

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle der cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 im NCAM-vermittelten Neuritenwachstum untersucht.

Dazu wurden die cytosolischen NCAM-Domänen der Ratte in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und transient in PC12-Zellen transfiziert.

Die cytoplasmatischen Domänen von NCAM 140 und NCAM 180 ließen sich membranassoziiert in PC12-Zellen exprimieren, ohne die Expression des endogenen NCAMs zu beeinflussen. TMcytNCAM 140-überexprimierende PC12-Zellen zeigten eine Reduktion des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums um 33% und eine geringfügige aber signifikante Reduktion des NCAM-unabhängigen Neuritenwachstums. TMcytNCAM 180-überexprimierende PC12-Zellen dagegen zeigten ein um 38% erhöhtes NCAM-vermitteltes Neuritenwachstum gegenüber den Kontrollzellen, während das NCAM-unabhängige Neuritenwachstum unbeeinträchtigt blieb.

Zusammenfassend ließ sich bestätigen, daß die cytosolische Domäne von NCAM 140 das Neuritenwachstum stimuliert. Dagegen konnte erstmals gezeigt werden, daß die cytosolische Domäne von NCAM 180 keinen stimulatorischen Effekt, sondern aufgrund seiner starken Assoziation mit dem Cytoskelett und seiner Zellform-stabilisierenden Eigenschaft das Neuritenwachstum hemmt, also einen anti-neuritogenen Effekt ausübt.

Weiterhin konnten in dieser Arbeit neue cytoplasmatische Interaktionspartner von NCAM 140 und NCAM 180 durch Ligandenaffinitätschromatographie, Immunpräzipitation und Pull-down-Experimenten identifiziert werden. Die cytosolischen Domänen von NCAM wurden als rekombinante Proteine mit einem poly-Histidin-Tag in *E.coli* überexprimiert, über Immunitätschromatographie gereinigt und nach Kopplung an Cyanbromid-aktivierter Sepharose für die Ligandenaffinitätschromatographie verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Ligandensuche dienten verschiedene Proteinfractionen des Rattenhirns. Für NCAM 180 konnte in den Eluatn der Ligandenaffinitätschromatographie die Cytoskelettproteine α -Tubulin, β -Tubulin, MAP 1A, β -Actin, Spectrin, α -Actinin und Tropomyosin, die Enzyme ROK α , PLC γ , PYK2, PP1 und PP2A sowie die Proteine LANP, TOAD-64, Syndapin, VCP und p130Cas mittels MALDI-TOF-MS / Peptide Mass Fingerprinting und/oder Westernblot-Analysen identifiziert werden. Für NCAM 140 konnte mittels Westernblot-Analyse die Cytoskelettproteine α - und β -Tubulin, α -Actinin und Spectrin, die Proteine LANP, Syndapin, VCP und p130Cas und die Enzyme PLC γ , PYK2, PP1 und PP2A und die MAPK ERK2 als potentielle Bindungspartner nachgewiesen werden.

Spectrin, PLC γ und ROK α ließen sich zusammen mit NCAM aus Maushirn präzipitieren, womit für diese Proteine eine Interaktion mit NCAM bestätigt werden konnte.

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. Weiterhin zeigte sich im LANP-Pull-down mit Rattenhirn, daß LANP auch mit Syndapin, einem potentiellen Bindungspartner von NCAM, interagiert.

In Pull-down-Experimenten mit verschiedenen PLC γ -Konstrukten konnte eine Assoziation von NCAM 140 und NCAM 180 mit der PH-Domäne und der C-terminalen SH2-Domäne von PLC γ nachgewiesen werden. Insbesondere die C-terminale SH2-Domäne bevorzugt die Interaktion mit NCAM 140 gegenüber NCAM 180.

Die Inhibition der ROK α mit dem ROK α -spezifischen Inhibitor Y27632 (100 μ M) stimuliert das Neuritenwachstum von PC12-Zellen um ein 3,9-faches und von NCAM-stimulierten PC12-Zellen um ein 3,6-faches. Diese Daten zeigen, daß die durch NCAM-NCAM-Bindung induzierte Neuritenstimulation und die durch ROK α -Inhibition vermittelte Neuritenstimulation unabhängig voneinander erfolgen.

Summary

The role of the cytoplasmic domains of the neural cell adhesion molecule NCAM in neurite outgrowth and identification of novel intracellular binding partners

In this thesis, the role of the cytoplasmic domains of NCAM 140 and NCAM 180 in NCAM-mediated neurite outgrowth was investigated.

The cDNA containing the transmembrane and cytoplasmic domains of rat NCAM 140 and NCAM 180 were cloned into the mammalian expression vector pcDNA3.1 and transiently expressed as membrane associated proteins in PC12 cells without affecting the endogenous NCAM expression.

In TMcytNCAM 140-transfected cells the NCAM-mediated neurite outgrowth was decreased by 33%. Also the NCAM-independent neurite outgrowth was slightly but significantly reduced. Interestingly, the NCAM-mediated neurite outgrowth of TMcytNCAM 180-transfected cells was increased by 38%, whereas the NCAM-independent neurite outgrowth was not affected. This leads to the conclusion, that the cytoplasmic domain of NCAM 140 promotes neurite outgrowth. On the other hand it could be shown for the first time, that the cytoplasmic domain of NCAM 180 not only does not stimulate neurite outgrowth but also interferes with the NCAM 140-mediated neurite outgrowth as a result of its strong association with the cytoskeleton and its cell-shape stabilizing feature.

In a second experimental approach, novel intracellular binding partners of NCAM 140 and NCAM 180 could be identified by ligand-affinity chromatography, coimmuno precipitation and pull-down studies. Both cytoplasmic domains were overexpressed as his-tagged fusion proteins in *E.coli*, purified by immun-affinity chromatography and used for ligand-affinity chromatography. Cytosolic, membrane and cytoskeletal enriched protein fractions from rat brain were used for the ligand searching. By peptide mass fingerprinting and/or western blot analysis the cytoskeletal proteins α - and β -tubulin, α -actinin and spectrin, the enzymes PLC γ , PYK2, PP1 and PP2A and the proteins LANP, syndapin, VCP and p130Cas could be identified as binding partners for both, NCAM 140 and NCAM 180. In addition NCAM 180 and not NCAM 140 binds to the microtubule associated protein MAP 1A, β -actin and tropomyosin. Further on NCAM 180 interacts with the rhoA binding kinase ROK α and TOAD-64. In contrast the MAPK ERK2 preferentially binds to NCAM 140.

Spectrin, PLC γ and ROK α could be coimmuno precipitated with NCAM from mouse brain, confirming the interactions with NCAM for these proteins. Furthermore a direct association of LANP with both transmembrane isoforms of NCAM could be demonstrated by pull-down experiments using LANP (pp32) as a GST-fusion protein and his-tagged-fusion proteins of cytNCAM 140 and cytNCAM 180. LANP was also able to pull-down syndapin from a cytoskeletal protein fraction of rat brain.

Using different PLC γ 1 constructs comprising different parts of PLC γ 1, an interaction of the PH domain and the C-terminal SH2 domain with NCAM 140 and NCAM 180 could be

proved by pull-down experiments. In particular, the C-terminal SH2 domain preferentially binds to NCAM 140.

In cell culture assays with PC12 cells it could be demonstrated that the ROK α inhibitor Y27632 (100 μ M) stimulates neurite outgrowth by nearly 400%. Also the neurite outgrowth of NCAM-stimulated PC12 cells was increased in a similiar extent by the ROK α inhibitor, so it could be concluded that both stimuli of neurite outgrowth act independently from each other.