

Anhang**Proteinsequenzen****Signalpeptid / TMcytNCAM 140**

MELASARLLR GQIPWRGLLL TASLLTYWSP LTTADIGAIV GILIVIFVLL
 LVVMDITCYF LNKCGLLMCI AVNLCGKAGP GAKGKMEEG KAAFSDKDESK
 EPIVEVRTEE ERTPNHDGGK HTEPNETTPL TEPELKGPE TKSEPESEA
 KPAPTEVKTV PNEATQTKEN ESKA

(Rot): Signalpeptid von CEACAM, (Grün): Transmembrandomäne von NCAM, (Schwarz):
 cytosolische Domäne von NCAM 140

Physikalisch-chemische Daten:

TMcytNCAM 140: Molekulare Masse: 14,86 kD; pI : 4,7

Signalpeptid / TMcytNCAM 180 (Rattenhirn)*

MELASARLLR GQIPWRGLLL TASLLTYWSP LTTADIGAIV GILIVIFVLL
 LVVMDITCYF LNKCGLLMCI AVNLCGKAGP GAKGKMEEG KAAFSDKDESK
 EPIVEVRTEE ERTPNHDGGK HTEPNETTPL TEPELPADTT ATVEDMLPSV
 TTVTNSDTI TETFATAQNS PTSETTTLTS SIAPPATTVP ESNSVPAGQA
 TPSKGVTASS SSPPASVPKV APLVDLSDTP TSAPSANNLS STVLANQGAV
 LSPSTPASAG ETSKVPAISK PSPTPTPTPA GAASPLAAVA APATEAPQAK
 QEAPSTKGPD PEXTQPGTGK NPTEAATAPA SPKSKAPSVS TTNPSQGEDL
 KMDEGNFKTP DIDLAKDVFA ALGSPAPATG ASGQASELAP STADSAVPPA
 PAKTEKGPVE TKSEPESEA KPAPTEVKTV PNEATQTKEN ESKA

(Rot): Signalpeptid von CEACAM, (Grün): Transmembrandomäne von NCAM,
 (Blau): cytNCAM 180-spezifisches Insert kodiert von Exon 18; (Schwarz): Sequenz, die in
 cyt NCAM 140 und cytNCAM 180 vorkommt

(*): Aminosäuresequenz von cytNCAM 180 des Rattenhirns, wie sie aus den cDNA-
 Sequenzierungsergebnissen dieser Arbeit abgeleitet werden konnte.

Physikalisch-chemische Daten

TMcytNCAM 180: Molekulare Masse: 40,98 kD; pI :4,5

Aminosäuresequenz von cyt NCAM 140 mit His-tag-Fusionsanteil:

Fusionsanteil

MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDRWILDITCY FLNKCGLLMC
 IAVNLCGKAG PGAKGKMEE GKAAFSKDES KEPIVEVRTE EERTPNHDGG
 KHTEPNETTP LTEPELKGVP ETKSEPQESE AKPAPTEVKT VPNEATQTK
 NESKA

(Unterstrichen): Fusionsanteil mit His₆

Physikalisch-chemische Daten:

His-Tag-fusioniertes cytNCAM 140: Molekulare Masse: 17,2 kD; pI: 4,6

cytNCAM 140: Molekulare Masse: 13 kD; pI: 4,7

Fusionsanteil: Molekulare Masse: 4,2 kD; pI : 8,1

Aminosäuresequenz von cyt NCAM 180 (Rattenhirn)* mit His-tag-Fusionsanteil

Fusionsanteil

MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDRWILDITC YFLNKCGLLM
 CIAVNLCGKA GPGAKGKDME EGKAAFSKDE SKEPIVEVRT EEERTPNHDG
 GKHTEPNETT PLTEPELPAD TTATVEDMLP SVTTVTTNSD TITETFATAQ
 NSPTSETTTL TSSIAPPATT VPESNSVPAG QATPSKGVTA SSSSPPASVP
 KVAPLVDLSD TPTSAPSANN LSSTVLANQG AVLSPSTPAS AGETSKVPAT
 SKPSPTPTPT PAGAASPLAA VAAPATEAPQ AKQEAPSTKG PDPEXTQPGT
 GKNPTEAATA PASPKSKAPS VSTTNPSQGE DLKMDEGNFK TPDIDLAKDV
 FAALGSPAPA TGASGQASEL APSTADSAVP PAPAKTEKGP VETKSEPQES
 EAKPAPTEVK TVPNEATQTK ENESKA

(Unterstrichen): Fusionsanteil mit His₆

(*): Aminosäuresequenz von cytNCAM 180 des Rattenhirns, wie sie aus den cDNA-Sequenzierungsergebnissen dieser Arbeit abgeleitet werden konnte.

Physikalisch-chemische Daten:

His-Tag-fusioniertes cytNCAM 180: Molekulare Masse: 43,3 kD; pI : 4,5

cytNCAM 180: Molekulare Masse: 39,1 kD; pI : 4,5

Fusionsanteil: Molekulare Masse: 4,2 kD; pI : 8,1

Zusatzprojekt:**Stimulierung von neuronalen Zellen durch den synthetischen Sialinsäurevorläufer N-Propanoylmannosamin (ManNProp)**

Die Sialylierung von Glykoproteinen und Glykolipiden spielt bei der Entwicklung und während regenerativer Prozesse eine wichtige Rolle. Sialinsäuren sind terminale saure Monosaccharide von komplexen N-Glykanen und vielen O-Glykanen von Glykoproteinen und Glykolipiden [Varki, 1993]. Sie bestehen aus 9 C-Atomen mit einer Carboxylgruppe an der C-1-Position und einer Aminogruppe an der C-5-Position. Etwa 40 Derivate der Neuraminsäure (unsubstituierte Form) sind bekannt, von denen alle bis auf eine an der Aminogruppe acyliert sind.

Sialinsäuren sind in viele biologische Prozesse involviert, wie der Migration und Proliferation von Zellen während zelladhäsiver Prozesse. Z.B. dienen sie als spezifische Erkennungsstrukturen für Selektine während des Lymphocytenhomings.

Der physiologische Vorläufer der Sialinsäurebiosynthese ist der Aminozucker N-Acetylmannosamin (ManNAc) (Schema 1).

Die Struktur und die biologische Funktion der Sialinsäuren kann durch Applikation von synthetischen Vorläuferzuckern, die z.B. in der Länge der Acylseitenkette variieren (N-Acylmannosamine), modifiziert werden. Diese Vorgehensweise zur Erforschung der Funktion von Sialinsäuren, wurde in unserer Arbeitsgruppe in den letzten 10 Jahren entwickelt.

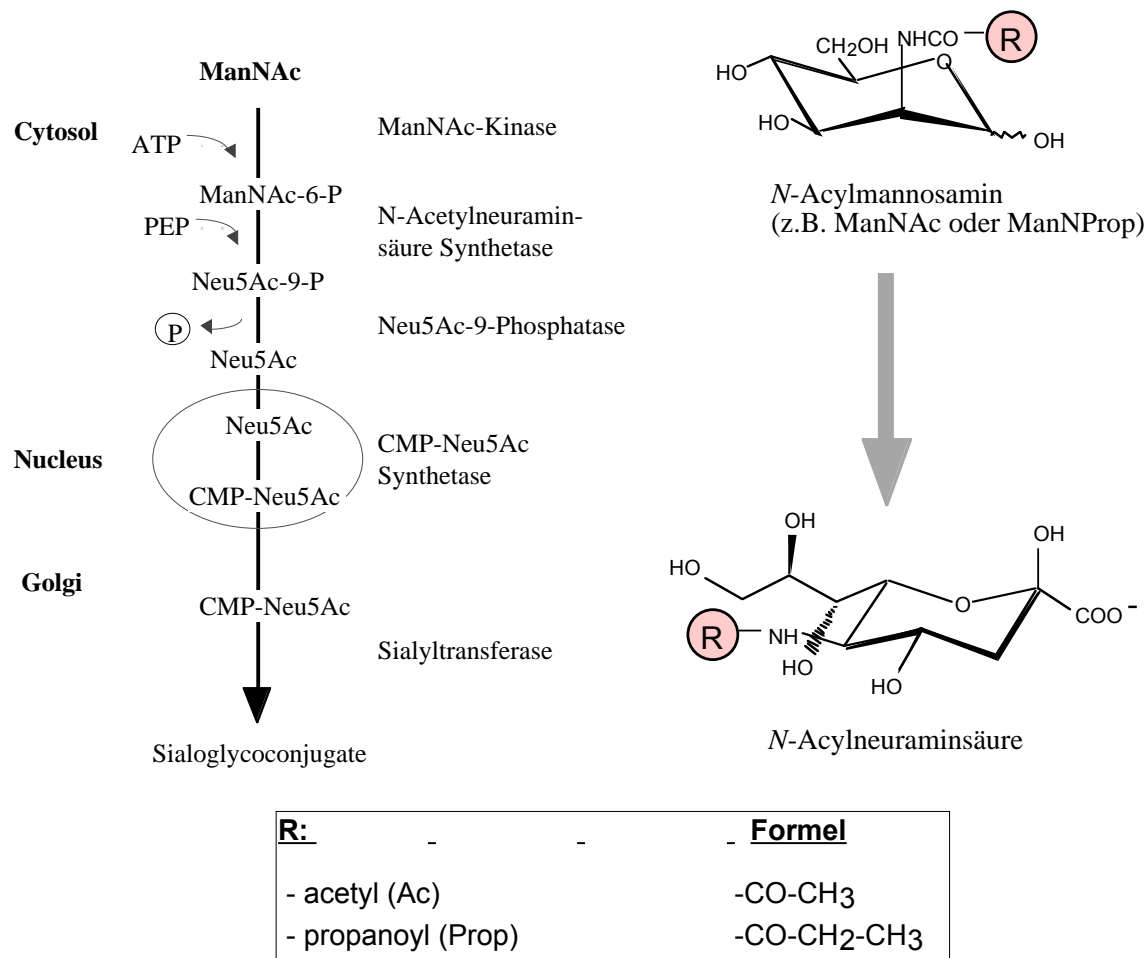
Die meisten Untersuchungen in unserer Abteilung sind mit dem synthetischen Vorläufer N-Propanoylmannosamin (ManNProp) durchgeführt worden, der im Gegensatz zum physiologischen Vorläufer eine zusätzliche Methylengruppe in der N-Acylseitenkette besitzt.

ManNProp wird von Zellen *in vivo* und *in vitro* toleriert, wird wie ManNAc metabolisiert und als N-Propanoylneuraminsäure (Neu5Prop) in Glykoproteinen der Zelloberfläche eingebaut [Kayser et al., 1992] [Keppler et al., 1995] [Schmidt et al., 1998] [Keppler et al., 2001].

Der Ersatz der natürlichen N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) durch N-Propanoylneuraminsäure ist gewebespezifisch. In der Leber ist der Austausch mit 50% am größten, im Gehirn mit 23% am niedrigsten. Der Gesamtgehalt von Sialinsäuren wird nicht beeinflusst. Veränderte Zellfunktionen nach ManNProp-Gabe ist bei einigen Zelllinien bereits untersucht worden. Z.B. kann durch ManNProp-Gabe die Proliferation von T-Lymphozyten stimuliert werden und die IL2-Sekretion ist gesteigert. Die Infektion von Lymphomzellen durch Viren, die Sialinsäuren als Erkennungsstruktur benötigen, wie z.B. Influenzaviren oder Polyomaviren, ist stark reduziert [Keppler et al., 1998].

Möglicherweise könnte ManNProp eine therapeutisch-nützliche Substanz für die Stimulierung regenerativer Prozesse des zentralen Nervensystems sein.

In diesem Projekt sollten die Effekte von ManNProp auf das Neuritenwachstum von NGF-stimulierten PC12-Zellen untersucht werden.



Schema 1: Biosyntheseweg von physiologischen und biochemisch modifizierten Sialinsäurevorläufern.

Stimulation des Neuritenwachstums von PC12-Zellen durch ManNProp

PC12-Zellen sind Nebennierenmarkszellen der Ratten und differenzieren nach Stimulation mit dem Nervenwachstumsfaktor NGF zu einem neuronalem Phänotyp, der sich durch Ausbildung von Neuriten bemerkbar macht. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Stimulation mit ManNProp allein keine neuronale Differenzierung bei PC12-Zellen bewirken kann. Die NGF-Stimulation war für die Experimente also eine notwendige Bedingung.

PC12-Zellen wurden in der Gegenwart von suboptimalen Konzentrationen von NGF (10 ng/mL) und unterschiedlichen Konzentrationen von ManNProp (0; 0,5; 5; 25 mM ManNProp) für drei Tage auf poly-L-Lysin, Kollagen I oder Laminin inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die unter den gleichen Bedingungen mit dem physiologischen Vorläufer ManNAc (5 und 25 mM) inkubiert wurden. Für die Auswertung wurden Ausschnitte bei einer 100-fachen Vergrößerung fotografiert. Die computergestützte Vermessung der Neuritenlängen wurde von der Firma ITC-GmbH mit dem Computerprogramm CAPA (Computer-Assisted-Process-Analysis) durchgeführt.

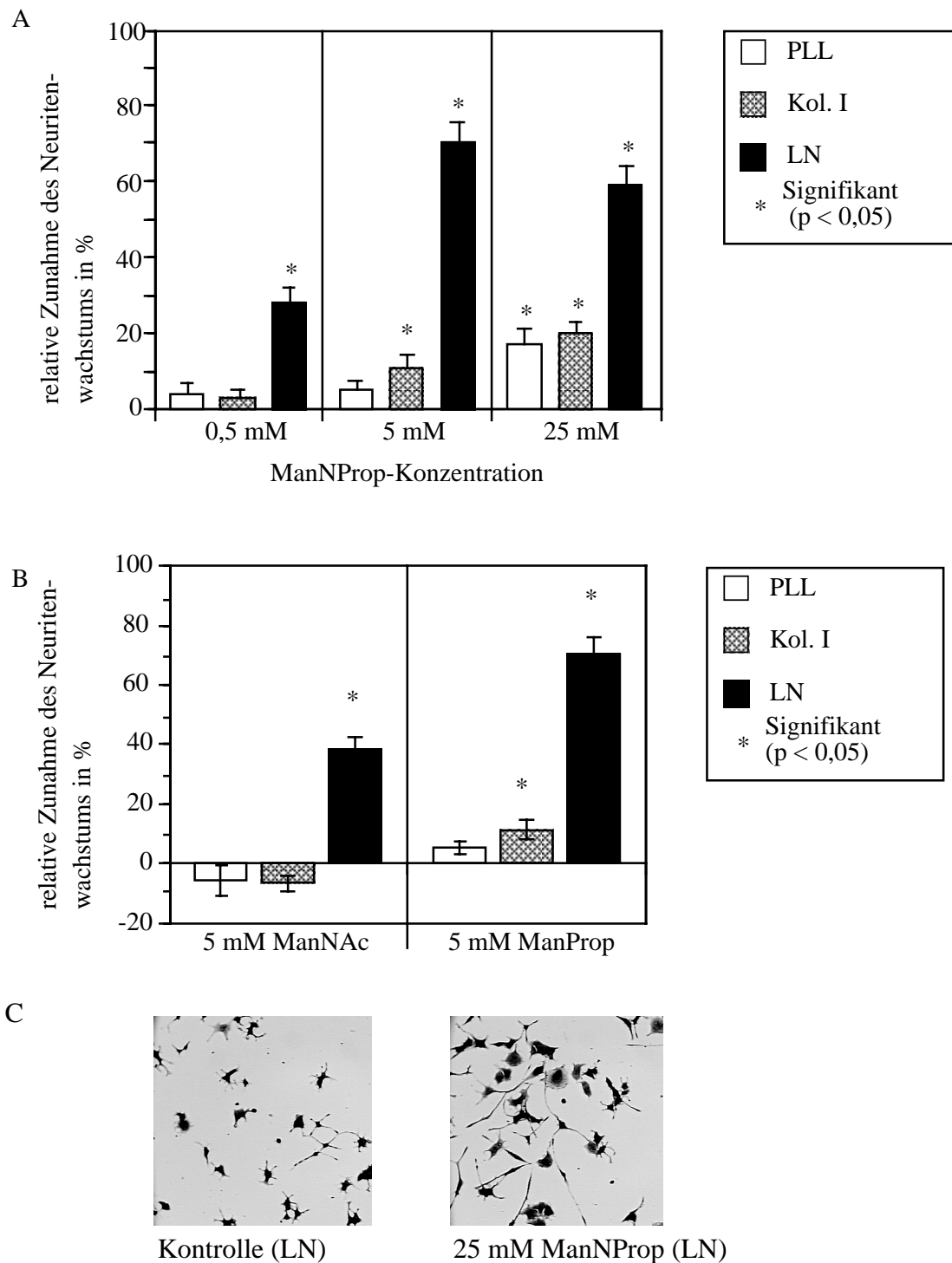


Abb. 1: Stimulation des Neuritenwachstums von PC12-Zellen.

A: PC12-Zellen wurden in der Gegenwart von 10 ng/mL NGF und 0,5; 5 oder 25 mM ManNProp auf Poly-L-Lysin (PLL), Kollagen I (Kol I) oder Laminin (LN) kultiviert. Nach drei Tagen wurde das Neuritenwachstum quantifiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Neuritenlängenzunahme gegenüber der Kontrolle \pm Standardabweichung von 25 ausgewerteten Bildern, die jeweils mindestens 25 Zellen enthielten. **B:** PC12-Zellen wurden in der Gegenwart von 10 ng/mL NGF und 5 mM ManNac oder 5 mM ManNProp auf Poly-L-Lysin (PLL), Kollagen I (Kol I) oder Laminin (LN) kultiviert. Nach drei Tagen wurde das Neuritenwachstum quantifiziert. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte der Neuritenlängenzunahme gegenüber der Kontrolle \pm Standardabweichung von 25 ausgewerteten Bildern, die jeweils mindestens 25 Zellen enthielten.

C: Repräsentative Bilder von PC12-Zellen, die auf Laminin ohne oder mit 5 mM ManNProp kultiviert wurden.

ManNProp hat eine konzentrationsabhängige und Matrix-abhängige stimulierende Wirkung auf das Neuritenwachstum in PC12-Zellen. Auf Laminin konnte die stärkste Neuritenstimulation durch ManNProp beobachtet werden.

In der Gegenwart von 0,5 mM ManNProp haben die auf Laminin wachsenden PC12-Zellen 30% längere Neuriten als unbehandelte Zellen. Dagegen zeigen die auf Poly-L-Lysin oder Kollagen I kultivierten PC12-Zellen mit 0,5 mM ManNProp keine Neuritenverlängerung .

Bei der höheren ManNProp-Konzentration von 5 mM zeigen die auf Laminin wachsenden PC12-Zellen einen Neuritenlängenzuwachs von 69%. Auch die auf Kollagen I kultivierten PC12-Zellen werden bei dieser Konzentration geringfügig zum Neuritenwachstum stimuliert (14%), während die auf PLL wachsenden Zellen unbeeinflusst bleiben. In der Gegenwart von 25 mM ManNProp wird das Neuritenwachstum auf Laminin um 61%, das auf Kollagen um 21% und das auf PLL um 18% stimuliert. In der Gegenwart des physiologischen Sialinsäurevorläufers ManNAc (5mM) werden auf Laminin-wachsende PC12-Zellen ebenfalls zum Neuritenwachstum stimuliert (38%), allerdings weniger stark als mit 5 mM ManNProp (69%). Die auf PLL oder Kollagen I kultivierten PC12-Zellen zeigen in der Gegenwart von 5 mM ManNAc keine Neuritenverlängerung.

Diese Versuche zeigen, daß der unphysiologische Sialinsäurevorläufer ManNProp und im geringeren Maße der physiologische Vorläufer ManNAc Neuritenwachstum in Abhängigkeit vom Matrixsubstrat stimulieren können. Die Matrixabhängigkeit der Neuritenstimulation durch ManNProp deuten darauf hin, daß die N-Acylseitenkette der Neuraminsäuren von Integrinen wesentlich an der Neuritenstimulation beteiligt ist. β 1-Integrine stimulieren Neuritenwachstum auf unterschiedlichen Matrixsubstraten [Ivins et al., 2000]. Die beobachteten Unterschiede des Neuritenwachstums auf den Matrixproteinen Laminin und Kollagen geben den Hinweis, daß wahrscheinlich die α -Integrinuntereinheiten unterschiedlich von ManNProp-Gabe beeinflusst werden. PC12-Zellen exprimieren vor allem α 1 β 1- und α 3 β 1-Integrin, beides Rezeptoren für Kollagen und Laminin [Ivins et al., 2000].

Literatur:

Ivins, J.K., Yurchenco, P.D. und Lander, A.D. (2000):

Regulation of neurite outgrowth by integrin activation.

J Neurosci, 20: 6551-60.

Kayser, H., Geilen, C.C., Paul, C., Zeitler, R. und Reutter, W. (1992):

Incorporation of N-acyl-2-amino-2-deoxy-hexoses into glycosphingolipids of the pheochromocytoma cell line PC 12.

FEBS Lett, 301: 137-40.

Keppler, O.T., Herrmann, M., von der Lieth, C.W., Stehling, P., Reutter, W. und Pawlita, M. (1998):

Elongation of the N-acyl side chain of sialic acids in MDCK II cells inhibits influenza A virus infection.

Biochem Biophys Res Commun, 253: 437-42.

Keppler, O.T., Horstkorte, R., Pawlita, M., Schmidt, C. und Reutter, W. (2001):

Biochemical engineering of the N-acyl side chain of sialic acid: biological implications.

Glycobiology, 11: 11R-18R.

Keppler, O.T., Stehling, P., Herrmann, M., Kayser, H., Grunow, D., Reutter, W. und Pawlita, M. (1995):

Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses.

J Biol Chem, 270: 1308-14.

Schmidt, C., Stehling, P., Schnitzer, J., Reutter, W. und Horstkorte, R. (1998):

Biochemical engineering of neural cell surfaces by the synthetic N-propanoyl-substituted neuraminic acid precursor.

J Biol Chem, 273: 19146-52.

Varki, A. (1993):

Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.

Glycobiology, 3: 97-130.

Veröffentlichungen:

Publikationen:

Büttner B., Kannicht C., Schmidt C., Löster C., Reutter W., Lee H.Y., Nöhring S. and Horstkorte R.

Biochemical Engineering of Cell Surface Sialic Acid Stimulates Axonal Growth.

The Journal of Neuroscience 22 (20) (2002): 8869-8875

Büttner B., Kannicht C., Reutter W. and Horstkorte R.

The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the

cytoskeleton. Biochemical and Biophysical Research Communications 210 (2003): 967-971

Büttner B., Reutter W. and Horstkorte R.

The cytoplasmic domain of NCAM 180 reduces NCAM-mediated neurite outgrowth.

The Journal of Neuroscience Research (im Druck)

Kurzartikel

Büttner B., Kannicht C. and Horstkorte R.

Stimulation of neurite outgrowth by biochemical engineering of cell surface sialic acids.

Fachbereich Humanmedizin, Universitätsklinikum Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin, Jahrbuch 2002

Büttner B., Kannicht C., Reutter W. and Horstkorte R.

Major components of the cytoskeleton are associated with the neural cell adhesion molecule.

Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Jahrbuch 2003

Poster:

Büttner B., Kannicht C., Schmidt C., Löster C., Reutter W., Lee H.Y., Nöhring S. and Horstkorte R.

Biochemical engineering of cell surface sialic acid by N-propanoylmannosamine stimulates axonal growth.

ELSO Meeting 2002, 29.6. – 3.7.2002, Nice, France

Büttner B., Kannicht C., Reutter W. and Horstkorte R.

Identification and characterisation of intracellular binding partners of the neural cell adhesion molecule NCAM.

Falk Workshop. Cell Adhesion Molecules in Health and Disease. January 23-24, 2003

Büttner B., Kannicht C., McDonald F., Reutter W. and Horstkorte R.

The cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule NCAM: its role in neurite outgrowth and identification of novel intracellular binding partners.

Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting 8.11.-12.11.2003, New Orleans, LA

Lebenslauf

Name	Bettina Büttner
geboren am	01.02.1972 in Berlin
Schulbildung	
1978 - 1984	Dietrich-Bonhoeffer-Grundschule, Berlin
1984 - 1991	Wald-Oberschule, Gymnasium, Berlin
Juni 1991	Abitur
Studium	
1991 - 1992	Studium der Agrarwissenschaften an der Technischen Universität Berlin
1993	GasthörerIn für Biologie an der Freien Universität Berlin
1994 - 2000	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
Mai 1999 - Februar 2000	Diplomarbeit mit dem Thema: „Charakterisierung von Liganden der polysialylierten Form des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM)“ (angefertigt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Reutter am Institut für Molekularbiologie und Biochemie, FU-Berlin)
seit Mai 2000	Promotion bei Prof. Dr. W. Reutter mit dem Thema: „Die Rolle der cytoplasmatischen Domänen des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls im Neuritenwachstum und Identifizierung neuer intrazellulärer Bindungspartner“
Mai 2000 - April 2002	Promotions-Stipendium der Schering Forschungsgesellschaft
seit Mai 2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Charité – Universitätsmedizin Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. W. Reutter

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Werner Reutter möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit, die großzügige Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Besonders herzlich danke ich Priv.-Doz. Dr. Rüdiger Horstkorte für die gute und nette Betreuung, Förderung und Motivation während der gesamten Zeit.

Bei Herrn Dr. Christoph Kannicht bedanke ich mich für die Einführung in die Massenspektroskopie, die Durchführung der zahlreichen MALDI-TOF-MS-Messungen und sein Engagement.

Herrn Prof. Dr. Fritz Rathjen danke ich für die fachbereichsinterne Begutachtung der Arbeit.

Vielen Dank an Kirstin Rau für die hilfsbereite Unterstützung beim Exprimieren und Reinigen der Fusionsproteine.

Für die gute Zusammenarbeit, fröhliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft danke ich Diana, Annette, Nadja, Wenke, Markus, Darius, Sabine, Ilona, Werner, Kerstin, Lothar Iwona, Claudia, Mario, Esther, Stephan, Verena, Jörg, Dörte, Pablo, Kaya, Tabea, den Octapharmern Anke, Claudine und Chris und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Reutter.

Nicht zu vergessen sind unsere vielen Aktivitäten außerhalb des Labors: Ausflüge, diverse Umzüge, Essen, Geburtstagsparties, Hochzeiten, Kicker-Turniere und „Laborgespräche“.

Diese Arbeit wurde von der Schering Forschungsgesellschaft gefördert.