % \pm Standardabweichung. Für die Mittelwertberechnung wurden 15 Bilder ausgewertet, die mindestens 40 Zellen enthielten.

A: Der Mittelwert der nicht mit NCAM-behandelten Zellen wurde auf 100 % gesetzt.

B: Die Mittelwerte der nicht mit NCAM-behandelten und der mit NCAM-behandelten Zellen wurden jeweils auf 100% gesetzt.

Auch bei cytNCAM 140- und cytNCAM 180-transfizierten PC12-Zellen konnte kein Unterschied in der Neuritenverlängerung durch Y27632-Stimulation im Vergleich zu vektor-transfizierten Zellen gezeigt werden (nicht abgebildet).

3.3.10. Expression der potentiellen Bindungspartner in PC12-Zellen nach Stimulation mit NGF und/oder löslichen NCAM

Möglicherweise kann eine extrazelluläre Stimulation von NCAM die Genexpression und Proteinexpression einiger Proteine beeinflussen. In PC12-Zellen sollte untersucht werden, ob die Stimulation mit löslichen NCAM und/oder NGF die Expression der potentiellen Interaktionspartner von NCAM verändert. PC12-Zellen wurden dafür für 2 Tage auf Kollagen IV mit 2,5 µg/ml NCAM oder 100 ng/mL NGF oder beiden Zusätzen zusammen kultiviert. Die Proteine der PC12-Zellsolubilisate wurden in gleichen Mengen im SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. β -Actin, dessen Expression bei den verschiedenen behandelten Zellen konstant sein sollte, wurde als Kontrolle für die gleiche Proteinnengenauftragung herangezogen. In den Westernblot-Analysen (Abb. 39) ist zu erkennen, daß die Expression von NCAM selber nicht durch die Stimulation durch extrazelluläres NCAM beeinflusst wird. Die Stimulation der PC12-Zellen mit NGF dagegen reduziert die NCAM-Expression, vor allem die der NCAM 180-Isoform. TOAD-64 wird in unstimulierten PC12-Zellen nur sehr schwach exprimiert und läßt sich durch NGF-Stimulation hochregulieren, während eine NCAM-Stimulation die TOAD-64-Expression nicht beeinflusst. Die Expressionsstärke von VCP, Syndapin, LANP und ROK α blieb nach Stimulation durch NCAM oder NGF unbeeinflusst.

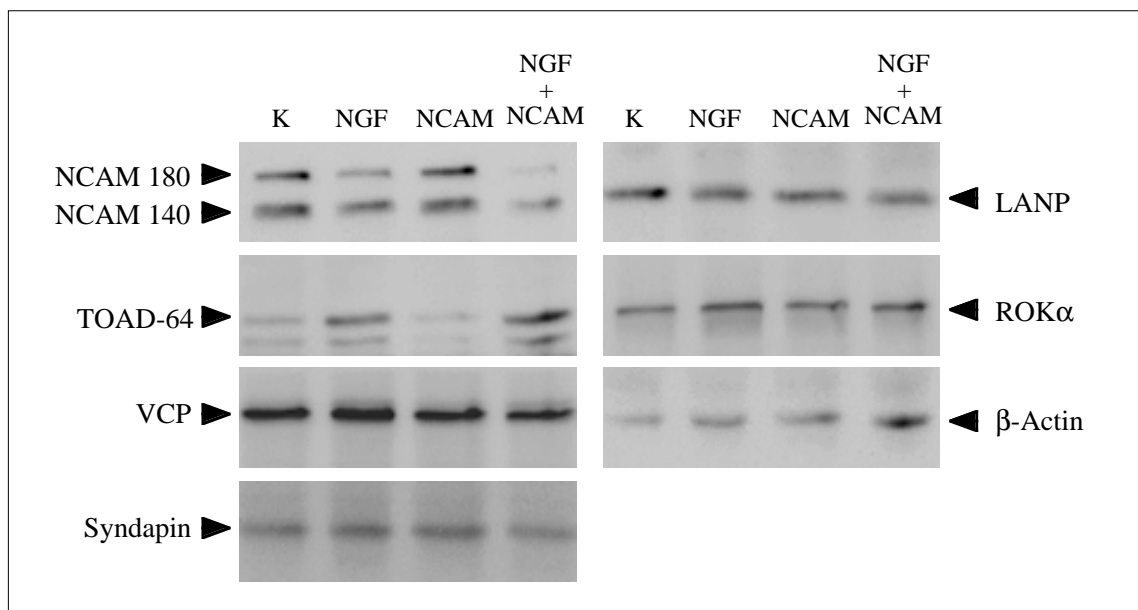


Abb. 39: Vergleich der Proteinexpression in naiven, NGF-stimulierten, NCAM-stimulierten und NGF/NCAM-stimulierten PC12-Zellen.

PC12-Zellen wurden für 2 Tage auf Kollagen IV ohne Zusatz (K), mit NGF (100 ng/mL), mit NCAM (2,5 µg/mL) oder NGF und NCAM kultiviert. Je 30 µg Protein der PC12-Solubilisate wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern.