

Der Coxsackie- und Adenovirus-Rezeptor im embryonalen Nervensystem: ein homophiles und heterophiles Zelladhäsionsmolekül

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christopher Patzke
aus Berlin

Dezember 2008

angefertigt in der Zeit von Juni 2004 bis Dezember 2008

am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch

in der Arbeitsgruppe Entwicklungsneurobiologie

unter der Leitung von Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

1. Gutachter: Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

2. Gutachter: Prof. Dr. Carmen Birchmeier-Kohler

Disputation am 19.3.2009

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Summary	1
2	Einleitung	3
2.1	Das zentrale Nervensystem	3
2.2	Bauplan des neuralen Netzes?	3
2.3	Zell-Adhäsionsmoleküle	4
2.4	Die extrazelluläre Matrix	6
2.5	Was ist interessant am Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor?	8
2.6	Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR)	10
2.6.1	Ein Rezeptor für zwei verschiedene Viren	10
2.6.2	Das CAR-Gen	11
2.6.3	CAR: ein Protein der IgSF mit zwei Ig-Domänen im extrazellulären Bereich	11
2.6.4	Der zytoplasmatische Bereich vom CAR enthält ein PDZ-Bindungsmotiv	13
2.6.5	CAR ist Teil einer Subgruppe der IgSF	14
2.6.6	CAR-Expression in Geweben und Zellen	14
2.7	Problemstellung	17
3	Material und Methoden	21
3.1	Material	21
3.1.1	Reagenzien	21
3.1.2	Kits	22
3.1.3	Puffer und Lösungen	22
3.1.4	Zellkulturmedium	25
3.1.5	Zellkulturmediumzusätze	25
3.1.6	Bakterienkulturmedien	26
3.1.7	Antibiotika / Antimycotika	26
3.1.8	Oligonukleotide	27
3.1.9	Vektoren	27
3.1.10	Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	28

Inhaltsverzeichnis

3.1.11	Eukaryontische Zelllinien	28
3.1.12	Antikörper	28
3.1.13	Enzyme	29
3.1.14	Mausstamm	30
3.1.15	Geräte	30
3.1.16	Kulturschalen für Primärkulturen	31
3.1.17	Säulenmatrices für Affinitätschromatographie	31
3.1.18	Software und Internet-Ressourcen	32
3.2	Methoden	32
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1.1	PCR	32
3.2.1.2	DNA-Fällung	33
3.2.1.3	Restriktionsspaltung von DNA	34
3.2.1.4	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	34
3.2.1.5	Kompetente Bakterien, Ligation und Transformation	34
3.2.1.6	Plasmid-DNA Präparation	34
3.2.1.7	Sequenzierung von DNA	35
3.2.2	Biochemische Methoden	35
3.2.2.1	SDS-PAGE und Western Blot	35
3.2.2.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
3.2.2.1.2	Western Blot	36
3.2.2.2	Färben der Polyacrylamid-Gele	36
3.2.2.2.1	Silberfärbung	37
3.2.2.2.2	Coomassie-Färbung	37
3.2.2.3	Fast performance liquid chromatography – FPLC	37
3.2.2.3.1	Gelfiltration	38
3.2.2.3.2	Eichung der Gelfiltrationssäulen	38
3.2.2.3.3	Ionenaustauscherchromatographie	40
3.2.2.3.4	Reinigung von FN mittels Heparin-Sepharose	40
3.2.2.4	Affinitätschromatographie ohne Hochdruck	40
3.2.2.5	Expression von GST-Fusionsproteinen	40
3.2.2.6	Lyse von bakteriell gewonnenen Proteinen	41
3.2.2.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	41

Inhaltsverzeichnis

3.2.3	Zellkultur	41
3.2.3.1	Kultivierung von HeLa, CHO, COS-7, HEK 293 und NIH 3T3 Zellen	41
3.2.3.2	Beschichtung von Kulturschalen	42
3.2.3.3	Präparation und Kultivierung embryonaler Neuronen	42
3.2.3.4	Auswertung neuraler Kulturen	42
3.2.3.5	Auswertung von HeLa-Zell-Adhäsionsversuchen	43
3.2.3.6	Statistische Analyse	43
3.2.3.7	Zellaggregationsversuch	44
3.2.3.8	Antikörperperturbation	44
3.2.3.9	Immunfluoreszenzfärbungen an isolierten Neuronen	44
3.2.3.10	Präparation und Kultivierung embryonaler Kardiomyozyten	45
3.2.3.11	Expression von Fc-Fusionsproteinen	45
3.2.4	Analytische Ultrazentrifugation	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Herstellung und Gewinnung von CAR-Domänen und potentiellen Bindungspartnern	47
4.1.1	CAR-Domänen: bakteriell hergestellt	48
4.1.1.1	mCAR _{extra} : die zwei extrazellulären Ig-Domänen vom mCAR	49
4.1.1.2	mCAR D1: die erste extrazelluläre Ig-Domäne	51
4.1.1.3	mCAR D2: die zweite extrazelluläre Ig-Domäne	53
4.1.1.4	Zytoplasmatische Segmente vom CAR: mCAR _{cyt} TVV, mCAR _{cyt} SIV, chCAR _{cyt} SIV	55
4.1.2	Extrazelluläre CAR-Domänen: eukaryontisch hergestellt	57
4.1.2.1	chCAR-Fc: Fusionsprotein aus Fc und den zwei extrazellulären Ig-Domänen vom chCAR	57
4.1.2.2	mCAR _{ohne Fc} : die zwei extrazellulären Ig-Domänen vom mCAR	59
4.1.2.3	chCAR _{ohne Fc} : die zwei extrazellulären Ig-Domänen vom chCAR	61
4.1.2.4	Deglycosylierung von chCAR _{ohne Fc}	63
4.1.3	Kontrollproteine oder potentielle Bindungspartner vom CAR	65
4.1.3.1	β1-Neurexin LNS-Domäne: bakteriell hergestellt	65
4.1.3.2	Zytoplasmatisches Neurexin: bakteriell hergestellt	66
4.1.3.3	Eukaryontisch hergestelltes und gereinigtes chAgrin	67

Inhaltsverzeichnis

4.1.3.3.1	Agrin bindet an FN	69
4.1.3.4	Aufreinigung von nativem FN aus Plasma	70
4.1.3.5	FN-40-kDa und weitere FN-Fragmente	70
4.1.4	Zusätzlich verwendete potentielle CAR-Bindungspartner	73
4.1.4.1	SDS-PAGE von bFibulin-1, chTenascin-R, bFN, mLaminin-1, Ad2 C428N Fiber Knob, b α + β Tubulin, bProfilin-1, ch α -Actinin und bAktin	73
4.2	Interaktionen der extrazellulären Domänen vom CAR	75
4.2.1	Homophile Interaktionen der extrazellulären Domänen vom CAR	75
4.2.1.1	Verstärkte Aggregation von chCAR-exprimierenden CHO und NIH 3T3 Zellen unter serumfreien Bedingungen	76
4.2.1.2	Das Fehlen vom CAR führt zu einer Verschlechterung der Zell-Aggregation	78
4.2.1.3	Neuronen adhäreren auf mCAR D1 122	78
4.2.1.4	HeLa Zellen adhäreren auf chCAR-Fc	
4.2.1.5	mCAR D1 122, mCAR D2 sowie Ad2 Fiber Knob C428N fördern Neuritenwachstum und Desaggregation auf mLaminin-1	81
4.2.1.6	Der extrazelluläre Bereich vom CAR ist nur im N-glycosylierten Zustand selbstassoziierend	84
4.2.1.7	mCAR D1 122 bindet mCAR D2	88
4.2.1.8	Unterschiedliches Laufverhalten von mCAR _{extra} und chCAR _{ohne Fc} bei der Gelfiltration	91
4.2.1.9	Röntgen-Kristallstruktur: mCAR _{extra} ist ein Dimer	93
4.2.1.10	Chemische Vernetzung vom neuronalen chCAR mit sich selbst	94
4.2.2	Heterophile Interaktionen der extrazellulären Domänen vom CAR	97
4.2.2.1	chCAR-Fc blockiert die Adhäsion von HeLa Zellen an Fibulin-1 und FN	98
4.2.2.2	Die extrazellulären Domänen vom CAR binden an ECM-Glycoproteine wie FN, Laminin-1, Fibulin-1, Tenascin-R und Agrin	100
4.2.2.3	Kartierung der Bindungsregionen im CAR und FN: CAR bindet mit	

Inhaltsverzeichnis

	seiner zweiten Ig-Domäne an die zweite Heparinbindungsdomäne von FN	105
4.2.2.4	Nativer chCAR kann mit FN-Sepharosesäule angereichert werden	108
4.2.2.5	Neuritenwachstum auf FN-40-kDa ist CAR-abhängig	111
4.2.2.6	Keine veränderte Zelladhäsion von CAR-defizienten Kardiomyozyten auf FN oder FN-Fragmenten	120
4.2.3	Die homophile und heterophile Aktivität der extrazellulären Domänen vom CAR schließen vermutlich einander aus	121
4.2.3.1	mCAR D122 und mCAR D2 regulieren Neuritenwachstum und Aggregation auf FN-40-kDa	121
4.2.3.2	Die Bindung von FN-40-kDa an mCAR D2 wird durch die Anwesenheit von mCAR D1 122 nicht beeinflusst	124
4.3	Interaktionen des zytoplasmatischen Segmentes vom CAR	126
4.3.1	Das zytoplasmatische Segment vom CAR bindet an α -Actinin und Profilin-1	126
4.3.2	Gelfiltration zeigt eine Bindung vom zytoplasmatischen CAR und α -Actinin	129
4.4	Das Fehlen vom mCAR führt zu Erhöhung der Kontraktilität in embryonalen Kardiomyozyten	129
5	Diskussion	132
5.1	CAR ist ein homophiles Zelladhäsionsmolekül	132
5.2	CAR ist aufgrund seiner N-Glycosylierung(en) vermutlich trans-homophil oder D1 bindet an D2	134
5.3	CAR ist ein heterophiles Zelladhäsionsmolekül	137
5.4	CAR: homophil oder heterophil?	143
5.5	CAR ist mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert	144
5.6	Parallelen und mögliche Kooperation vom CAR mit Integrinen	147
5.7	Parallelen zwischen CAR und Syndecan-4	150
5.8	Beeinflusst CAR die elektrischen Eigenschaften der Zelle?	152
5.9	Ausblick	153

Inhaltsverzeichnis

6	Abkürzungen	154
7	Anhang	157
7.1	Molmassenbestimmung mittels Sedimentationsgleichgewicht-Analyse von FN-30-kDa, α -Actinin, Profilin-1, β 1-Neurexin-LNS und BSA	157
8	Literaturverzeichnis	159
9	Lebenslauf	177
10	Danksagung	179
11	Erklärung	180

1 Zusammenfassung / Summary

Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR), ein Transmembranprotein der Immunglobulinsuperfamilie mit zwei extrazellulären Ig-Domänen (D1 und D2), wird stark im embryonalen Zentralnervensystem exprimiert. Neben seiner Rolle als Virusrezeptor ist die zellbiologische Funktion im Nervensystem weitestgehend ungeklärt. Aufgrund seiner Lokalisation könnte CAR an der Synaptogenese und dem axonalen Wachstum beteiligt sein. So blockieren Antikörper gegen CAR *in vitro* die Adhäsion von Neuronen an Glycoproteinen der extrazellulären Matrix (ECM) oder inhibieren das Neuritenwachstum auf Basal-Lamina-Präparationen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CAR durch direkte Interaktionen seiner extrazellulären Domänen mit ECM-Glycoproteinen wie Fibronectin (FN), Laminin-1, Fibulin-1, Tenascin-R und Agrin die zelluläre Adhäsion und die Ausbildung von Neuriten fördert. Am Beispiel von FN konnte eine Bindung der zweiten Ig-Domäne vom CAR (D2) an das die zweite Heparinbindungsdomäne von FN umfassende Fragment (FN-40-kDa) nachgewiesen werden. Dieses Fragment enthält nicht die Integrinbindungsstelle der sogenannten Zelladhäsionsdomäne von FN. In Zellkulturversuchen zeigte sich, dass es eine Neuriten-fördernde Aktivität besitzt, die verloren geht, sobald CAR-defiziente Neuronen verwendet werden oder neuraler CAR durch anti-CAR-Antikörper blockiert wird.

Neben dieser heterophilen Bindungsaktivität ist CAR in der Lage, homophil zu binden. So ist die homotypische Aggregation der CAR-defizienten Neuronen auf FN-40-kDa verringert. CAR-transfizierte NIH 3T3 und CHO Zellen aggregieren stärker als parentale Zellen. Aus Bindungsversuchen ergibt sich, dass CAR über seine extrazelluläre Region direkt an sich selbst bindet, wie es auch bei anderen IgSF-Mitgliedern der Fall ist. Diese Selbstassoziation vom CAR wird durch N-Glycosylierung begünstigt, obwohl auch bakteriell hergestellter extrazellulärer CAR bei hohen Konzentrationen Dimere bildet, wie aus der Kristallstrukturaufklärung hervorgeht. Weitere Bindungsstudien legen nahe, dass es neben einer bereits beschriebenen D1-D1-Wechselwirkung auch zu einer 20mal affineren D1-D2-Wechselwirkung kommt, die eine trans-Homodimerisierung möglich macht.

Das zytoplasmatische Segment vom CAR bindet an die Aktin-assoziierten Proteine α -Actinin und Profilin-1.

Wie Integrine oder Syndecane stellt CAR somit eine Verbindung zwischen der ECM oder CAR benachbarter Zellen und dem Aktin-Zytoskelett her.

Zusammenfassung / Summary

The coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR), a transmembrane protein of the Immunoglobulin superfamily (IgSF) composed of two extracellular Ig domains (D1 and D2), is strongly expressed in the developing central nervous system. Based on its localization it is possibly involved in the formation of synapses or axonal outgrowth. Beside its role as a cellular virus receptor the cell biological function in the nervous system remains to be revealed. Consistently, antibodies to CAR block the attachment of neurons on glycoproteins of the extracellular matrix (ECM) or disturb neurite extension on basal laminae preparations *in vitro*.

In this thesis binding studies showed that fibronectin (FN), laminin-1, fibulin-1, tenascin-R and agrin are extracellular interaction partners of CAR. Most likely through these interactions CAR stimulates processes like cell-adhesion and neurite extension. Concerning FN the interaction could be mapped to a fragment bearing the second heparin-binding-domain (FN-40-kDa), which is different from the main integrin binding segment, and to the second Ig domain (D2) of CAR. This FN-fragment has a neurite-stimulating activity in cell-culture which is abolished on neurons from CAR-deficient mice or when CAR is blocked by antibodies.

Beside this heterophilic binding CAR reveals homophilic binding as well. For example, the homotypic interaction of CAR-deficient neurons on FN-40-kDa is disturbed. Furthermore, the aggregation of CAR-transfected NIH 3T3 and CHO cells is stimulated compared to their parental cells. As known for several IgSF-members the extracellular part of CAR binds to itself which is favored when it is N-glycosylated. However, high concentrations of bacterially expressed extracellular CAR form also dimers, which is observed in the crystallographic structure, where a D1 D1 interaction is visible. Again through binding studies, evidence is given that alternatively to the already described D1 D1 interaction a trans D1 D2 interaction takes place with a 20-fold increased affinity.

The intracellular segment of CAR is found to bind to the actin-cytoskeleton by interacting directly with α -actinin and profilin-1.

It can be concluded that CAR acts, like integrins and syndecans, as a linker between the ECM or itself on adjacent cells and the actin-cytoskeleton.

2 Einleitung

2.1 Das zentrale Nervensystem

Das menschliche ZNS ist wahrscheinlich eine der komplexesten Strukturen im Universum und kein Organ irgendeines Lebewesens ist ihm gleichzusetzen. Es besteht aus etwa 100 bis 1000 Milliarden (10^{11} bis 10^{12}) Nervenzellen, zudem enthält es bis zu 1000 Milliarden (10^{12}) weitere Zellen (Gliazellen, Zellen des Immunsystems). Jede Nervenzelle ist mit bis zu 10 000 anderen synaptisch verknüpft. Zusammengerechnet ergibt das eine Zahl von etwa 10^{13} bis 10^{16} synaptischen Verbindungen (Kandel et al., 1996; Roth, 1996; Varoqueaux et al., 2006). Zu verstehen wie ein Netzwerk dieses Ausmaßes entstehen kann, ist derzeit wohl die größte Herausforderung an die biologischen Wissenschaften.

2.2 Bauplan des neuronalen Netzes?

Hält man sich vor Augen, dass das menschliche Erbgut etwa 30 000 verschiedene Gene enthält (Nüsslein-Volhard, 2004), so ergibt sich sehr schnell das Problem, wie eine derart verhältnismäßig geringe Anzahl an Genen die Entwicklung des neuronalen Netzes steuern kann. Eine 1:1 Übertragung der Information, wie etwa ein Gen = eine Synapse, scheint nicht möglich zu sein. Obwohl kein vorgefertigter exakter Plan des Nervensystems existiert, spricht man von einem entwicklungsbiologischen Programm. Es gibt eine Reproduzierbarkeit in dem Ablauf der Entwicklung dieser komplexen Verschaltung, welche durch Interaktionen neuronaler Zellen untereinander und Interaktionen von Neuronen und Glia zustande kommt.

Der an der Spitze auswachsender Neuronenfortsätze befindliche Wachstumskegel bewegt sich eigenständig durch das extrazelluläre Milieu zu seinem Endziel. Dabei spielen Signale aus der Umgebung eine große Rolle, denn der Wachstumskegel ist mit molekularen Rezeptoren ausgestattet, welche das Vorhandensein von attraktiven oder repulsiven Signalen (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996) registrieren und somit dem Wachstum eine Richtung vorgeben können. Diese Signale können diffusible oder festverankerte Moleküle sein. Oftmals orientiert sich der Wachstumskegel an Konzentrationsgradienten dieser Signalmoleküle. Hat ein Axon sein Ziel erreicht, gleiten Wachstumskegel später folgender Axone an ihm entlang, was zu mächtigen Bündeln aus Nervenfasern führt.

Einleitung

Die Bedeutung von Membranproteinen als Erkennungsmoleküle bei der Neuritenextension und dem Finden geeigneter Zellen zum Aufbau neuronaler Verbindungen ist bereits seit längerer Zeit bekannt und äußert sich in einer transienten Expression vor allem zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt (Hynes und Lander, 1992; Goodman und Shatz, 1993). Neuronale Zellen verfügen über eine ganze Batterie an sogenannten „cell adhesion molecules“ (CAMs), um diese hohe Anzahl an Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten ausbilden und aufrechterhalten zu können.

2.3 Zell-Adhäsionsmoleküle

Unter zellulärer Adhäsion versteht man den spezifischen, Rezeptor-vermittelten Kontakt zwischen Zellen oder zwischen Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM). CAMs spielen sowohl bei der Faszikulation als auch beim Wegfinden eine Rolle, da sie auf der Oberfläche von Nachbarzellen oder in der ECM vorkommen können. Unter anderem dienen sie durch spezifische nicht-kovalente Bindung mit entsprechenden Molekülen der Nachbarzellen dem physikalischen Zusammenhalten der Zellen im Gewebeverband. Aber auch an der Immunantwort sind CAMs maßgeblich beteiligt (Hynes, 2000; Chen, 2006). Man unterteilt diese an der Adhäsion beteiligten Glycoproteine in mehrere Hauptfamilien, von denen einige hier exemplarisch aufgeführt sind:

- Die erste ist die Immunglobulinsuperfamilie (IgSF), zu der N-CAM gehört (N: neural). Es befindet sich auf der Oberfläche neuronaler Zellen. Dieses Sialinsäurehaltige Glycoprotein ist entweder über eine Glycanbrücke an Inositolphospholipide der Zellmembran gekoppelt oder aufgrund einer eigenen Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Dieses Protein zeigt eine Verwandtschaft zu den Immunglobulinen. Die Adhäsion aufgrund der Proteine der IgSF erfolgt in der Regel über homophile Bindungen, d.h. N-CAM einer Zelle binden an N-CAM der Nachbarzelle (Kiryushko et al., 2004; Lee und Benveniste, 1999; Shapiro et al., 2007).
- Die zweite enthält eine Reihe strukturell verwandter Glycoproteine namens Cadherine (= Calcium-abhängige Adherine), von denen N-Cadherin ein prominenter Vertreter im Nervensystem ist. Auch hier kommt es überwiegend zu homophilen Bindungen (Kiryushko et al., 2004; Lee und Benveniste, 1999; Shapiro et al., 2007).
- Die dritte Familie besteht aus einer großen Gruppe von heterodimeren Glycoproteinen, den Integrinen. Die Integrine sind für eine Interaktion zwischen der Zell-

Einleitung

oberfläche und Molekülen in der extrazellulären Matrix wie Lamininen und Fibronektin (FN) verantwortlich (Geiger et al., 2001).

- Eine weitere Familie der CAMs enthält die Selektine und Lektine, die auf Blutzellen und den Wandungen der Blutgefäße (Endothelien) gefunden werden. Mittels der heterophilen Interaktion von Selektinen der Blutzellen und der Endothelien ist es Lymphozyten und Makrophagen möglich, an die Gefäßwandungen zu binden, um dann die Gefäße zu verlassen (Vestweber und Blanks, 1999).
- Zu einer fünften Familie der CAMs werden von einigen Autoren die Glycosyltransferasen gezählt (Shur, 1993). Hierbei handelt es sich um Enzyme auf der Zelloberfläche, deren enzymatisch aktive Domänen nach außen gerichtet sind (Ektoenzyme). Sie übertragen aktivierte Zucker auf Substrate, welche Komponenten der Zellmembran einer Nachbarzelle sein können. Ein Beispiel hierfür ist die Galactosyltransferase, welche Galactose auf ein Akzeptormolekül einer Nachbarzelle überträgt. Steht keine freie Galactose im extrazellulären Milieu zur Verfügung, sind Galactosyltransferase und Akzeptormolekül aneinander gebunden, so dass beide Moleküle als Zelladhäsionsmoleküle fungieren. Liegt allerdings freie Galactose vor, wird diese von der Transferase dem Akzeptormolekül angehängt, und die Zelladhäsion kann gelöst werden.

In Regionen des sich entwickelnden Nervensystems, welche von so genannten Radialgliazellen durchspannt sind, können die CAMs als Wegweiser für die Wanderung der Neuronen dienen. Zum Beispiel benutzen Neuronen der Großhirnrinde die Radialglia als Leitstruktur für ihre Wanderung von der Ventrikularschicht hin zu ihren endgültigen Bestimmungsorten (Kiryushko et al., 2004; Lee und Benveniste, 1999).

An dieser Stelle soll auch kurz erwähnt werden, dass CAMs nicht nur als Membran-gebundene, sondern auch als im extrazellulären Raum gelöste Proteine vorliegen können. Über die möglichen Funktionen wird spekuliert (Lee und Benveniste, 1999; Shapiro et al., 2007): Zum einen wäre denkbar, dass gelöste CAMs mit ihren Zell-gebundenen Verwandten um Bindungsstellen auf Akzeptoren konkurrieren und somit eine Zelladhäsion einschränken. Andererseits könnten sie eine Antwort der Liganden-tragenden Zellen hervorrufen und auf diese Weise möglicherweise doch einen der Adhäsion dienenden Prozess der betroffenen Zellen in Gang bringen.

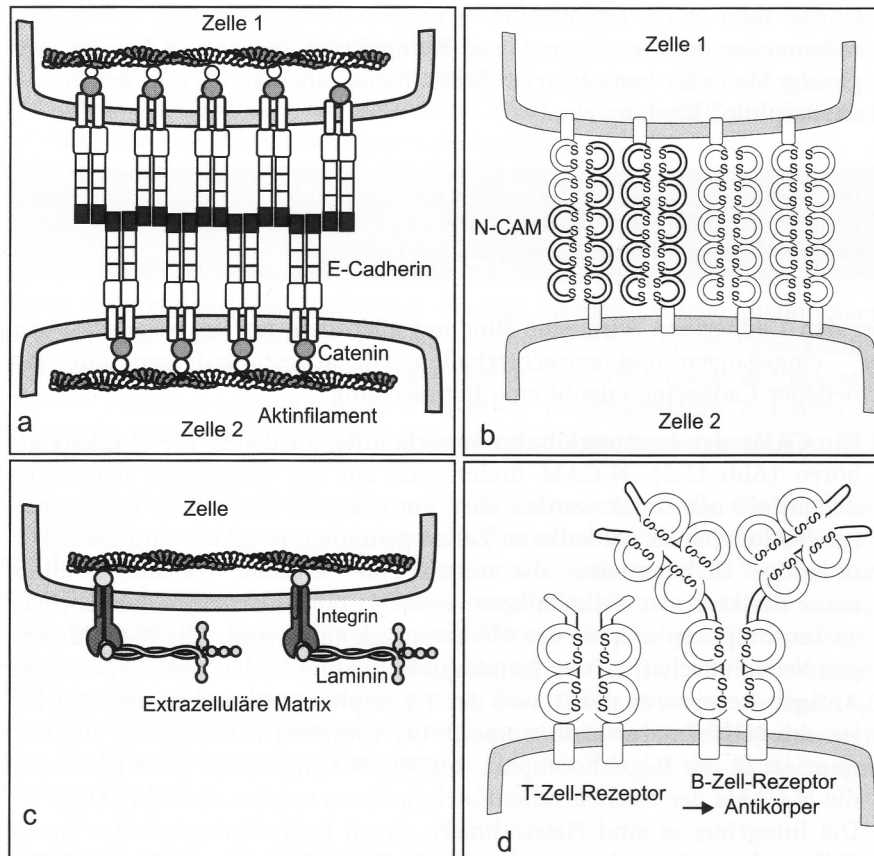


Abb. 2.1 (Müller und Hassel, 2003): einige Beispiele für Zelladhäsionsmoleküle. **a** Cadherin: Ca^{2+} - Ionen sind für die Aufrechterhaltung der Konformation der Cadherindomänen erforderlich. **b** N-CAM, ein neuronales Zelladhäsionsmolekül und homophiler Vertreter der Immunglobulinsuperfamilie. **c** Integrine vermitteln den Kontakt zur extrazellulären Matrix. **d** andere Vertreter der Immunglobulinsuperfamilie, die bei der Immunantwort von entscheidender Bedeutung sind.

2.4 Die extrazelluläre Matrix

Neben den CAMs kommt auch der ECM eine ganz entscheidende Funktion bei der Ausbildung des neuralen Netzes zu. Die ECM wurde ursprünglich morphologisch als azelluläres Material definiert, dessen Strukturen (z.B. Fibrillen oder basale Laminae) im Elektronenmikroskop sichtbar sind. Mittlerweile wird sie jedoch breiter definiert und schließt sekretierte außerhalb von Zellen immobilisierte Moleküle ein, auch wenn sie keine mikroskopisch detektierbare Organisation aufweisen. Als Hauptbestandteile wurden Kollagene, nicht-kollagene Glycoproteine und eine Reihe von Proteoglycanen identifiziert (Reichardt und Tomaselli, 1991). Die ECM nimmt ein relativ großes Volumen des Nervengewebes ein. Im adulten Gehirn gehören etwa 20 % zur ECM, in neugeborenen wahrscheinlich doppelt soviel

Einleitung

(Pavlov et al., 2004). Von Neuronen oder Gliazellen gebildete ECM-Moleküle werden sekretiert und akkumulieren im extrazellulären Raum, um im Nervensystem eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen zu steuern, zu denen neuronale Migration, Neuritenwachstum, Lenkung der Wachstumskegel und Synaptogenese sowie Stabilisierung der Synapsen gehören (Dityatev und Schachner, 2006; Ruegg, 2001).

Viel von dem, was von der Funktion der ECM bei der Ausbildung von Synapsen bekannt ist, geht auf Studien an der neuromuskulären Synapse (NMJ) zurück (Burden et al., 1979; McMahan und Slater, 1984; Burden, 2002) und kann im Wesentlichen durch die biologische Aktivität von Agrin erklärt werden (McMahan, 1990; Bezakova und Ruegg, 2003). Agrin ist ein Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG) und wurde erstmals aus dem elektrischen Organ des Torpedofisches isoliert (Godfrey et al., 1984; Nitkin et al., 1987). Synthetisiert von Motoneuronen, transportiert zu Motoaxonen und an deren Enden freigesetzt wird Agrin in die basalen Laminae der synaptischen Spalten eingebaut. Agrin, dessen Rezeptor „muscle specific kinase“ (MuSK) und das zytoplasmatische Protein Rapsyn sind primär notwendig für die postsynaptische Induktion an der NMJ (Bowe und Fallon, 1995; Sanes et al., 1998; Ruegg, 2001; Bezakova und Ruegg, 2003). Für jedes einzelne dieser Signalmoleküle defiziente Mäuse weisen schwere Störungen an der NMJ auf (Gautam et al., 1995; Gautam et al., 1996; Gautam et al., 1999; DeChiara et al., 1996). Allerdings ist bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ein absolut essentieller Faktor, wie Agrin an der NMJ, an den Synapsen des ZNS nicht identifiziert worden, wobei dies bei der strukturellen und funktionalen Diversität der ZNS-Synapsen nicht überraschend ist (Pavlov et al., 2004). Mehrere Zelloberflächen- und extrazelluläre Faktoren sind in der Lage synaptische Differenzierung in ZNS-Neuronen zu induzieren. Dazu gehören z.B. „neuronal activity-regulated pentraxin“ (NP2), Neuroigine, SynCAM (Syn: synaptic), Syndecane, Ephrin-Rezeptoren, Cadherine und Integrine (Benson und Tanaka, 1998; Ethell und Yamaguchi, 1999; Dalva et al., 2000; Scheiffele et al., 2000; Ethell et al., 2001; Biederer et al., 2002; Togashi et al., 2002; Nikonenko et al., 2003; Xu et al., 2003). Trotzdem ist in Gen-Knockout-Untersuchungen keines dieser individuellen Moleküle essentiell für die Bildung von Synapsen (Pavlov et al., 2004).

Aber auch die synaptische Plastizität unterliegt teilweise dem Einfluss der ECM. So konnten z.B. Hinweise dafür gesammelt werden, dass die Aktivität des L-Typ Calcium-Kanals von dem ECM-Glycoprotein Tenascin-C (TN-C) abhängt. In TN-C-defizienten Mäusen führt eine Theta-Stoß-Stimulation von Schaffer-Kollateralen zu einer beeinträchtigten Langzeitpotenzierung (LTP), bzw. zu einer kompletten Abwesenheit von CA1-Langzeitdepression (Evers et al., 2002). Die Gegenwart von Nifedipin (ein Antagonist

Einleitung

des L-Typ spannungsabhängigen Calcium-Kanals) zeigt keinen Effekt in elektrophysiologischen Ableitungen TN-C-defizienter Mäuse, dafür aber eine LTP-Reduktion auf den Wert der mutierten Tiere in Wildtyp-Mäusen (Evers et al., 2002).

Es wird davon ausgegangen, dass *in vivo* permissive Substrate für die Motilität der Wachstumskegel sowie für Neuriten- bzw. axonales Wachstum durch ECM-Moleküle bereitgestellt werden (Reichardt und Tomaselli, 1991; Venstrom und Reichardt, 1993). Viele Moleküle, die exzellente Förderer dieser Prozesse *in vitro* sind, konnten aus der ECM isoliert werden. Diese Faktoren wurden ursprünglich aus konditionierten Zellkulturüberständen bestimmter Zellen aufgereinigt, von denen bekannt war, dass sie axonales Wachstum unterstützen. Die ECM-Glycoproteine, FN, Vitronektin, Laminine und verschiedene Formen von Kollagen zeigen Neuriten-fördernde Funktionen (Venstrom und Reichardt, 1993; Schwartz et al., 1999).

2.5 Was ist interessant am Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor?

Auch wenn die Verknüpfungen im Nervensystem im Laufe des entwicklungsbiologischen Programms einmal zum größten Teil hergestellt sind, kann man doch nicht von einer fertigen oder statischen Struktur sprechen. Das Nervensystem ist in gewisser Weise niemals fertig, sondern ein durchaus dynamisches Organ. Neue Verbindungen werden geschaffen und bestehende werden abgebaut. Erhalten bleiben Synapsen, wenn sie regelmäßig benutzt werden, d.h. wenn sie wiederholt Nervenimpulse weiterleiten. Die molekularen Umstände, wie synaptische Plastizität durch neuronale Aktivität beeinflusst wird, sind unklar. Eine mögliche Verbindung dieser zwei Prozesse könnten Zelloberflächenproteine herstellen, die durch elektrische Aktivität moduliert werden. Eines dieser Proteine könnte der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR) sein, dessen Expressionsrate vermutlich aktivitätsabhängig hochreguliert wird (Jüttner et al., 2005).

Ein besonderer Aspekt vom CAR, neben seiner bereits beschriebenen homophil-adhäsiven Aktivität, ist eine mögliche ECM-Glycoproteinen gegenüber heterophile Neuriten- bzw. Axonwachstums-fördernde Aktivität (2.7). Da CAR besonders im embryonalen Nervensystem stark exprimiert wird (Abb. 2.2), scheint er ein weiterer Kandidat, der an der Ausbildung des neuralen Netzes und eventuell an der Synaptogenese beteiligten Moleküle zu sein.

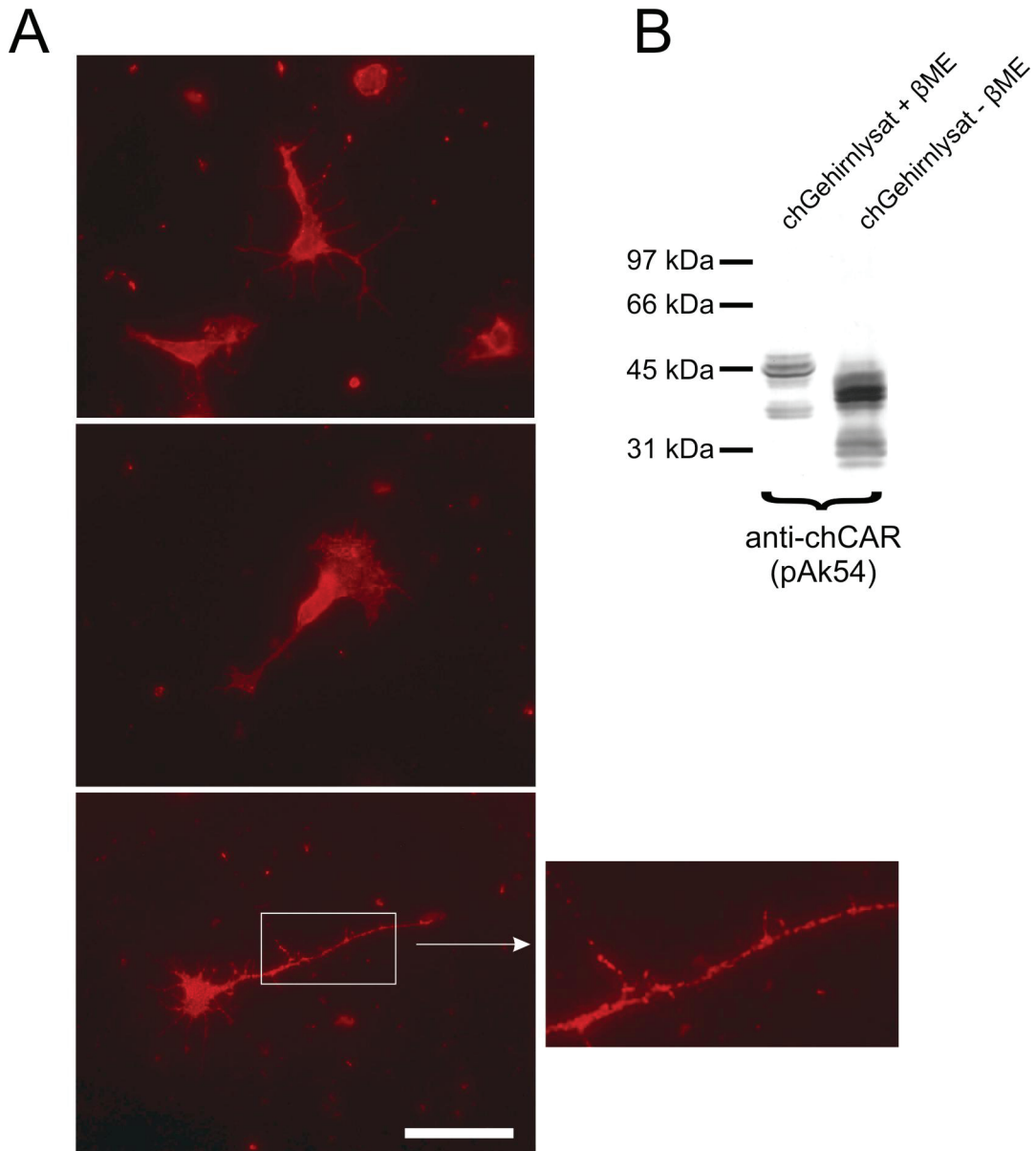


Abb. 2.2 CAR wird vor allem im embryonalen Nervensystem exprimiert. **A** Expression vom chCAR auf embryonalen Neuronen. Tectale Neuronen (E6) aus dem Hühnchen wurden auf Laminin-1-beschichteten Kulturschalen für drei Tage kultiviert, anschließend mit Formaldehyd fixiert und gefärbt mit dem anti-chCAR-Antikörper mAk12-36. Es ist zu sehen, dass CAR in Aggregaten auf der Zelloberfläche vorkommt. Im unteren Bild ist eine Ausschnittsvergrößerung zu sehen. Maßbalken: 20 μ m. **B** 10 % SDS-PAGE mit anschließender Western Blot (WB) -Analyse mit anti-chCAR-Antikörper (pAk54). Aufgrund interner Disulfidbrücken unterschiedliches Wanderungsverhalten unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Unter reduzierenden Bedingungen ist die Hauptbande bei etwa 45 kDa zu sehen; darunter befinden sich vermutlich C-terminale Abbauprodukte. Geladen sind je Spur 30 μ g embryonales Gehirnlysat (E8) aus dem Hühnchen.

2.6 Der Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor (CAR)

2.6.1 Ein Rezeptor für zwei verschiedene Viren

Die Fähigkeit von tierischen Viren, Zellen zu infizieren, hängt von der Präsenz eines geeigneten Rezeptors ab. Normalerweise konkurrieren Viren unterschiedlicher Familien nicht um eine gemeinsame Bindungsstelle auf der Zytoplasma-Membran, trotzdem ist gerade dies für Coxsackie- und Adenoviren (Ad) der Fall (Lonberg-Holm et al., 1976).

Als Hauptrezeptor für alle sechs Serotypen der Coxsackieviren B (CVB) sowie den Adenovirus 2 und den Adenovirus 5 (Ad2 und Ad5) wurde CAR erstmalig im Jahre 1997 beschrieben (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1997; Carson et al., 1997).

Die Ad sind Membran-umhüllte DNA-Viren (lineares doppelsträngiges DNA-Genom, ca. 36 kb) mit einem icosahedrigen Protein-umkapselten Kern (Capsid). Aus dem Capsid herausragende trimere Proteinfasern binden mit ihrem C-terminalen „Faser Knopf“ (Fiber Knob) an die extrazelluläre Plasmamembran-distale Ig-Domäne (D1) vom CAR (Xia et al., 1994). Ein Fiber Knob enthält aufgrund seiner trimeren Struktur drei Bindungsstellen für CAR (Bewley et al., 1999). Die D1-Domäne allein ist ausreichend für die Bindung an Fiber Knob (Freimuth et al., 1999). Die am CAR gebundenen Ad werden über die als Vitronectin- und FN-Rezeptoren bekannten Integrine $\alpha\beta 3$ und $\alpha\beta 5$ internalisiert und anschließend über mikrotubuläre Translokationssysteme zum Zellkern geschleust (Johansson et al., 1997; Schwartz et al., 1999; Wickham et al., 1993; Leopold et al. 2000). Interessanterweise ist die Expression der αv -Untereinheit in der Glia des ZNS und in der Skelettmuskulatur entwicklungs-dynamisch reguliert. Am E10,5 konnte bei Mäusen eine hohe αv -Expression im Neuralrohr und in myotomalen Zellen nachgewiesen werden, die sich mit fortschreitender Entwicklung auf die radialen Gliafasern und den apikalen Teil des Myotubus konzentriert. Am P7 und bei adulten Tieren wurde eine fortschreitend starke Abnahme von αv im ZNS festgestellt. Diese Verteilung steht in Übereinstimmung mit der Rolle, die αv bei der Neuron-Glia-Interaktion während der Organisation der neuronalen Schicht des Cortex und des Cerebellum spielen soll (Hirsch et al., 1994). Auch Integrin $\alpha 5\beta 1$ (der sogenannte klassische FN-Rezeptor) scheint für die Virusinternalisation mitverantwortlich zu sein (Davison et al., 1997).

Im Gegensatz dazu sind die CVB RNA-Viren (Einzelstrang-RNA), welche über keine Faser-Struktur verfügen und an die Zellen binden, indem CAR in einen „Canyon“ (Schlucht) auf der Oberfläche des Virus eingeführt wird (Muckelbauer et al., 1995). CAR vermittelt die Bindung und die Internalisierung der CVB. Die externen Virusproteine (VP1-3) sind an der

Einleitung

Rezeptorbindung beteiligt, wobei die Hauptinteraktion zwischen CAR und VP1 erfolgt (He et al., 2001). Neben CAR kann „decay accelerating factor“ (DAF) einigen Serotypen als Korezeptor dienen (Martino et al., 2000).

2.6.2 Das CAR-Gen

Das humane CAR-Gen ist durch mindestens sieben Exons codiert und befindet sich auf Chromosom 21q11.2 (Bowles et al., 1999). Geringstenfalls existieren zudem noch vier Pseudogene auf den Chromosomen 15, 18 und 21, die jedoch aufgrund von Insertionen oder Deletionen nicht für funktionsfähige Proteine codieren (Bowles et al., 1999). In der Maus befindet sich *mCAR* auf dem distalen Ende von Chromosom 16 (Chen et al., 2003). Das Maus-Transkript enthält eine zusätzliche Spleiß-Position 27 kb stromabwärts von Exon 7. Das humane Transkript teilt ebenfalls Exon-Sequenzen an dieser Stelle; es fehlt jedoch die Spleiß-Akzeptor-Position (Andersson et al., 2000). Auf Northern Blots erscheinen die jeweiligen mRNAs bei 6 und bei 2,4 kb beim Menschen und bei 6 und 1,4 kb bei der Maus. Die längere Form ist in beiden Spezies dominierend und repräsentiert vermutlich ein teilweise gepleißtes Produkt. Weitere mRNAs, alternativer Spleiß-Varianten wurden ebenfalls charakterisiert (Bergelson et al., 1998; Dorner et al., 2004; Thoelen et al., 2001). Aufgrund der bekannten Sequenz von Chromosom 21 ist bekannt, dass die Transkriptionseinheit für *hCAR* etwa 57 kb umfasst (Hattori et al., 2000).

2.6.3 CAR: ein Protein der IgSF mit zwei Ig-Domänen im extrazellulären Bereich

Das vollständige offene Leseraster der CAR mRNA codiert bei Maus und Mensch für 365 Aminosäuren (AS) mit einer Signalsequenz von 19 AS, einem extrazellulärem Segment von 216 AS, einer Transmembrandomäne von 23 AS und abhängig von alternativem Spleißen einen zytoplasmatischen Bereich von entweder 107 (genannt: CAR1 oder CAR SIV, da die letzten AS am C-Terminus SIV sind) oder 94 AS (genannt: CAR2 oder CAR TVV, C-terminale Sequenz: TVV). Die theoretische molekulare Masse des reifen mCAR SIV beträgt etwa 38 kDa, erscheint allerdings in der SDS-PAGE (unter reduzierenden Bedingungen) ver-

Einleitung

ursacht durch N-Glycosylierungen (vermutlich Asn106 und Asn201 (Excoffon et al., 2007; Honda et al., 2000)) bei etwa 46 kDa (Freimuth et al., 2008). Zwei Membran-proximale zytoplasmatische Cysteine werden durch Fettsäure-Acylierung modifiziert (van't Hof und Crystal, 2002). Die Sequenzlänge des zytoplasmatischen Bereichs sowie die darin enthaltene Anzahl der Tyrosine, welche möglicherweise in Signaltransduktionen involviert sind, ist spleiß-abhängig (Andersson et al., 2000). Die PDZ-Bindungsmotive (TVV oder SIV), die mit intrazellulären PDZ-Proteinen interagieren können, stellen den äußersten C-Terminus beider hCAR und mCAR Isoformen dar (Freimuth et al., 2008).

Gemäß Sequenz-Analysen ist das CAR-Protein Mitglied der IgSF, deren weitere Vertreter u.a. N-CAM, ICAM-1, CD4 und MHC sind, und enthält zwei extrazelluläre Ig-Domänen, die in der N-terminalen Hälfte vom CAR lokalisiert sind, eine einzelne hydrophobe α -helicale Transmembrandomäne sowie einen zytoplasmatischen Schwanz (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1997). Die D1-Domäne wird als variable Ig-Domäne (V) klassifiziert. Es enthält eine einzige Intradomänen-Disulfidbrücke sowie eine Position für N-Glycosylierung (trifft nicht auf chCAR zu, (Abb 4.34). CAR D1 wurde auf unabhängige Weise von zwei Gruppen in *Escherichia coli* exprimiert und dessen Struktur mittels Röntgen-Kristallographie (van Raaij et al., 2000) und NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Jiang et al., 2004). Auf Sequenz-Analysen basierend ist die D2-Domäne als konstante Ig-Domäne (C2) einzuordnen (He et al., 2001). CAR D2 enthält eine einzige Position für N-Glycosylierung und verfügt über zwei Intradomänen-Disulfidbrücken. Die Struktur wurde durch NMR-Spektroskopie ermittelt (Jiang und Caffrey, 2007).

Strukturelle Analysen von CAR D1 unterstützen die vorgeschlagene Funktion als Vermittler der Zell-Adhäsion in interzellulären Verbindungskomplexen epithelialer Zellen wie z.B. „tight junctions“ (Cohen et al., 2001b; Walters et al., 2002). Die homotypische Aggregation CAR-exprimierender Zellen kann durch anti-CAR-D1-Antikörper oder isolierten Fiber Knob unterbunden werden (Honda et al., 2000). CAR D1 ist selbst-assoziiierend und liegt bei neutralem pH-Wert in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor (van Raaij et al., 2000). Ein weiteres rekombinantes CAR D1, welches C-terminal die ersten vier AS von CAR D2 enthält, liegt bei neutralem pH-Wert als stabiles Dimer vor und geht erst ab pH 3 in den monomeren Zustand über (Jiang et al., 2004). Die Bindungsstelle der Homodimerisierung von D1, welche die drei geladenen AS D54, E56 und K123 enthält, überlappt mit der Fiber-Knob-Bindungsstelle (van Raaij et al., 2000). Dass diese drei Positionen einen wichtigen Teil der Funktion vom CAR übernehmen, geht daraus hervor, dass sie strikt konserviert sind (in Rind,

Einleitung

Maus, Ratte, Mensch, Huhn und Zebrafisch), was auch erklären könnte, warum CAR dieser Tiere humane Ad und CVB binden (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1998).

Das extrazelluläre Segment nimmt an drei im Detail beschriebenen Bindungen teil (CVB, Ad und D1-D1). Von zusätzlichen Interaktionen wurde berichtet: mit Immunglobulinen von unbekannter Bedeutung (Carson und Chapman, 2001), JAM-L (Zen et al., 2005) und JAM-C (Mirza et al., 2006).

2.6.4 Der zytoplasmatische Bereich vom CAR enthält ein PDZ-Bindungsmotiv

CAR-Antigene mit apparenten Massen von 40 kDa, 37,5 kDa und 31 kDa konnten jeweils in CVB-infizierten HeLa Zellen, abgeschnürten Vesikeln kultivierter Zellen und malignen Pleuralergüssen gefunden werden (Carson, 2004; Bernal et al., 2002; Carson, 2000). Die 31-kDa-Form könnte durch Sekretion (einer alternativen Spleiß-Variante) oder Proteolyse des extrazellulären Segmentes stammen, während für die 37,5-kDa-Form (die vermutlich mit der 40-kDa-Form identisch ist) gezeigt werden konnte, dass sie immernoch mit Plasmamembran-Vesikeln assoziiert ist, was auf eine proteolytische Spaltung am zytoplasmatischen C-Terminus hindeuten könnte.

Der zytoplasmatische Bereich vom CAR scheint für die Infektion von Ad oder CVB unwichtig zu sein (Leon et al., 1998; Wickham et al., 1993), hat aber wahrscheinlich Funktionen bei Signalkaskaden und Zellproliferation, wie z.B. im Wachstum von Tumorzellen (Okegawa et al., 2001; Bruning et al., 2005). Die Bindung von Fiber Knob an CAR respiratorischer Zellen stimuliert die Produktion inflammatorischer Produkte (Tamanini et al. 2006). Da Inflammation eine Schlüsselkomponente der CVB-assoziierten Pathologie darstellt, könnten mögliche CAR-vermittelte Signalkaskaden wichtig für die CVB-assoziierten Krankheitsbilder sein. Zusätzlich beeinflusst der zytoplasmatische Bereich auch die Verteilung vom CAR innerhalb der Zelle (van't Hof und Crystal, 2002; Cohen et al., 2001a)

Gemäß verschiedener Studien kolokalisiert CAR mit den „tight junctions“ Proteinen Occludin (Raschperger et al., 2006) und Zonula occludens-1 (ZO-1) (Cohen et al., 2001b), einem PDZ-Domänen Protein. Es ist auch möglich CAR mit ZO-1 immun zu präzipitieren (Cohen et al., 2001b). Trotzdem wurde bislang keine direkte Komplexbildung belegt. In Hefe-2-Hybrid-Systemen wurden zusätzlich Bindungen zu den PDZ-Domänen Proteinen LNX

Einleitung

(Mirza et al., 2005; Sollerbrant et al., 2003), MUPP-1 (Coyne et al., 2004) und MAGI-1b, PICK 1 sowie PSD 95 (Excoffon et al., 2004) aufgezeigt.

2.6.5 CAR ist Teil einer Subgruppe der IgSF

Die Homologie vom CAR zwischen den Spezies Mensch, Maus, Ratte, Hund und Schwein beträgt in etwa 90 % (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1998; Fechner et al., 1999). D1 (91-94%) ist stärker konserviert als D2 (83-89 %), wohingegen der zytoplasmatische Bereich dieser Spezies zu ca. 95 % identisch ist (Fechner et al. 1999). Die Transmembrandomäne ist weniger stark konserviert (77 % zwischen Maus und Mensch) (Tomko et al., 1997). Sogar Zebrafisch CAR ist insgesamt zu 52 % identisch mit hCAR und kann als Rezeptor für CVB und Ad dienen (Petrella et al., 2002).

CAR ist Mitglied einer Subgruppe der IgSF, deren weitere Mitglieder und nächste Verwandte BT-IgSF (brain and testis specific IgSF-member) (Suzu et al., 2002; Harada et al., 2005), CLMP (CAR-like membrane protein) (Raschperger et al., 2004), ESAM (endothelial selective adhesion molecule) (Hirata et al., 2001), A33 (Heath et al., 1997; Johnstone et al., 2000), mindestens vier verschiedene JAMs (junctional adhesion molecule) (Mandell und Parkos, 2005) und CTX (cortical thymocyte marker in Xenopus laevis) sind (Chretien et al., 1998; Du et al., 1999). Diese Proteine bestehen alle aus zwei extrazellulären Ig-Domänen (einer V- und einer C2-Domäne) mit einer zusätzlichen Disulfidbrücke in der C2-Domäne, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Bereich variabler Länge.

2.6.6 CAR-Expression in Geweben und Zellen

CAR ist ein reguliertes Protein, das während der embryonalen Entwicklung besonders im Gehirn und Muskeln exprimiert (Honda et al., 2000; Nalbantoglu et al., 1999) und während der neonatalen Phase verringert wird. mCAR-defiziente Mäuse sterben in etwa bei E10,5 aufgrund einer Fehlentwicklung der Herzens, wie z.B. einer Hyperplasie des linken Ventrikels, einer Dilatation kardialer Venen oder fehlender Sinuatriale-Valvulae. Histologisch zeigt sich in diesen Herzen u.a. eine Desorganisation der Myofibrillen (Dorner et al., 2005; Asher et al., 2005). Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer mCAR-Deletion ab dem Zeitpunkt

Einleitung

E9,5 sterben ebenfalls an Herzmißbildungen. Hingegen Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer CAR-Deletion bei E11,5 überleben bis zum adulten Stadium (Chen et al., 2006).

Im adulten Herzen ist CAR nur in geringen Mengen (relativ zur embryonalen Entwicklung) exprimiert, wird jedoch während inflammatorischer sowie regenerativer Prozesse (z.B. nach Myokardinfarkt) und in Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie verstärkt exprimiert (Noutsias et al., 2001) (Fechner et al., 2003; Ito et al., 2000). CAR wurde immunhistochemisch in den Disci intercalares (Glanzstreifen) der Kardiomyozyten lokalisiert (Shaw et al., 2004). Im embryonalen Gehirn ist CAR gegenüber dem adulten Gehirn stark exprimiert (Honda et al., 2000). Maus Embryonen zeigen eine ubiquitäre CAR-Expression mit einer Präferenz für das ZNS, einschließlich aller neuroepithelialen Zellen, in Ganglien und peripheren Nerven (Tomko et al., 2000). Immunhistochemische Analysen des zentralen Nervensystems von Mäusen haben erstmals ab E6,5 eine CAR-Expression im embryonalen Ektoderm nachweisen können. Vom E8,5 bis P7 zeigt sich eine starke Expression im Neuroepithelium des Neuralrohres, im sich entwickelndem Gehirn und im Rückenmark; vom E9,5 bis E11,5 in den cranialen Motoneuronen und vom E13,5 bis P7 im optischen Nerv. Zudem ist schon seit längerem bekannt, dass CVB eine hohe Affinität zu Geweben von Neugeborenen haben (Dalldorff und Sickles, 1948). Diese Expressionsphasen entsprechen gleichzeitig wichtigen morphogenetischen Entwicklungsphasen der jeweiligen Regionen. Postnatal sinkt diese Expression vom CAR und verschwindet nahezu in den adulten Geweben. In wenigen proliferierenden Zonen des Gehirns kann die Expression vom CAR auch postnatal nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Daten wie auch den Ergebnissen von *in vitro* Versuchen, in denen CAR zwischen den Fasern faszikulierter Bündel von kultivierten Hippocampus-Neuronen detektiert wurde, wird postuliert, dass CAR während einer bestimmten Phase des Entwicklungsprozesses als Adhäsionsmolekül bei der Migration und Faszikulation im Nervensystem mitwirkt (Hotta et al., 2003). CAR mRNA ist im murinen Gehirn exprimiert mit einem Maximum (Zeitpunkt variiert je nach Hirnregion) nahe der Geburt und geht danach zurück (Honda et al., 2000). CAR kann auch in epithelialen Zellen der embryonalen Leber, der Lunge, der Augen, des Pankreas, des Verdauungssystems, und der Nieren nachgewiesen werden (Raschperger et al., 2006). Eine rapide Abnahme vom CAR ist nach der Geburt zu verzeichnen, so dass es nur noch im geringen Maß in diesen Geweben vorkommt. Jedoch nimmt die Expression in Leber, Darm und Nieren nach der Geburt nicht ab (Raschperger et al., 2006). Im Nervensystem der adulten Maus scheint CAR auf Zellen nahe der ependymalen Region, das ventrikuläre System auskleidend, begrenzt zu sein, was konsistent mit der Ad-Infektion von den lateralen Ventri-

Einleitung

keln herrührend ist. CAR ist außerdem in Tracheen und Bronchen aber nicht in Alveolen adulter Tiere vorhanden (Tomko et al., 2000).

Untersuchungen an Prostatakarzinom-Zelllinien konnten ein inverses Verhältnis zwischen der Expression vom CAR und der Proliferation der Karzinomzellen zeigen, was vermuten lässt, dass CAR eine Tumor-inhibierende Funktion hat (Okegawa et al., 2000). Durch weiterführende Untersuchungen an Harnblasentumorzellen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, wobei deutlich wurde, dass durch den CAR-vermittelten Zellkontakt eine Proliferations-inhibierende Signalkaskade ausgelöst wird, die zur Modulation von Zellzyklusregulatoren im Kern und damit zur Wachstumshemmung führt (Okegawa et al., 2001).

In kultivierten epithelialen Zellen, ist CAR vorzugsweise an der basolateralen Seite auf Höhe der „tight junctions“ exprimiert (Cohen et al., 2001b; Walters et al., 2002). Eine Analyse der ersten Stadien einer Ad-Infektion polarisierter epithelialer Zellen hat gezeigt, dass von der basolateralen Seite infizierter Zellen freigesetzte Ad „tight junctions“ auseinander lösen können (Walters et al., 2002). Erstaunlicherweise ist auch die isolierte Faser mit der Fiber-Knob-Domäne dazu in der Lage (Rentsendorj et al., 2005). Obwohl CAR möglicherweise als homophiles Zelladhäsionsmolekül fungiert, wird es auch in anderen Membranregionen (als „tight junctions“) detektiert. Zum Beispiel kommt es auf der apicalen Seite des Prostata-Epithels vor (Rauen et al., 2002; Bao et al., 2005). Außerdem kann es auch auf der basalen Oberfläche von Hepatocysten nachgewiesen werden, so dass in den Blutkreislauf von Mäusen injizierter Fiber Knob rapide in einer CAR-abhängigen Weise von der Leber aufgenommen wird (Zinn et al., 1998; Awasthi et al. 2004).

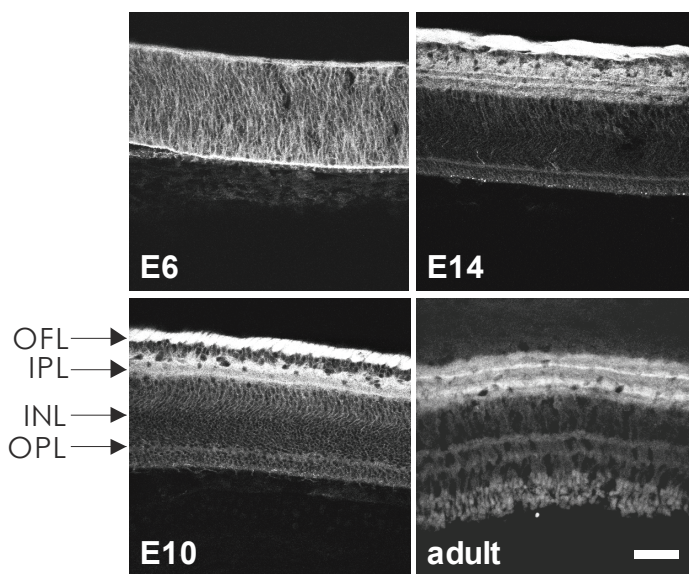


Abb. 2.3 Die histologische Verteilung vom CAR in der Retina (Hühnchenembryo) verändert sich im Laufe der embryonalen Entwicklung. In frühen Stadien (E6) ist CAR nahezu homogen verteilt mit stärkeren Anhäufungen

Einleitung

in der ventrikulären Zone und an der vitrealen Grenze. Später reichert CAR sich in der optischen Faserschicht und inneren plexiformen Schicht an. Histologische Schnitte durch Retina von Hühnchenembryonen und immunhistochemisch chCAR nachgewiesen durch anti-chCAR-Antikörper (mAk12-36). OFL: optische Faserschicht. IPL: innere plexiforme Schicht. INL: innere Körnerschicht. OPL: äußere plexiforme Schicht. PhR: Photorezeptorschicht. Maßbalken entspricht 100 µm. Abbildung von Henning und Rathjen (unpubliziert).

2.7 Problemstellung

Nachdem die Rolle vom CAR als viraler Rezeptor in den letzten Jahren ausführlich untersucht wurde, blieb dessen zellbiologische Funktion weitestgehend ungeklärt. Zwar gibt es einige Anhaltspunkte, die auf eine Tätigkeit als Zelladhäsionsmolekül vermuten lassen, doch die genauen Umstände der molekularen Wechselwirkungen sind nur ungenau beschrieben worden. Im Vorfeld dieser Arbeit haben einige Experimente die Schlussfolgerung ermöglicht, dass CAR durch heterophile Interaktionen mit ECM-Glycoproteinen die zelluläre Adhäsion an basale Laminae vermittelt. Ein wichtiger Hinweis darauf ist zunächst dessen histologische Verteilung am Beispiel der embryonalen Retina, wo in frühen Stadien eine scheinbar homogene CAR-Expression vorzufinden ist (Abb. 2.3, E6), die jedoch zugunsten einer deutlichen Anreicherung in der optischen Faserschicht, welche die Axone der Ganglienzellen enthält, während späterer Stadien der embryonalen Entwicklung verloren geht (Abb. 2.3, E10 und E14). Diese Ganglienzellschicht grenzt direkt an eine basale Lamina, die vermutlich das axonale Wachstum unterstützt. Auch abseits des Nervensystems, auf Myotuben, welche von einer basalen Lamina umhüllt sind, ist CAR in der Entwicklung stark exprimiert und kolo-kalisiert mit Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) (Kröger et al., unpubliziert). Embryonale Retina-Explantate zeigen auch in Zellkulturversuchen auf sogenannten Basal-Lamina-Präparationen axonales Wachstum, das interessanterweise durch Antikörper gegen CAR blockiert werden kann (Abb. 2.4) (Kröger et al. unpubliziert). Sogar das axonale Wachstum ganzer Augen (in embryonalen Augen-Organ-Kulturen) kann durch anti-CAR-Antikörper unterdrückt werden (Schmidt et al., unpubliziert). Des weiteren gelang es zu zeigen, dass die Adhäsion embryonaler Retina-Zellen auf verschiedenen in der basalen Lamina enthaltenen ECM-Glycoproteinen, aber im besonderen auf FN durch anti-CAR-Antikörper gehemmt werden kann (Abb. 2.5) (Patzke und Rathjen, unpubliziert). Auch bereits auf FN-angehaftete Zellen, wie z.B. CAR-positive HeLa Zellen, lösen sich unter Einwirkung von anti-CAR-Antikörpern von der Kulturschale ab (Abb. 2.6) (Patzke, 2004), was höchstwahrscheinlich entweder auf eine Inhibition der Zell-FN-Interaktion oder auf eine Störung der Zellkommuni-

Einleitung

kation zurückzuführen ist. Ein zusätzliches Indiz für die scheinbare Notwendigkeit der Beteiligung der Interaktion vom CAR mit basalen Laminae, ist die Perturbation der Agrin-induzierten Aggregation der AChR auf embryonalen Myotuben durch anti-CAR-Antikörper (Kröger et al., unpubliziert). Diese Ergebnisse lassen eine Reihe von Interpretationen zu, von denen eine lautet, dass das extrazelluläre Segment vom CAR mit ECM-Glycoproteinen interagiert. Ob und wenn ja, wie genau CAR seine denkbare Funktion als Vermittler zwischen neuronalen Zellen und basalen Laminae durch mögliche direkte Interaktionen mit ECM-Glycoproteinen ausübt, soll in dieser Arbeit untersucht werden. Dabei wird aber auch die These, dass CAR ein homophiles Zelladhäsionsmolekül sei auf den Prüfstand gestellt.

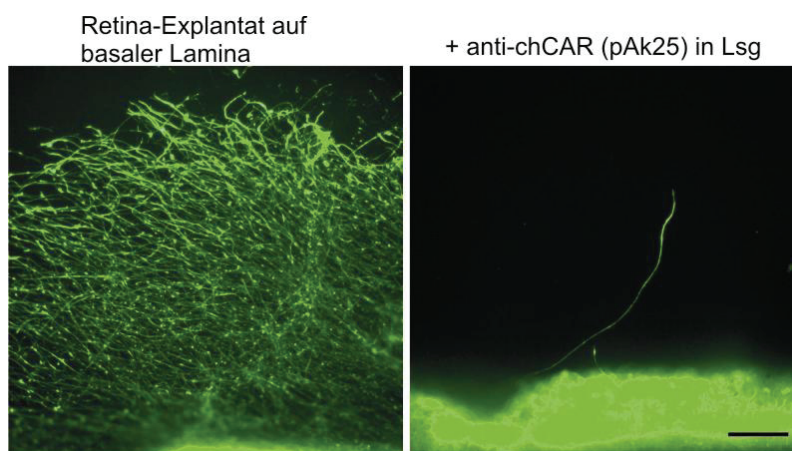
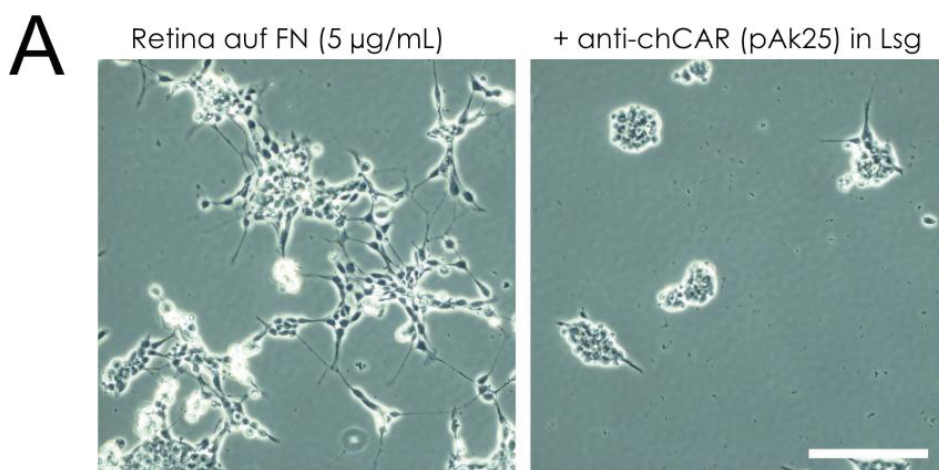


Abb. 2.4 Fab-Fragmente gegen chCAR blockieren axonales Wachstum retinaler Ganglienzellschicht. Retina-Explantat auf Basal-Lamina-Präparation in An- und Abwesenheit von anti-chCAR-Antikörpern (pAk25). Maßbalken entspricht 100 μm . Abbildung von Kröger und Rathjen (unpubliziert).



Einleitung

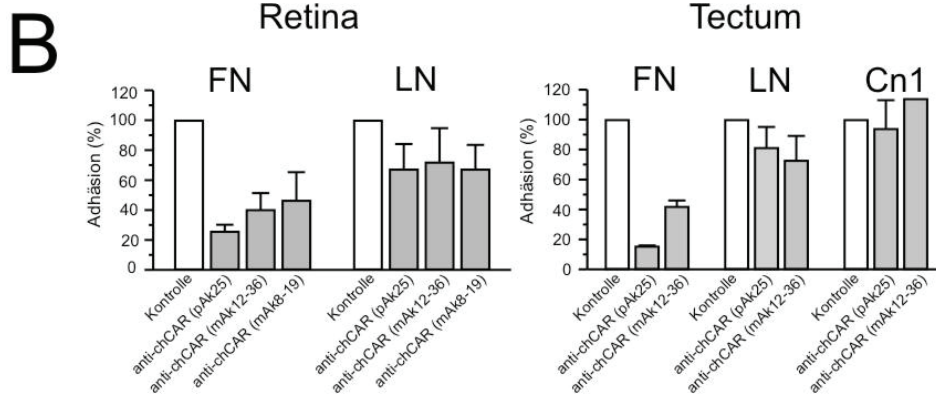


Abb. 2.5 Anti-chCAR-Antikörper blockieren Adhäsion retinaler (E8) und tectaler (E6) Zellen (Hühnchen) auf FN und Laminin-1 (LN). **A** Retinale Zellen auf FN-beschichteten Kulturschalen in An- und Abwesenheit von anti-chCAR-Antikörpern (pAk25: Fab-Fragmente). Maßbalken entspricht 100 μ m. **B** Adhärenzte retinale oder tectale Zellen auf FN-, Laminin-1- (LN) oder F11-beschichteten Kulturschalen (je 5 μ g/mL). Die stärkste Inhibition erfolgt auf FN. Abbildung von Patzke und Rathjen (unpubliziert).

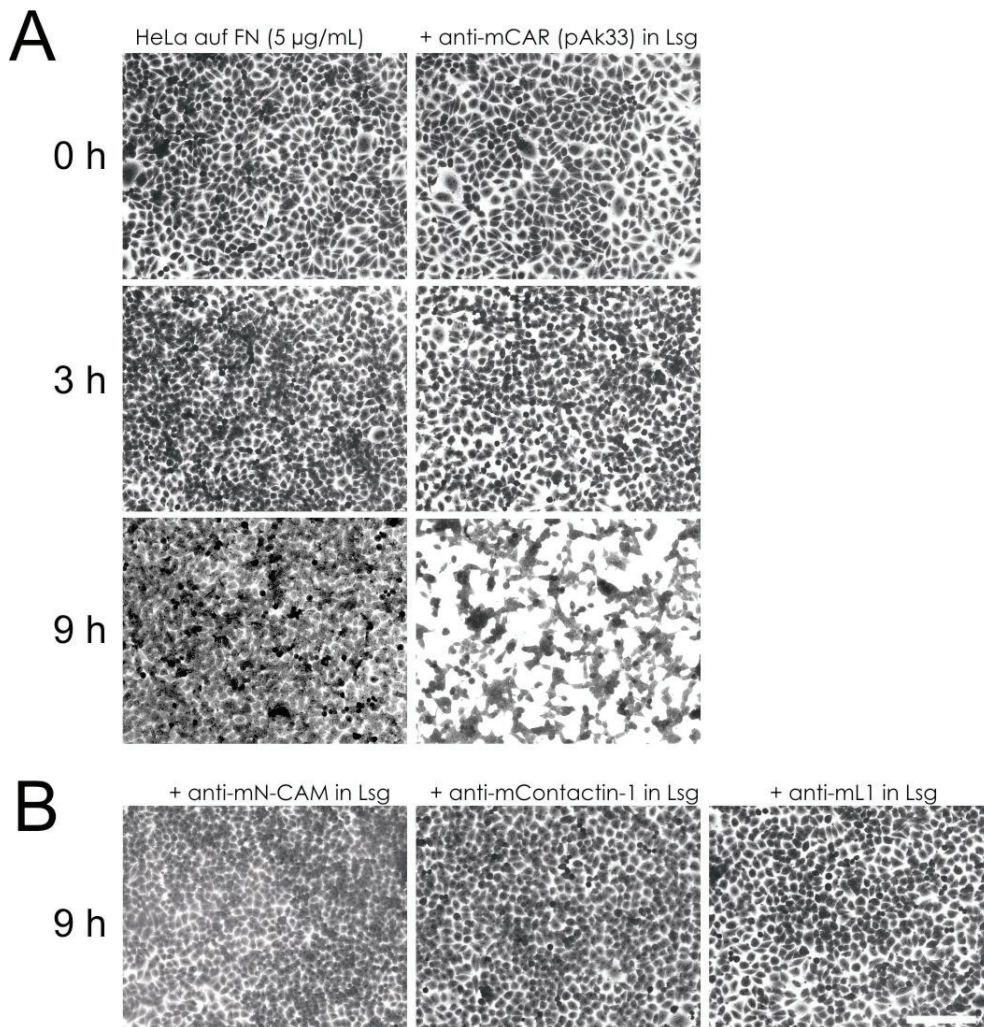


Abb. 2.6 Anti-mCAR-Antikörper bewirken Ablösen der HeLa Zellen von FN-beschichteten Kulturschalen. **A** Konfluente HeLa Zellen, adhäriert auf FN (5 μ g/mL), verändern in Gegenwart von anti-mCAR-Antikörper (Fab-

Einleitung

Fragmente von pAk33: 0,5 mg/mL) zunächst ihre Morphologie und lösen sich schließlich von der Matrix. **B** Antikörper gegen mNCAM, mContactin-1 und mL1 (je 1 mg/mL) haben nicht diesen Effekt. Maßbalken entspricht 100 μm . Abbildung nach Patzke (2004).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Bezeichnung

Acrylamid

bActin

ch α -Actinin

Ammoniumpersulfat (APS)

Bacto-Hefeextrakt

Bacto-Trypton

bovines Plasma

bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V

5-Brom-4-chlor-3-indolylphos-

phat-p-toluidinsalz (BCIP)

Coomassie Brilliant Blue R250

Diethylamin Hydrochlorid (DEA)

DL-Dithiothreitol (DTT)

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

bFibronektin

hFN-Fragment 120 kDa (FN-120-kDa)

hFN-Fragment 40 kDa (FN-40-kDa)

hFN-Fragment 70 kDa (FN-70-kDa)

Gelatine Typ A (aus Schweine-Haut)

Glutathion, reduziert

Glycin

Größenstandards für SDS-PAGE

Hersteller

Bio-Rad, München

Cytoskeleton, Denver (USA)

Sigma Aldrich, Deisenhofen

GE Healthcare, München

Beckton Dickinson, Erembodegem-Aalst (Belgien)

Beckton Dickinson, Erembodegem-Aalst (Belgien)

Rockland, Gilbertsville (USA)

Biomol, Hamburg

Carl Roth, Karlsruhe

Bio-Rad, München

Sigma Aldrich, Deisenhofen

Sigma Aldrich, Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Sigma Aldrich, Deisenhofen

Chemicon / Millipore, Billerica (USA)

Chemicon / Millipore, Billerica (USA)

Sigma Aldrich, Deisenhofen

Sigma Aldrich, Deisenhofen

Roche, Basel (Schweiz)

Merck, Darmstadt

Bio-Rad, München

Material und Methoden

mLaminin-1	Invitrogen, Washington DC (USA)
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Natrium-Dodecylsulfat (“Sodium dodecyl sulfate”: SDS)	Bio-Rad, München
Natrium-Deoxycholat (DOC)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT)	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (Dulbecco) Calcium- und Magnesiumfrei 10x	Biochrom, Hamburg
Piperazin Diacrylamid (PDA)	Bio-Rad, München
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	GE Healthcare, München
Terrific Broth	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
α / β Tubulin	Cytoskeleton, Denver (USA)

Alle nicht gesondert aufgeführten, aber verwendeten Standardchemikalien wurden bei folgenden Firmen erworben: Bio-Rad, Carl Roth, GE Healthcare, Gibco, Merck, Roche oder Sigma Aldrich.

3.1.2 Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
„Pierce ECL Western Blotting Substrate“ (Chemilumineszenzsubstrat zur Detektion von Meerrettich-Peroxidase-Aktivität)	Pierce, Rockford (USA)
„Gel Extraction Kit“ (Plasmid-Isolation aus Agarose)	Qiagen, Hilden
„Plasmid Maxi Kit“, „Plasmid Midi Kit“ (Plasmid-Präparation aus Bakterien)	Qiagen, Hilden

3.1.3 Puffer und Lösungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Aktin-Puffer	4 mM NaPO ₄ pH 7,45
	0,1 mM ATP

Material und Methoden

Alkalische Phosphatase (AP-) Puffer	100 mM	Tris-HCL pH 9,7
	5 mM	MgCl ₂
	0,01 mM	ZnCl ₂
Alkalische-Phosphatase-Entwickler	0,165 mg/mL	NBT
	0,825 mg/mL	BCIP in AP-Puffer
Chloroquin-Lösung (100 mL)	89 mL	H ₂ O
	10 mL	Lösung A
	1 mL	Lösung B
	0,516 g	Chloroquin
Coomassie-Färbelösung	500 mL	Methanol
	100 mL	Essigsäure
	500 mL	H ₂ O
	2,5 g	Coomassie Brilliant Blue R250
Coomassie-Entfärbelösung	500 mL	Methanol
	100 mL	Essigsäure
	500 mL	H ₂ O
Denaturierungspuffer	25 mL	PBS 10x
	25 mL	10 % (w/v) DOC
	1 mM	DTT
	+	Proteaseinhibitoren
	ad 250 mL	8 M Harnstoff
Dextran-Lösung	10 mg/mL	DEAE-Dextran in TBS
Laufpuffer (für SDS-PAGE)	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS

Material und Methoden

Lösung A	80 g/L	NaCl
	3,8 g/L	KCl
	2,5 g/L	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O
	30 g/L	Tris
	+	mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Lösung B	19,8 g/L	CaCl ₂ ·H ₂ O
	21,3 g/L	MgCl ₂ ·H ₂ O
Lösung W	10 % (v/v)	Ethanol
	5 % (v/v)	Essigsäure
Milchlösung (Blockpuffer)	4 % (w/v)	Magermilchpulver in PBS / Tween 20
PBS / Tween 20	1x	PBS
	0,5 % (v/v)	Tween 20
PBS / EDTA	1x	PBS
	1 mM	EDTA
Ponceau-Färbelösung	2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (v/v)	Perchlorsäure
Proteaseinhibitoren	5 mM	Pepstatin A
	5 mM	Leupeptin
	20 u/μL	Aprotinin
	100 mM	PMSF
SDS-Probenpuffer (5x)	62,5 mM	Tris pH 6,8
	25 mM	EDTA pH 6,8
	5 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol

Material und Methoden

	0,025 % (v/v)	Bromphenolblau
	50 % (v/v)	Glyzerin
Transfektionsansatz (20 mL)	200 µL	Chloroquin-Lösung
	10 µg	DNA
	1 mL	DEAE-Dextran-Lösung
	ad 20 mL	DMEM / 2 % Ultrosor G
Transfer-Puffer	20% (v/v)	Methanol
	in	Laufpuffer (ohne SDS)
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
Trypsin-Blockierungslösung	25 mg	Trypsin-Inhibitor (aus Eiweiß)
	25 mg	BSA
	100 µg	DNase
	ad 10 ml	H ₂ O
Tubulin-Puffer	80 mM	PIPES pH 6,9
	0,5 mM	EGTA
	2 mM	MgCl ₂

3.1.4 Zellkulturmedium

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein

3.1.5 Zellkulturmediumzusätze

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>verwendete Konzentration</u>
fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Eggenstein;	

Material und Methoden

	Biochrom, Hamburg	10 %
B27	Gibco, Eggenstein;	1 %
N2	Gibco, Eggenstein;	1 %
Ultroser G	PALL, Dreieich	2 %
G418	Roche, Basel (Schweiz)	1 mg/mL

3.1.6 Bakterienkulturmedien

Luria-Bertani (LB)	Terrific Broth (TB)	2xYTG
10 g/L Bactotrypton	12 g/L Bactotrypton	16 g/l Bactotrypton
5 g/L Hefeextrakt	24 g/L Hefeextrakt	10 g/l Hefeextrakt
5 g/L NaCl	4 mL/L Glycerin	5 g/l NaCl
	2,3 g/L KH ₂ PO ₄	pH auf 7,0 einstellen
	12,5 g/L K ₂ HPO ₄	nach autoklavieren:
		2 % Glucose

Tab 3.1 Zusammensetzung verschiedener in dieser Arbeit verwendeter Bakterienkulturmedien.

Für LB-Agar wurden 6 g Agar-Agar zu je 400 ml LB gegeben und anschließend autoklaviert.

3.1.7 Antibiotika / Antimycotika

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>	<u>verwendete Konzentration</u>
Penicillin / Streptomycin	Gibco, Eggenstein	100 u/mL / 100 µg/mL
Amphotericin B	Gibco, Eggenstein	250 ng/mL
Ampicillin	Serva, Heidelberg	100 µg/mL
Tetrazyklin	Boehringer, Mannheim	10 µg/mL

3.1.8 Oligonukleotide

Bezeichnung	benötigt zur Herstellung von	Sequenz (5' → 3')
md1fwecor1-22	mCAR D1 122 und mCAR D1 213	ggg gaa ttc ATC ACT ACA CCC GAA CAG AGG
md1revsal1-140	mCAR D1 122	ggg gtc gac TCA TCA CTT AAC AAG AAC GGT CAG C
md1revsal1-144	mCAR D1 213	ggg gtc gac TCA TCA TGT ACC TGA AGG CTT AAC A
mCARD2fw+EcoRI	mCAR D2	ggg gaa ttc CCT TCA GGT ACA AGA TGC TTC G
mCARD2rev+Sall	mCAR D2	ggg gtc gac TCC GGC TCG GTT GGA GGG TGG G
chCARD1fw+EcoRI	chCAR D1	ggg gaa ttc CTA AGT ATA ACT TCA GCT GAA T
chCARD1rev+Sall	chCAR D1	ggg gtc gac CTT TAC AAG TAC GTT CAA CTG T
chCARD2fw+EcoRI	chCAR D2	ggg gaa ttc CCA GCA AGC ACT AAA TGC TCC A
chCARD2rev+Sall	chCAR D2	ggg gtc gac ACC AGC TGT ATT TAT AGG AGG G
mSIVfw+EcoRI	mCAR _{cyt} SIV	ggg gga att cAG GAA ACG CAG AGA AGA GAA GTA CGA G
mSIVrev+Sall	mCAR _{cyt} SIV	ggg ggtc gac CTA TAC TAT AGA CCC GTC CTT GCT CTG
12-36Fcfw+EcoRI	chCAR _{ohne Fc} und chCAR _{ohne Fc} degl	ggg gaa ttc atg gaa ccg ccg ccg ttg
1236Fcrev+PrEcoRI	chCAR _{ohne Fc} und chCAR _{ohne Fc} degl	ggg gaa ttc cgg gcc cct gga aca gaa ctt cca gAG CTG TAT TTA TAG GAG GG

Tab 3.2 Zur Herstellung von CAR-Domänen verwendete Oligonukleotide. Kleine Buchstaben: Endonukleaseschnittstelle, codierend für proteolytische Schnittstelle oder zur Optimierung des GC-Verhältnisses hinzugefügte Nukleotide. Großbuchstaben: für CAR-codierende Sequenz. Primer wurden ausschließlich von der Firma MWG bezogen.

3.1.9 Vektoren

pGEX-6P-1

pIG

pIG plus mCAR-Fc

pGBT9 12-36

pGBT9 mCAR SIV

GE Healthcare, München
(Simmons, 1993)

Henning, unpubliziert

Henning, unpubliziert

Henning, unpubliziert

Material und Methoden

pGBT9 mCAR TVV	Henning, unpubliziert
pSG5 12-36	Henning, unpubliziert
pSG5 mCAR SIV	Henning, unpubliziert

3.1.10 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

DH5 α (F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA11</i> Δ (argF- <i>lacZYA</i>) U169 f80 <i>dlacZ</i> Δ M 15 λ -)	Clontech / Takara (Verteiler: ITC Biotechnology, Heidelberg)
--	--

BL21 (F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal</i>)	GE Healthcare, München
---	------------------------

3.1.11 Eukaryontische Zelllinien

HeLa	ATCC / LGC, Wesel
HEK 293	ATCC / LGC, Wesel
NIH 3T3	ATCC / LGC, Wesel
CHO	ATCC / LGC, Wesel
COS-7	ATCC / LGC, Wesel

3.1.12 Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Referenz / Hersteller</u>
pAk anti-mContactin-1	(Rathjen et al., 1987)
pAk anti-mN-CAM	Rathjen, unpubliziert
pAk anti-mL1	(Rathjen und Schachner, 1984)
pAk anti-chNg-CAM (Rb4030)	(Rathjen et al., 1987)
pAk anti-mCARextra (Rb32)	(Armin A.Dorner, 2001)

Material und Methoden

pAk anti-mCARextra (Rb33)	(Armin A.Dorner, 2001)
pAk anti-mCAR-Fc (Rb79)	(Dorner et al., 2005)
pAk anti-chCAR (elektroeluiertes Immunaффinitätsisolat) (Rb25)	Rathjen, unpubliziert
pAk anti-chCAR (Immunaффinitätsisolat) (Rb40)	Rathjen, unpubliziert
pAk anti-chCAR-Fc (Rb54)	Rathjen, unpubliziert
mAk anti-chCAR (mAk12-36)	(Juttner et al., 2005)
pAk anti-GST	Rathjen, unpubliziert
pAk anti-chAgrin (Rb46)	(Annie et al., 2006)
mAk anti-chAgrin (mAk5B1)	(Kröger)
mAk anti- β 1-Integrin (W1B10)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
pAk anti-FN	Sigma Aldrich, Deisenhofen
pAk anti-huFc (Rb)	Dianova, Hamburg

Alle sekundären Antikörper wurden von der Firma Dianova (Hamburg) erworben.

3.1.13 Enzyme

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
β -N-Acetylglucosaminidase	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Faktor Xa	Roche, Basel (Schweiz)
β (1-4) Galactosidase	Sigma Aldrich, Deisenhofen
O-Glycosidase	Sigma Aldrich, Deisenhofen
α -2 (3, 6, 8, 9) Neuraminidase	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Pfu-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim
PNGaseF	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Prescission-Protease	GE Healthcare, München
Proteinase K	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Ligase	Fermentas, St. Leo-Rot
Taq-Polymerase	Takara (Verteiler: ITC Biotechnology, Heidelberg)

Material und Methoden

Trypsin (0,5 %) / EDTA 10x

Gibco, Eggenstein

3.1.14 Mausstamm

Der genetische Hintergrund mCAR-defizienter Mäuse ist Bl6 / Ola 129.

3.1.15 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Herstellerbezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Anionenaustauschersäule	Mono Q HR 5/5	GE Healthcare, München
Anionenaustauschersäule	Mono Q PC 1.6/5	GE Healthcare, München
Anionenaustauschersäule	Source 15 Q HR 5/5	GE Healthcare, München
Anionenaustauschersäule	Bioscale Q2	Bio-Rad, München
Brutschrank (für Hühner-Eier)	BSS 160	EHRET, Emmendingen
Brutschrank (für Zellkultur)	Kelvitron	Heraeus, Hanau
FPLC-Anlagen	Biologic HR	Bio-Rad, München
	SMART	GE Healthcare, München
Gelfiltrationssäulen	Superdex 200 HR 10/30	GE Healthcare, München
	Superose 6 PC 3.2/30	GE Healthcare, München
Heparinsäule	Hitrap affinity column	GE Healthcare, München
Kationenaustauschersäule	Source 15 S	GE Healthcare, München
Magnetrührer	Ilkamag Reo	WTW, Weilheim
Mikroskope	Telaval 31	Zeiss, Jena
	Axiovert 135	Zeiss, Jena
	Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Netzgerät	BIO-RAD Power Pac 300	Bio-Rad, München
pH-Meter	pH525	WTW, Weilheim
Photometer	Biophotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Pumpe	Eco Pump	Bio-Rad, München
Rotoren für RC5B	SS3 4	Sorvall, Bad Homburg
	GS 3	Sorvall, Bad Homburg
	SLA 1500	Sorvall, Bad Homburg

Material und Methoden

SDS-Page-Apparatur	Protean II	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	DU-7000	Beckman, München
Sterilwerkbank		BDK, Sonnenbühl
Thermocycler	PCR-Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer		Eppendorf, Hamburg
Ultrafiltrationszelle und Filter		Amicon / Millipore, Billerica (USA)
Vortexer	CERTOMAT MV	WTW, Weilheim
Waagen	AE200 und PM4800	Mettler, Giessen
Western-Blot-Apparatur	Protean II	Bio-Rad, München
Zellzählgerät	Coulter-Counter	Beckman, München
Zentrifugen	RC5B	Sorvall, Bad Homburg
	Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge 13	Heraeus, Hanau
	RC M120 und Ultra Pro 80	Sorvall, Bad Homburg

3.1.16 Kulturschalen für Primärkulturen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Lumox Dish hydrophil	Greiner bio-one, Solingen

3.1.17 Säulenmatrices für Affinitätschromatographie

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Protein-A-Sepharose CL 4B	GE Healthcare, München
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, München
Benzamidin-Sepharose 4B	GE Healthcare, München
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	GE Healthcare, München
Affigel 10	Bio-Rad, München
mAk12-36 (ca. 15 mg) an Affigel 10	Rathjen, unpubliziert
mAk5B1 an Affigel 10	Kröger

3.1.18 Software und Internet-Ressourcen

<u>Verwendungszweck</u>	<u>Bezeichnung / Hersteller / Internetadresse</u>
DNA-Bearbeitungssoftware	DNASTAR (Lasergene, Madison (USA))
Tabellenkalkulation / Diagrammerstellung	Excel 2002 (Microsoft, Unterschleißheim)
Tabellenkalkulation / Diagrammerstellung	Origin 7 (Originlab, Northampton (USA))
Photographie	Axio-Vision 3.1 (Zeiss, Jena)
Auswertung Fotos kultivierter Neuronen	ITEM (Olympus, Hamburg)
Textverarbeitung	Word 2002 (Microsoft, Unterschleißheim)
Erstellung der Abbildungen	CorelDRAW X3 (Corel, Ottawa (Kanada))
Statistische Analyse	StatView 4.57 (Abacus Concepts, Berkeley (USA))
Swiss-Prot-Datenbank und Proteinanalyse-Programme	www.expasy.org
NCBI-Datenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 PCR

Mit dem Ziel bestimmte Proteine eukaryontisch oder prokaryontisch herzustellen, mussten die codierenden DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Um *in vitro* DNA zu vermehren wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion angewendet (Mullis und Faloona, 1987). 30-35 Zyklen wurden durchgeführt. Ein Zyklus bestand aus:

Material und Methoden

Schritt	Temperatur	Dauer
Hitzedenaturierung der Matrizen-DNA	95 °C	45 s
Primeranlagerung	5 °C weniger als Schmelztemperatur des Primers	45 s
Kettenverlängerung	72 °C	2 min/kb

Tab. 3.3 typischer PCR-Zyklus.

Der Standard PCR-Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

37 µL H ₂ O
5 µL Pfu-Polymerase 10x Reaktionspuffer
4 µL dNTPs (je 25 mM)
1 µL Primer 1 (zu 100 ng/µL)
1 µL Primer 2 (zu 100 ng/µL)
1 µL Pfu-Polymerase (zu 2,5 u/µL)
1 µL DNA-Matrize (100 µg/mL)

Tab. 3.4 Pipettierschema eines PCR-Ansatzes in 50µL.

Zur Bestimmung des Gentotyps von Embryonen trächtiger heterozygot-*mCAR*-defizienter Mäuse wurde ebenfalls die PCR angewendet. Die genaue Durchführung ist an anderer Stelle dokumentiert (Armin A.Dorner, 2001).

3.2.1.2 DNA-Fällung

Um die aus der PCR stammende vermehrte DNA zu isolieren, wurde diese gefällt. Dazu wurden 1/10 der Volumens der DNA-haltigen Lösung 3 M Na-Acetat (pH 4,8-5,2) sowie das 2,5fache des Volumens Ethanol (-20 °C) hinzugefügt und für 30 min bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt 13 000 rpm für 30 min in der Eppendorffzentrifuge bei 4 °C. Das entstandene Präzipitat wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in H₂O aufgenommen.

3.2.1.3 Restriktionsspaltung von DNA

Die Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgte ausschließlich nach Herstellerangaben (z.B. von Fermentas).

3.2.1.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation der DNA aus Agarosegelen wurde das „Gel Extraction Kit“-System gemäß Herstellerangaben verwendet (Qiagen).

3.2.1.5 Kompetente Bakterien, Ligation und Transformation

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen erfolgte nach der „Frozen Storage III“-Methode (Hanahan, 1985).

Für die Ligation wurde die jeweilige Vektor-DNA nach der Restriktionsspaltung zur Abspaltung des 5'-Phosphatrestes mit Alkalischer Phosphatase für 1h bei 37 °C behandelt.

Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit der T4-DNA-Ligase (von Fermentas).

Zur Transformation wurden kompetente Bakterien (100 µL) auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Ligationsansatzes 20 min auf Eis inkubiert. Nach 2 minütiger Erwärmung auf 42 °C, wurde für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde der Ansatz auf 500 µL mit LB-Medium aufgefüllt und für 1h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden Aliquots des Transformationsansatzes auf entsprechenden Selektivmedien ausplattiert.

3.2.1.6 Plasmid-DNA Präparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Plasmid Midi Kit“ oder dem „Plasmid Maxi Kit“ nach Herstellerangaben (von Qiagen).

3.2.1.7 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen zu Kontrollzwecken wurden ausschließlich von der Firma MWG vorgenommen. Die Sequenzen wurden mit der Software „DNASTAR“ analysiert.

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 SDS-PAGE und Western Blot

3.2.2.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für alle Versuche wurden die Polyacrylamid-Gele so hergestellt, dass zunächst 3,6 ml Trenngel zwischen zwei gesäuberte Glasplatten gegossen wurde und dann mit Wasser überschichtet wurde. Anschließend (nach ca. 20 min Polymerisationszeit) wurde das Trenngel nach Entfernung des Wassers mit etwa 1 ml Sammelgel überschichtet. In Ethanol gebadete Kämme wurden eingesetzt, um Taschen für den Probenauftrag zu erhalten, was ein maximales Auftragungsvolumen der Proben von etwa 25 µl pro Tasche ermöglichte. Dieses zweistufige Gelsystem erlaubt es, die Proben im Sammelgel bis zur Phasengrenze zum Trenngel anzusammeln und so den Eintritt der Proteine in das Trenngel einheitlich erfolgen zu lassen.

Die Proteinproben wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und für etwa 5 min in kochendem Wasser denaturiert. Zum Vergleich der Molekulargewichte wurde parallel zu den Proben immer ein Marker aus Standardproteinen (mit bekannter molekularer Masse) aufgetragen. Alle Gele liefen bei einer Spannung von 150 V für 60 min.

Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Material und Methoden

Substanz	Trenngel 7,5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel
30 % Acrylamid / 0,8 % PDA	2,5 mL	3,3 mL	0,65 mL
1 M TRIS pH 8,8	3,75 mL	3,75 mL	-
1 M TRIS pH 6,8	-	-	0,65 mL
10 % SDS	0,1 mL	0,1 mL	0,05 mL
H ₂ O	3,6 mL	2,8 mL	3,7 mL
10 % APS	0,05 mL	0,05 mL	0,025 mL
TEMED	0,005 mL	0,005 mL	0,005 mL

Tab 3.5 Zusammensetzung einiger verschiedener Gele für die SDS-PAGE.

3.2.2.1.2 Western Blot

Im Anschluss an die Größenaufreinigung der Proteine im SDS-PAGE wurden diese in einem elektrischen Feld (100 V für 60 min) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert („geblottet“). Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und die Markerproteine mit einem Bleistift gekennzeichnet. Nach dem Entfärben in PBS folgte die Blockierung freier Bindungsstellen mit Blocklösung. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (0,1-5 µg/mL) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit Waschpuffer wurde der sekundäre Antikörper den Herstellerangaben entsprechend hinzugefügt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Wiederholung der Waschschrritte wurde entweder mit entweder mit BCIP / NBT in AP-Puffer oder dem Chemilumineszenzsubstrat (von Pierce) entwickelt.

3.2.2.2 Färben der Polyacrylamid-Gele

Alternativ zum Western-Blot wurden die Proteine auch direkt im Gel durch Coomassie- oder Silbernitratfärbung nachgewiesen.

3.2.2.2.1 Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag^+ der Komplexe zu Ag.

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 20 min in 50 mL Methanol-, TCA-, CuCl_2 -Lösung fixiert, anschließend in Lösung W für 10 min gewaschen und für 10 min in KMnO_4 -Lösung 0,01 % (w/v) geschüttelt; danach noch mal zweimal für je 5 min mit Lösung W gewaschen und darauf für 10 min in 10 % Ethanol gespült; dann für wiederum 10 min in H_2O gewaschen und für 10 min in 0,2 % AgNO_3 geschüttelt. Als nächstes wurde das Gel für 20 s mit H_2O gespült, um dann für 1 min in 10 % (w/v) K_2CO_3 geschüttelt zu werden. Das Entwickeln erfolgte in Entwickler-Lösung (0,01 % (v/v) Formaldehyd 2 % (w/v) K_2CO_3), so lange bis die Protein-Banden ausreichend stark angefärbt erschienen. Zur Beendigung der Entwicklung wurde das Gel für 10 min in Lösung W getränkt, um dann in H_2O transferiert zu werden. Zur Aufbewahrung des Gels wurde es zwischen zwei durchsichtigen Cellophanfolien für 45 min auf einem Heizblock liegend unter ständigem Luftabsaugen getrocknet.

3.2.2.2.2 Coomassie-Färbung

Ebenfalls direkt nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 1h in Coomassie-Färbelösung getränkt und anschließend so lange mit Entfärbelösung entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren.

3.2.2.3 Fast performance liquid chromatography – FPLC

Alle Gelfiltrations- oder Ionenaustauscherschritte sowie die Aufreinigung von FN an Heparin-Sepharose wurde mittels FPLC bei 4 °C vorgenommen. Die Flussrate im Biologic-System betrug 0,5 mL/min oder im SMART-System 0,04 mL/min.

3.2.2.3.1 Gelfiltration

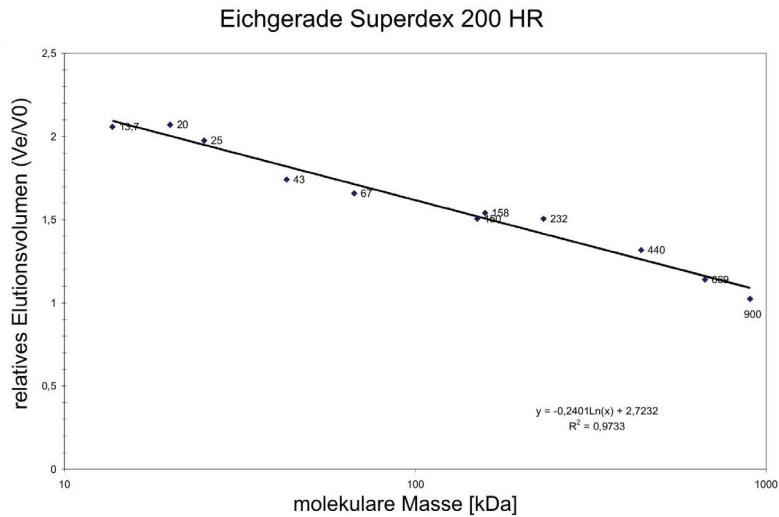
Die Gelfiltration oder Größenausschlusschromatographie trennt Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße. Als Gelfiltrationssäulen wurden die Superdex 200 HR für das Biologic-System und die Superose 6 PC 3.2/30 für das SMART-System verwendet. Als Lösungsmittel wurde bei allen Gelfiltrationsläufen PBS-Puffer verwendet. Ansonsten wurde nach Herstellerangaben verfahren.

3.2.2.3.2 Eichung der Gelfiltrationssäulen

Um molekulare Massen mit Hilfe der Gelfiltration abzuschätzen, wurden in jeweils unabhängigen Läufen Proteinstandards (Abb. 3.1) von GE Healthcare (gemäß Herstellerangaben) auf die verwendeten Gelfiltrationssäulen aufgetragen. Das Ausschlussvolumen jeder Säule wurde durch Blue Dextran 2000 (GE Healthcare) ermittelt. Aus dem Verhältnis Elutionsvolumen zu Ausschlussvolumen ergibt sich das relative Elutionsvolumen jedes Proteins, welches unabhängig vom Säulenvolumen ist.

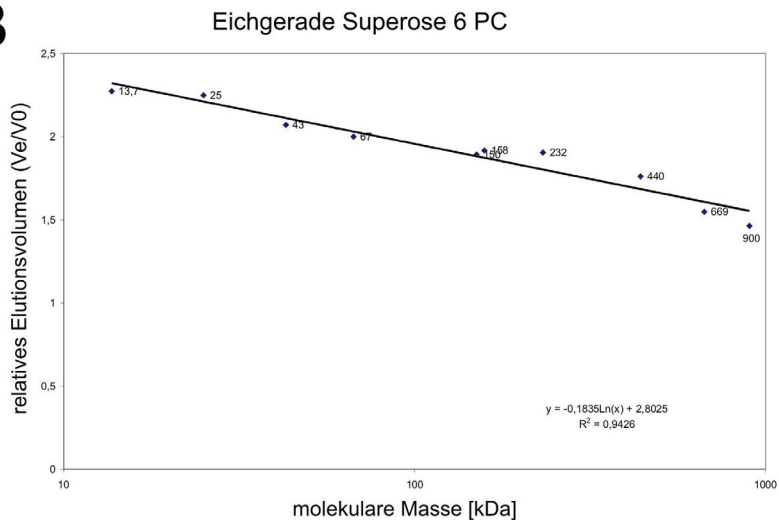
Material und Methoden

A



Protein	Elutionsvolumen (Ve) [mL]	rel Ve (Ve/V0)	molekulare Masse [kDa]
IgM	8,7	1,02	900
Thyroglobulin	9,7	1,14	669
Ferritin	11,2	1,32	440
Catalase	12,8	1,51	232
Aldolase	13,1	1,54	158
IgG	12,8	1,51	150
Albumin	14,1	1,66	67
Ovalbumin	14,8	1,74	43
Chymotrypsinogen A	16,8	1,98	25
Trypsin	17,6	2,07	20
Ribonuclease A	17,5	2,06	13,7

B



Protein	Elutionsvolumen (Ve) [mL]	rel Ve (Ve/V0)	molekulare Masse [kDa]
IgM	1,23	1,46	900
Thyroglobulin	1,3	1,55	669
Ferritin	1,48	1,76	440
IgG	1,59	1,89	150
Catalase	1,6	1,90	232
Aldolase	1,61	1,92	158
Albumin	1,68	2,00	67
Ovalbumin	1,74	2,07	43
Chymotrypsinogen A	1,89	2,25	25
Ribonuclease A	1,91	2,27	13,7

Abb. 3.1 Eichung der Gelfiltrationssäulen Superdex 200 HR (A) und Superose 6 PC 3.2/30 (B). **A** und **B** Eichgeraden sowie Listen der zur Erstellung der Eichgeraden verwendeten Proteine mit zugehörigen Elutionsvolumi-

Material und Methoden

na, relativen Elutionsvolumina und vom Hersteller (GE Healthcare) mitgeteilter molekularer Massen. y gibt die Gleichung der Eichgeraden an und R^2 steht für das Bestimmtheitsmaß.

3.2.2.3.3 Ionenaustauscherchromatographie

Die Anionenaustauscher- und Kationenaustauscherchromatographie erfolgten gemäß Herstellerangaben (GE Healthcare).

3.2.2.3.4 Reinigung von FN mittels Heparin-Sepharose

Die Reinigung von FN mittels Heparin-Sepharose an der Biologic-FPLC erfolgte nach Herstellerangaben (GE Healthcare).

3.2.2.4 Affinitätschromatographie ohne Hochdruck

Affinitätschromatographische Schritte erfolgten mit der „Eco Pump“ bei 4 °C. Die Flussraten variierten zwischen 0,2 und 1 mL/min. Als Säulen für die jeweils verwendeten Matrices dienten Spritzenhülsen.

3.2.2.5 Expression von GST-Fusionsproteinen

Da der *Escherichia coli* Stamm BL21 über eine geringe Transformationseffizienz verfügt wurde das Expressionskonstrukt zunächst im Stamm DH5 α vermehrt und anschließend in BL21 zur Expression gebracht. Letzteres erfolgte bei 37 °C oder Raumtemperatur bei 200 rpm in 2xYTG oder TB-Medium für 4-16 h nach IPTG-Induktion (1 mM).

3.2.2.6 Lyse von bakteriell gewonnenen Proteinen

Alle hier bakteriell hergestellten extrazellulären CAR-Domänen wurden in „inclusion bodies“ angereichert und wurden mittels Harnstoffdenaturierung (Denaturierungspuffer) in Lösung gebracht. Nach Abtrennung unlöslicher Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde das Lysat durch Dialyse gegen PBS renaturiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die GST-markierten Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie isoliert. Alle anderen hier bakteriell hergestellten Fusionsproteine waren Triton-X-100-löslich und konnten gemäß Angaben von GE Healthcare gereinigt werden.

3.2.2.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Bei Proben, deren Proteinkonzentration bestimmt werden sollte, wurde die Absorption bei 280 nm im Photometer gemessen, und mit einem theoretischen Referenzwert verglichen. Bei Proteingemischen entspricht eine Absorption von 1,25 einer Konzentration von 1 mg/mL. Kaninchen IgG's haben bei einer Absorption von 1,4 eine Konzentration von 1 mg/mL. Und BSA – Lösungen haben bei einer Absorption von 0,6 eine Konzentration von 1 mg/mL. Bei allen anderen gereinigten Proteinen wurde der Extinktionskoeffizient mit Hilfe des Computer-Programms „Protparam“ (im Internet unter www.expasy.org) bestimmt.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Kultivierung von HeLa, CHO, COS-7, HEK 293 und NIH 3T3 Zellen

HeLa, CHO, COS-7 und NIH 3T3 Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Konfluente Zellen wurden passagiert, indem das Medium abgesaugt und durch PBS/ EDTA oder Trypsin (0,05 %) / EDTA ersetzt wurde. Nach etwa 10 min Inkubationszeit im 37 °C-Inkubator konnten die am Boden des Kulturgefäßes anhaftenden Zellen abgespült und im Verhältnis 1:10 mit DMEM und 10 % FCS in einer neuen Kulturflasche kultiviert werden.

3.2.3.2 Beschichtung von Kulturschalen

Die Beschichtung verlief entweder so, dass jeweils in die Mitte der Schalen ein Tropfen von 2 μL in PBS gelösten Proteinen pipettiert wurde (Abb. 5.41 (a)), die Schalen für 1 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt, so dass der Tropfen in seiner Form erhalten bleibt, daraufhin der Tropfen entfernt, die Schale einmal gewaschen und dann für 1 h bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit mit BSA 5 mg/mL HBSS blockiert wurde. In einem alternativen Verfahren wurde die gesamte Fläche des Kulturgefäßbodens (Durchmesser: 0,5 cm) mit 60 μL beschichtet und für 16 h bei 4 °C aufbewahrt, danach gewaschen und wie beschreiben mit BSA abgesättigt. Anschließend wurden die Schalen mit Serum-freien DMEM gewaschen und die Zellen ausgesät.

3.2.3.3 Präparation und Kultivierung embryonaler Neuronen

Maus-Neuronen wurden aus dem Hirnstamm sowie Mittelhirn (welches auch die Colliculi also das Tectum enthält) von Embryonen am E11 gewonnen, da diese Bereiche besonders gut zugänglich waren, um neurales Gewebe freizulegen, ohne gleichzeitig epitheliale oder sonstige nicht neurale Zellen zu isolieren. Hühnchen-Neuronen wurden aus der Retina (E8) oder dem Tectum (E6) bzw. Telencephalon (E6) isoliert. Die unterschiedlichen Gewebe wurden mit Trypsin (0,05 %) / EDTA behandelt, mit DMEM / 10 % FCS gewaschen und anschließend mit Kapillaren unterschiedlichen Durchmessers trituiert. Es folgte erneut ein Waschschritt mit DMEM, um Serumproteine herauszuwaschen. Auf den mit FN (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Laminin-1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FN-120-kDa (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oder FN-40-kDa (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) beschichteten Kulturschalen wurden 5×10^5 Zellen/mL in DMEM ausgesät. Maus-Neuronen wurde B27 (1:100) und Hühnchen-Neuronen N2 (1:100) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit für 24 oder 48 h. Fixiert wurde mit 3,75 % Formaldehyd.

3.2.3.4 Auswertung neuraler Kulturen

Neuronen aus *in vitro* Versuchen wurden so ausgewertet, dass von jeder Zellkultur sieben, sechs oder drei zufällige Fotos mit dem 10er Objektiv (Axiovert 135) im Phasenkon-

Material und Methoden

trast (+ je ein Bild mit UV-Licht von der Hoechst-Färbung (bis-benzimid H 33258)) gemacht wurden. Woraufhin die Bilder (mittels der Software „ITEM“ (Olympus)) auf Anzahl der Zellen, Anzahl der in Aggregaten vorliegenden Zellen und Neuritenlängen vermessen wurden. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Neuritenlänge je Zelle wurde die Summe aller Neuriten auf einem Bild geteilt durch die Anzahl der Zellen auf diesem Bild und daraus wiederum der Mittelwert von allen gemachten Fotos je Kultur ermittelt. Die Werte wurden zum besseren Vergleich auf den Kontrollwert oder Wildtypwert normalisiert.

Obwohl die Zellen, nachdem sie sich auf dem Boden abgesetzt haben, nicht mehr in Suspension sind, ist doch eine Beweglichkeit nach dem Adhärenz vorhanden, was eine Beurteilung der homotypischen Aggregation erlaubt. Als in Aggregaten vorliegende Zellen wurden solche gewertet, welche in einem Verband von mehr als drei Zellen (deren Somata im direkten Kontakt zueinander sind) auf FN- und FN-Fragmenten- (sowie D1- oder D2-) beschichteten Kulturschalen oder mehr als fünf Zellen auf Laminin-1-beschichteten Kulturschalen vorlagen.

3.2.3.5 Auswertung von HeLa-Zell-Adhäsionsversuchen

Mit 0,25 % Glutaraldehyd fixiert und mit Kresylviolett (0,1 % (w/v) Kresylviolett in 0,2 M MES pH 6) gefärbte HeLa Zellkulturen wurden mit 5x-Objektiv so fotografiert, dass die gesamte mit dem 2- μ L-Tropfen beschichtete Fläche zu sehen war. Die Anzahl der adhärenz Zellen wurde anschließend manuell bestimmt.

3.2.3.6 Statistische Analyse

Um zu prüfen, ob zwei verschiedene Datenreihen statistisch voneinander unterschieden sind, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test unter Verwendung der Software „StatView 4.57“ (Abacus Concepts) eingesetzt.

* : $p < 0,05$

** : $p < 0,005$

*** : $p < 0,0005$

In Balkendiagrammen wurde der Standardfehler (Standardabweichung / $\sqrt{\text{Anzahl der auswerteten Fotos}}$) als Fehlerbalken dargestellt. Außerdem wurde das Verhältnis der Anzahl der ausgewerteten Bilder (x) zur Gesamtanzahl der angelegten Kulturen (y) dargestellt (in Form von x/y).

3.2.3.7 Zellaggregationsversuch

Dazu wurden die Zellen, CHO und NIH 3T3 (entweder stabil mit chCAR transfiziert (von Mechtel Henning) oder parental) in Glasröhrchen mit ca. 2 cm Durchmesser (1 mL Suspensionsvolumen) in einer Konzentration von 10^6 Zellen/mL in DMEM bei 90 rpm während 120 min bei 37 °C geschüttelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je 50 μL entnommen, um mit dem Coulter-Counter die Partikel-Zahl zu bestimmen.

3.2.3.8 Antikörperperturbation

Mit der Aussaat von Neuronen wurden zu Perturbationszwecken parallel funktionsblockierende Antikörper in Lösung hinzugefügt. Dabei wurden bei polyklonalen Antikörpern monovalente Fab-Fragmente in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g/mL}$ verwendet. Monoklonale Antikörper kamen in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ zum Einsatz

3.2.3.9 Immunfluoreszenzfärbungen an isolierten Neuronen

Tectale Hühnchen-Neuronen wurden nach Fixierung durch 3,75 % Formaldehyd in PBS mit dem anti-chCAR-Antikörper mAk12-36 (20 $\mu\text{g/mL}$) in PBS / BSA (0,1 %) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit PBS / BSA (0,1 %) gewaschen und wiederum für 1h mit dem sekundären Antikörper Rb-anti-Maus-Cy3 (gemäß Herstellerangaben) inkubiert. Die Aufnahmen wurden an dem Mikroskop Axiovert 136 (Zeiss) mit dem 100x-Objektiv mittels der Software „Axiovision 3.1“ gemacht. Nachbearbeitungen der Aufnahmen zur Kontrastverbesserung wurden mit „CorelDRAW X3“ (Corel) vorgenommen.

3.2.3.10 Präparation und Kultivierung embryonaler Kardiomyozyten

Analog zu Neuronen wurden Kardiomyozyten ebenfalls aus Maus-Embryonen gewonnen und trypsiniert sowie trituiert. Anschließend wurden diese mit der Trypsin-Blockierungslösung gewaschen und je ein Herzchen in serumfreien oder serumhaltigen (10 % FCS) DMEM auf 1-4 Kulturschalen in 60 μ L ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.2.3.11 Expression von Fc-Fusionsproteinen

Zur Expression von Fc-Fusionsproteinen wurden COS-7 Zellen transient transfiziert. Dazu wurden semikonfluente Kulturen auf Kulturschalen (mit 15 cm Durchmesser) mit dem Transfektionsansatz versetzt. Nach 3,5-4 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit erfolgte nach einem PBS-Waschschritt der DMSO-Schock (10 % DMSO in PBS) für exakt 2 min. Es schlossen sich zwei weitere PBS-Waschschritte an, gefolgt von der Zugabe von 20 mL DMEM / 10 % FCS. Nach einem Tag Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde das Medium zu 20 mL DMEM / 1 % FCS („ultra low IgG“) gewechselt. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit wurde der Zellkulturüberstand entnommen und nach Zentrifugation für chromatographische Reinigungsschritte verwendet.

3.2.4 Analytische Ultrazentrifugation

Eine im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode zur Studie von Proteinwechselwirkungen ist die analytische Ultrazentrifugation, speziell die Sedimentationsgleichgewichtsanalyse. Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass sich die Proteine in Lösung befinden und ihre Form keinen Einfluss auf die Molmasse hat, wie es etwa bei der Gelfiltration der Fall ist. Eine Wechselwirkung zweier Reaktanden kann dann beschrieben werden, wenn sich ein Sedimentationsgleichgewicht einstellt, d.h. wenn Rückdiffusion vom Boden der Zentrifugationszelle und Sedimentation hin zum Zellboden einander ausgleichen, so dass keine Netto-

Material und Methoden

Transportprozesse mehr stattfinden. Dazu wurden in dieser Arbeit ausschließlich gereinigte Proteine benutzt. Für jede Interaktionsstudie war es zunächst notwendig die Reaktionspartner einzeln auf ihre hydrodynamischen Eigenschaften hin in Abhängigkeit ihrer Konzentration zu untersuchen. Für alle CAR-Konstrukte sind diese Daten im Ergebnisteil dargestellt. Für die untersuchten Bindungspartner vom CAR sind einige Daten im Anhang präsentiert.

Um die Wechselwirkung zweier verschiedener Reaktionspartner (heterologe Assoziation) mit Hilfe der Sedimentationsgleichgewicht-Analyse zu untersuchen, wird ein Reaktand in einer konstanten Konzentration vorgelegt, während der zweite Reaktand in variablen Konzentrationen hinzugefügt wird. Somit entspricht in den resultierenden Bindungsisothermen jeder Messpunkt einem Experiment mit je zwei verschiedenen Proteinlösungen in bekannten Konzentrationen bei konstanter Geschwindigkeit (U/min). Er gibt entweder die durchschnittliche apparente Molmasse der Probe an, welche durch Bildung von Proteinkomplexen ansteigt, oder z. B. das Verhältnis von Monomeren zu Dimeren bei Selbstassoziationsexperimenten. Da die Konzentrationen von eingesetzten Reaktanden bekannt sind, kann man anhand der experimentellen Bestimmung der Komplexkonzentration die verbleibenden Konzentrationen an ungebundenen Reaktanden ermitteln. Das daraus resultierende Verhältnis ergibt die Dissoziationskonstante K_d . Alle Experimente erfolgten ausnahmslos in den Puffern PBS oder TBS.

Für die analytische Ultrazentrifugation wurde das Optima XL-A (Beckman), ausgestattet mit UV-Absorptionsoptik, verwendet. Die Proben wurden in 6-Kanalzellen mit einem optischen Weg von 12 mm und einer Volumenkapazität von je 70 μ L für drei Solvent- und Pufferpärgen geladen. Das Sedimentationsgleichgewicht wurde nach 2 h Hochgeschwindigkeit (z.B. 20 000 rpm) erreicht, gefolgt von einer Gleichgewichtsgeschwindigkeit von 16 000 rpm während 30 h bei 10 °C. Die radiale Konzentrationsverteilung wurde bei drei verschiedenen Wellenlängen zwischen 220 und 295 nm je nach eingesetzter Probenkonzentration gemessen. Aus den Konzentrationsprofilen wurden die Molmassen der einzelnen Komponenten und die gebildeten Assoziate abgeleitet. Mit Hilfe des Programms „POLYMOLE“ wurde der K_d -Wert von Proteinkomplexen berechnet (Behlke und Ristau, 1997).

Alle hier gezeigten Zentrifugationsläufe und damit verbundenen Auswertungen wurden von Joachim Behlke durchgeführt. Die strategische Vorgehensweise zur Charakterisierung der molekularen Interaktionen geschah in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Gewinnung von CAR-Domänen und potentiellen Bindungspartnern

Wie in der in ausführlicherer Form besprochenen Problemstellung (unter 2.7) deuten eine Reihe von Indizien aus vorangegangenen (unpublizierten) Experimenten darauf hin, dass CAR im embryonalen Nervensystem bzw. an der sich entwickelnden neuromuskulären Synapse einen Teil seiner Funktion durch molekulare Interaktionen mit ECM-Glycoproteinen der basalen Laminae ausübt. Zu diesen Indizien gehören: die histologische Lokalisation vom CAR in der Ganglienzellschicht am Beispiel der embryonalen Retina und die ko-Lokalisation mit ACh-Rezeptoren auf adulten Myotuben, die Möglichkeit das axonale Wachstum der Ganglienzellen aus retinalen Explantaten auf der basalen Lamina oder in Augen-Organ-Kulturen durch anti-CAR-Antikörper zu blockieren, sowie die Adhäsion embryonaler retinaler und tectaler Zellen auf FN und Laminin-1 (aber auch von HeLa Zellen auf FN) durch anti-CAR-Antikörper zu inhibieren und die durch Agrin ausgelöste Gruppierung von ACh-Rezeptoruntereinheiten auf embryonalen Myotuben ebenfalls durch anti-CAR-Antikörper zu verhindern. Eine mögliche Interpretation dieser Zellkulturexperimente ist die direkte Bindung vom CAR an ECM-Glycoproteine. Mit dem Ziel dies zu prüfen, wurden zunächst verschiedene CAR-Domänen und potentielle Interaktionspartner in rekombinanter Form hergestellt und gereinigt, damit diese anschließend für Bindungsexperimente und in *in vitro* Zellkulturversuchen eingesetzt werden konnten.

Ergebnisse

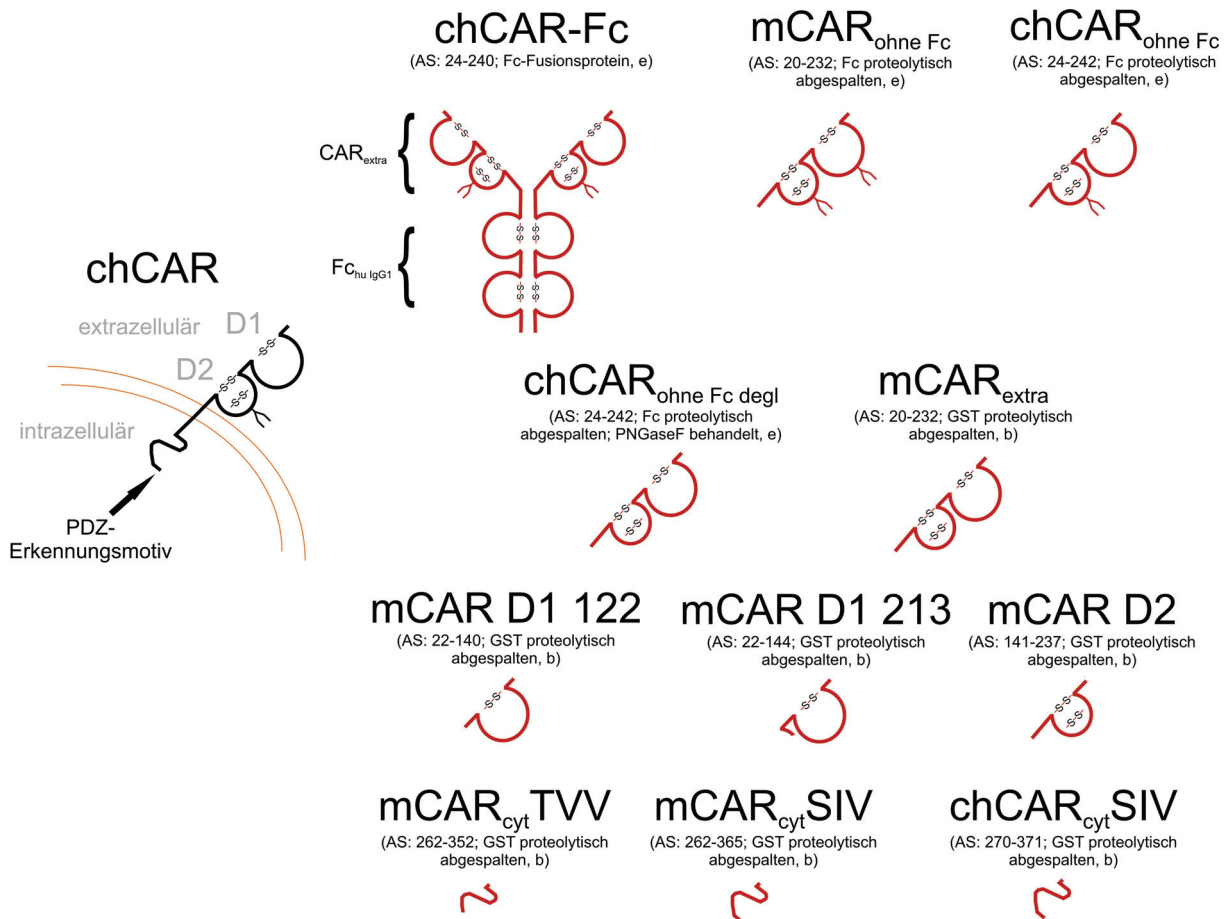


Abb. 4.1 Schematische Darstellung und Nomenklatur der in dieser Arbeit bakteriell oder eukaryontisch hergestellten und verwendeten CAR-Domänen. Zum Vergleich ist der native chCAR gezeigt. Die Ig-Domänen sind als geöffnete Kreise dargestellt. Mögliche Glycosylierungen sind durch Y-förmige Strukturen angedeutet. Die Angaben der enthaltenen Aminosäuren (AS) beziehen sich auf die Sequenz des intakten chCAR bzw. mCAR. Signalpeptide sind nicht mehr enthalten. e: eukaryontisch hergestellt; b: bakteriell hergestellt.

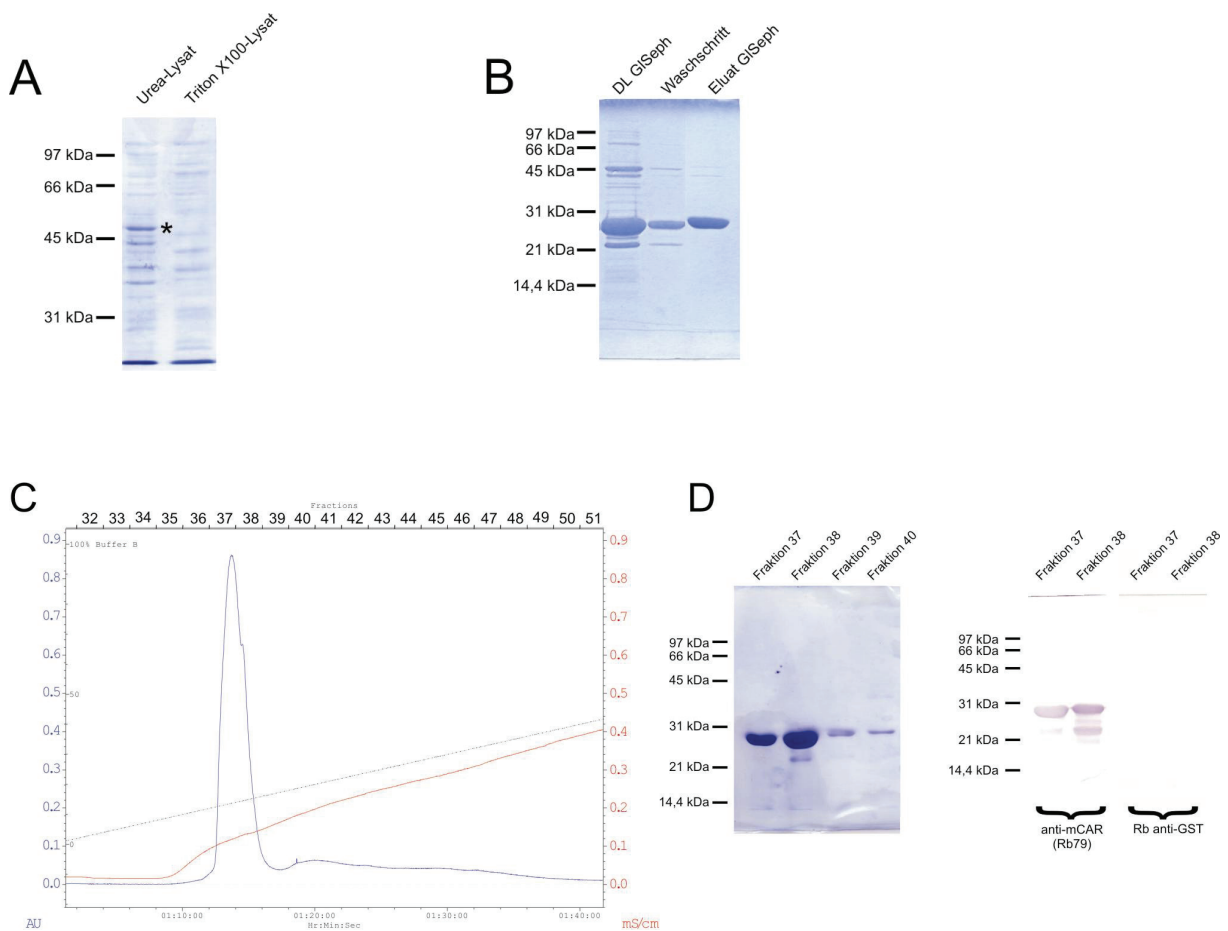
4.1.1 CAR-Domänen

Ein im Allgemeinen gängiger Weg gezielt Proteine in großer Menge und Reinheit zu gewinnen, ist der Weg der bakteriellen Herstellung als GST-Fusionsprotein. Dies erlaubt eine affinitätschromatographische Isolierung durch Glutathion-Sepharose mit anschließender proteolytischer Abspaltung und anschließender chromatographischer Trennung der Spaltprodukte (Schechtman et al., 2003).

Ergebnisse

4.1.1.1 mCAR_{extra}: die zwei extrazellulären Ig-Domänen vom mCAR

Das den gesamten extrazellulären Bereich vom mCAR umfassende Konstrukt (Abb. 4.4 H) *GST::mCAR_{extra}* wurde in *E. coli* BL21 zur Expression gebracht und mittels harnstoffhaltigem Puffer aus „inclusion bodies“ herausgelöst (Abb. 4.2 A, mit Sternchen markierte Bande). Nach Renaturierung des Zelllysates wurde GST-mCAR mittels Glutathion-Sepharose isoliert und GST durch proteolytische Spaltung entfernt (Abb. 4.2 B). Um den Reinheitsgrad zu optimieren erfolgte anschließend eine weitere Reinigung durch Anionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration (Abb. 4.2 C-F). Obwohl Ig-Domänen in Bakterien vielfach nicht richtig gefaltet werden (Yu et al., 2006), enthält das unter den hier verwendeten Bedingungen hergestellte mCAR_{extra} geschlossene Disulfidbrücken, so dass die Wahrscheinlichkeit hoch ist, dass die Ig-Domänen korrekt gefaltet sind (Abb. 4.2 G).



Ergebnisse

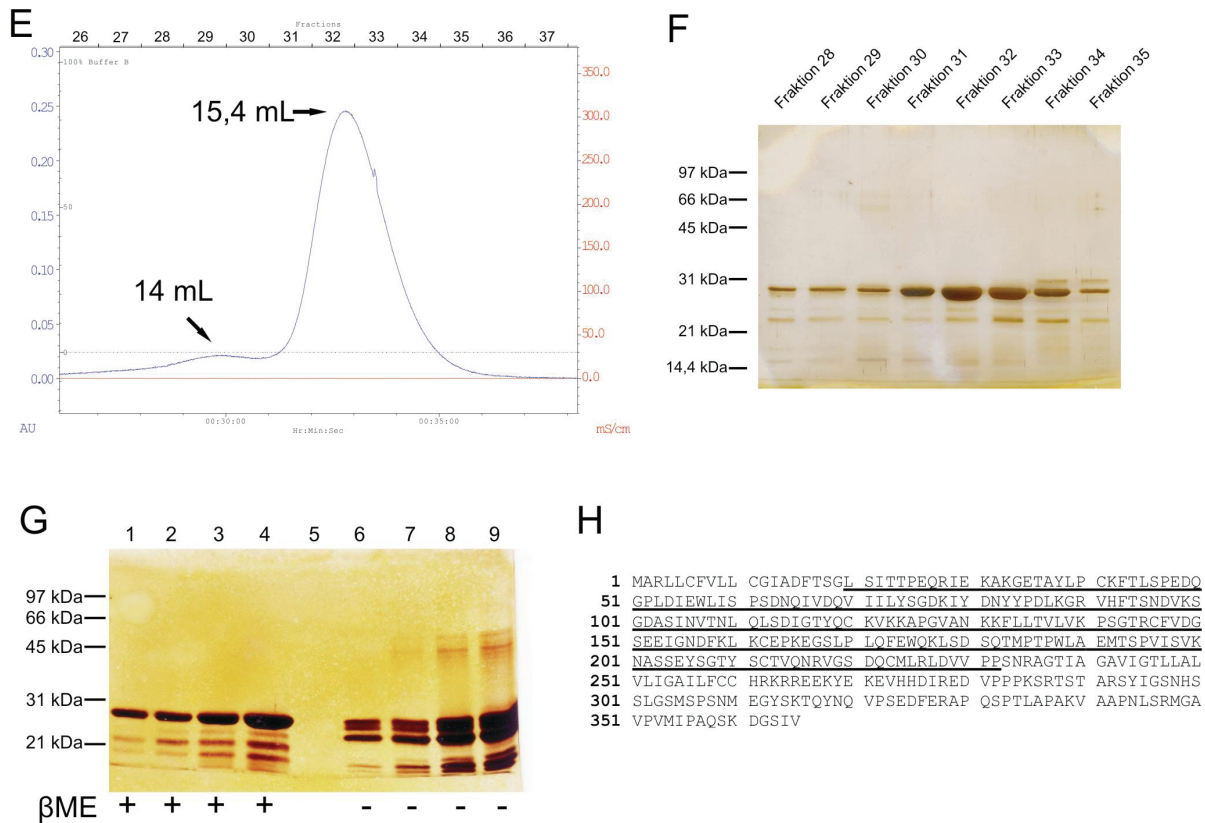


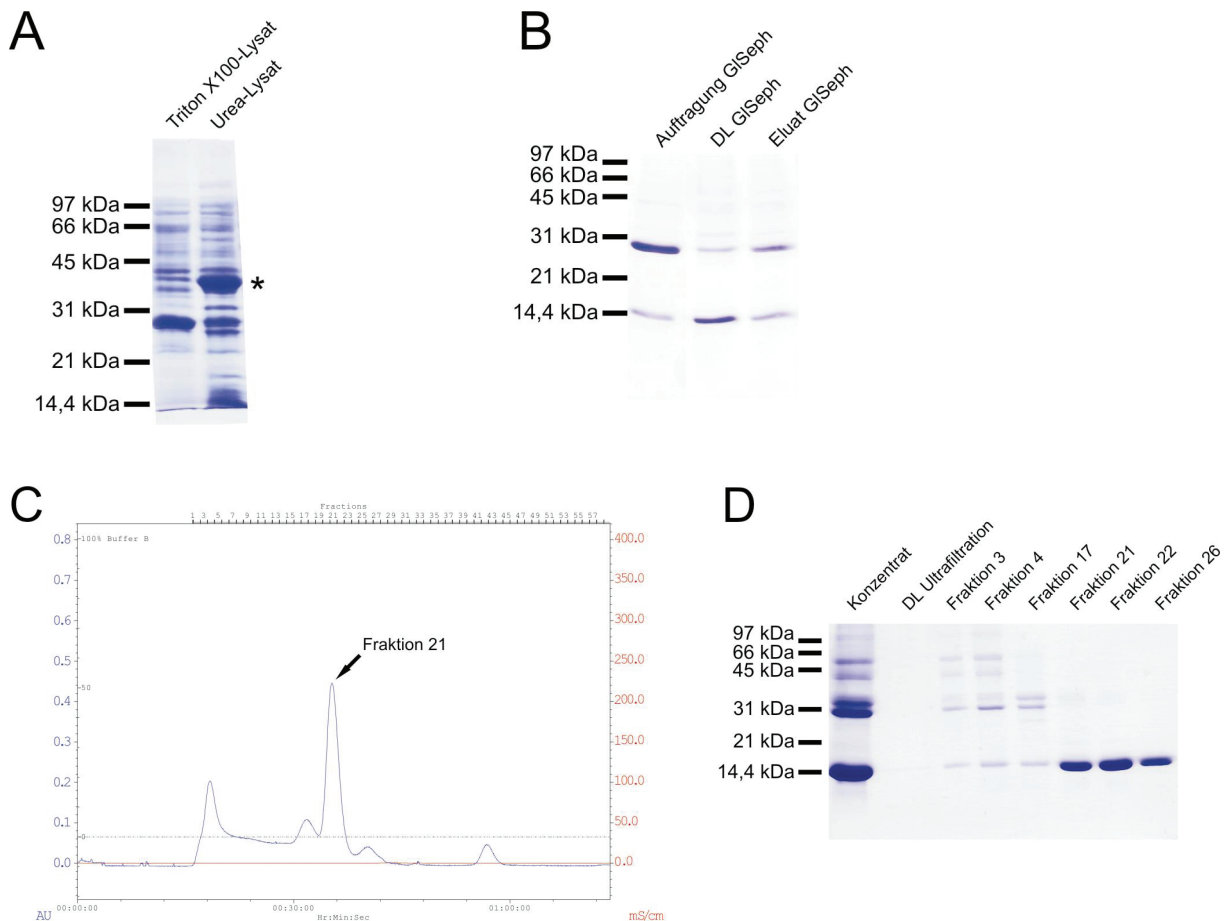
Abb. 4.2 Bakterielle Herstellung und Reinigung von mCAR_{extra}: **A** Bakterieller GST-mCAR_{extra} ist nur durch harnstoffhaltigen Puffer löslich. 10 %ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Coomassie-blue-Färbung. Je 5 μ L Bakterienlysat geladen. Das Sternchen markiert GST-mCAR_{extra}. **B** Proteolytische Spaltung von GST-mCAR_{extra} durch Prescission-Protease an Glutathion-Sepharose. 15 %ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach der Spaltung. Pro Spur sind 37 μ L Probe geladen: Spur 1 enthält Durchlauf des Verdau-Ansatzes. Spur 2 enthält Waschlösung: Säulenmatrix mit 2mal je 2 Säulenvolumina Puffer gewaschen. Spur 3: Glutathion-Eluat. Hauptbande enthält überwiegend GST. **C** Elution vom Anionenaustauscher MonoQ. Die Proben der Spuren 1 und 2 (ca. 12,6 mL) aus B wurden zusammengefasst und per Anionenaustauscherchromatographie weiter gereinigt. Eluiert wurde mit einem NaCl-Gradienten. Die Hauptmenge des Proteins eluiert bei etwa 100 mM NaCl in den Fr 37 und 38 (Fraktionsgröße: je 0,5 mL). **D** mCAR_{extra} eluiert überwiegend in den Fr 37 und 38 von MonoQ. 15 %ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und anschließender Coomassie-blue-Färbung (12 μ L je Spur geladen) bzw. WB-Analyse (1,2 μ L je Spur geladen) gegen GST oder mCAR (pAk79) untersucht. Fr 37 und 38 enthalten mCAR_{extra}, aber kein GST, welches in Fr 40 eluiert (Blot hier nicht abgebildet). Bande unterhalb der Hauptbande von Fr 38 enthält ebenfalls mCAR_{extra} und ist vermutlich ein Degradationsprodukt. **E** Gelfiltration vom Anionenaustauscher-Eluat Fr 38 (0,5 mL). **F** Fr 38 der MonoQ-Elution nach Gelfiltration. 15 %ige SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Fr 26-35 aus dem Gelfiltrationslauf. 12 μ L je Spur geladen. **G** mCAR_{extra} enthält zum größten Anteil geschlossene Disulfidbrücken. 12 % SDS-PAGE. Spur 1: 1,5 μ g mCAR_{extra}; 2: 3 μ g mCAR_{extra}; 3: 6 μ g mCAR_{extra}; 4: 12 μ g mCAR_{extra}; 6-9: wie 1-4 nur unter nicht-reduzierenden Bedingungen. **H** AS-Sequenz vom mCAR SIV mit theoretischer Sequenz von mCAR_{extra} (schwarz unterstrichen). DL= Durchlauf (nicht an Säule gebundenes Material).

Ergebnisse

4.1.1.2 mCAR D1: die erste extrazelluläre Ig-Domäne

Analog zu *GST::mCAR_{extra}* wurden die jeweils für die erste Ig-Domäne (D1) von mCAR codierenden *GST::mCAR D1 122* und *GST::mCAR D1 213* Siquenzen (Abb. 4.3 G) in *E. coli* BL21 exprimiert, mit harnstoffhaltigem Puffer in Lösung gebracht und an Glutathion-Sepharose isoliert (Abb. 4.3 A). Auf die proteolytische Spaltung zur Entfernung des GST-Anteils (Abb. 4.3 B) folgte ein weiterer Reinigungsschritt durch Größenausschlusschromatographie (Abb. 4.3 C-F).

Auch mit dem Ziel eine möglicherweise kontroverse Situation durch publizierte Ergebnisse anderer aufzuklären, wurden hier zwei verschiedene mCAR D1-Konstrukte hergestellt: van Raaij et al. (2000) verwenden ein hCAR D1 Konstrukt, was dem hier verwendeten mCAR D1 122 (AS 22-140) entspricht und sehen ein Dimer nach Kristallisation bzw. ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht (bei pH 7,4) durch analytische Ultrazentrifugation. Jiang et al. (2004) hingegen konstatieren bei ihrem C-terminal um vier AS längeren hCAR D1, welches bis auf speziesspezifische Unterschiede mCAR D1 213 (AS 22-144) gleichkommt, ein stabiles Dimer, das erst bei pH 3 zum Monomer wird.



Ergebnisse

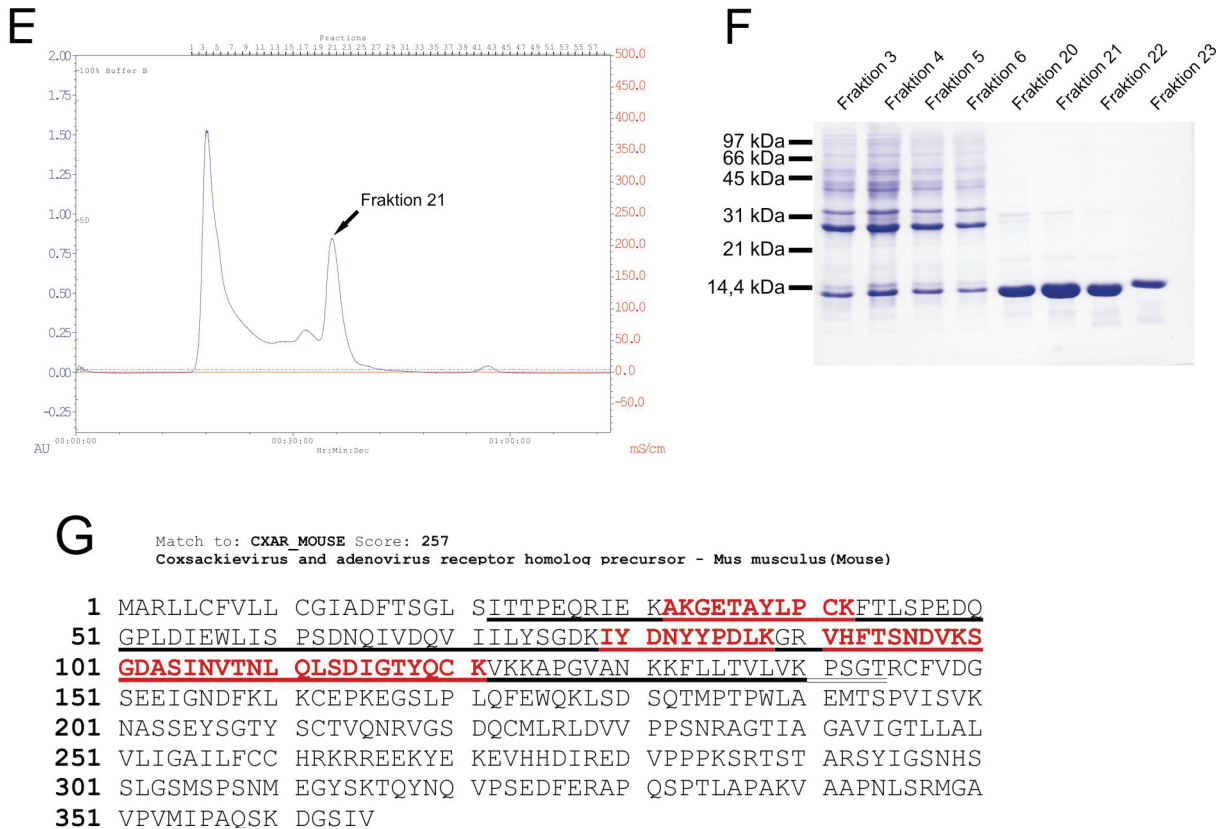


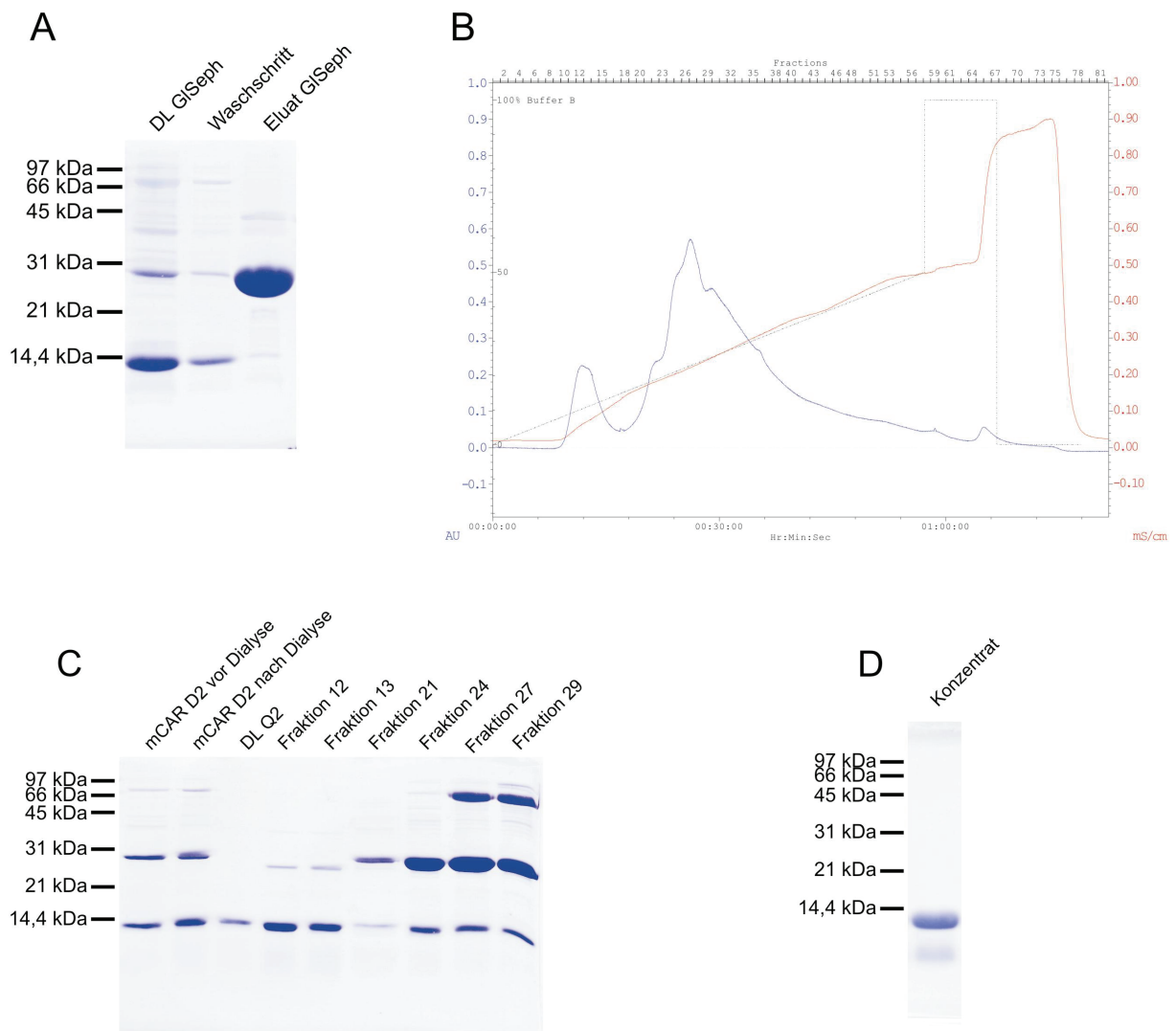
Abb. 4.3 Bakterielle Herstellung und Gewinnung der ersten Ig-Domäne (D1) vom mCAR. **A** Bakterieller GST-mCAR D1 ist nur durch harnstoffhaltigen Puffer löslich. 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Je 10 μ L Bakterienlysat geladen. Die Molmasse von GST-mCAR D1 213 (mit Sternchen markiert) beträgt in etwa 39 kDa. **B** Poteolytische Spaltung von isoliertem GST-mCAR D1 213 durch Precission-Protease in Lösung und erneute Reinigung an Glutathion-Sepharose. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zeigt mCAR D1 213 (etwa 13 kDa), welches im Gegensatz zu GST (etwa 27 kDa) nicht mehr an Glutathion-Sepharose bindet. Spuren 1+2 je 20 μ L und Spur 3 10 μ L geladen. **C** Gelfiltration nach Ankonzentrierung durch Ultrafiltration von mCAR D1 213. mCAR D1 213 eluiert in PBS in den Fraktionen 21-23. **D** Ankonzentrierung durch Ultrafiltration und Gelfiltration von mCAR D1 213. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Fraktionen des Gelfiltrationlaufes (je Spur sind 20 μ L geladen). Zu sehen sind das Konzentrat nach Ultrafiltration (5 μ L geladen), was dem Säulenauftrag entspricht, und die Fraktionen aus der Elution. In den Fraktionen 21-23 ist eine dominierende Bande bei 13 kDa zu erkennen. **E** und **F** analog **C** und **D** Ultrafiltration und Gelfiltration von mCAR D1 122. **G** Aminosäure-Sequenz vom mCAR SIV Durch ESI-MS (durchgeführt von Albrecht Otto) konnte mCAR D1 122 bezüglich der AS-Sequenz als korrekt identifiziert werden. Die gefundenen Peptide nach tryptischem Verdau sind rot markiert. Die theoretische Sequenz ist unterstrichen. mCAR D1 213 ist vier Aminosäuren (doppelt unterstrichen) länger als mCAR D1 122.

Ergebnisse

4.1.1.3 mCAR D2: die zweite extrazelluläre Ig-Domäne

Die rekombinante Herstellung der zweiten Ig-Domäne (D2) (Sequenz: Abb. 4.4 G) vom mCAR erfolgte ebenfalls in *E. coli* BL21. Auch das hier entstehende GST-mCAR D2 ist nur durch Harnstoff-Denaturierung löslich.

Aus dem renaturierten Lysat wurde mCAR D2 durch Reinigung an Glutathion-Sephrose, proteolytischer Spaltung, Anionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration gewonnen (Abb. 4.4 A-G).



Ergebnisse

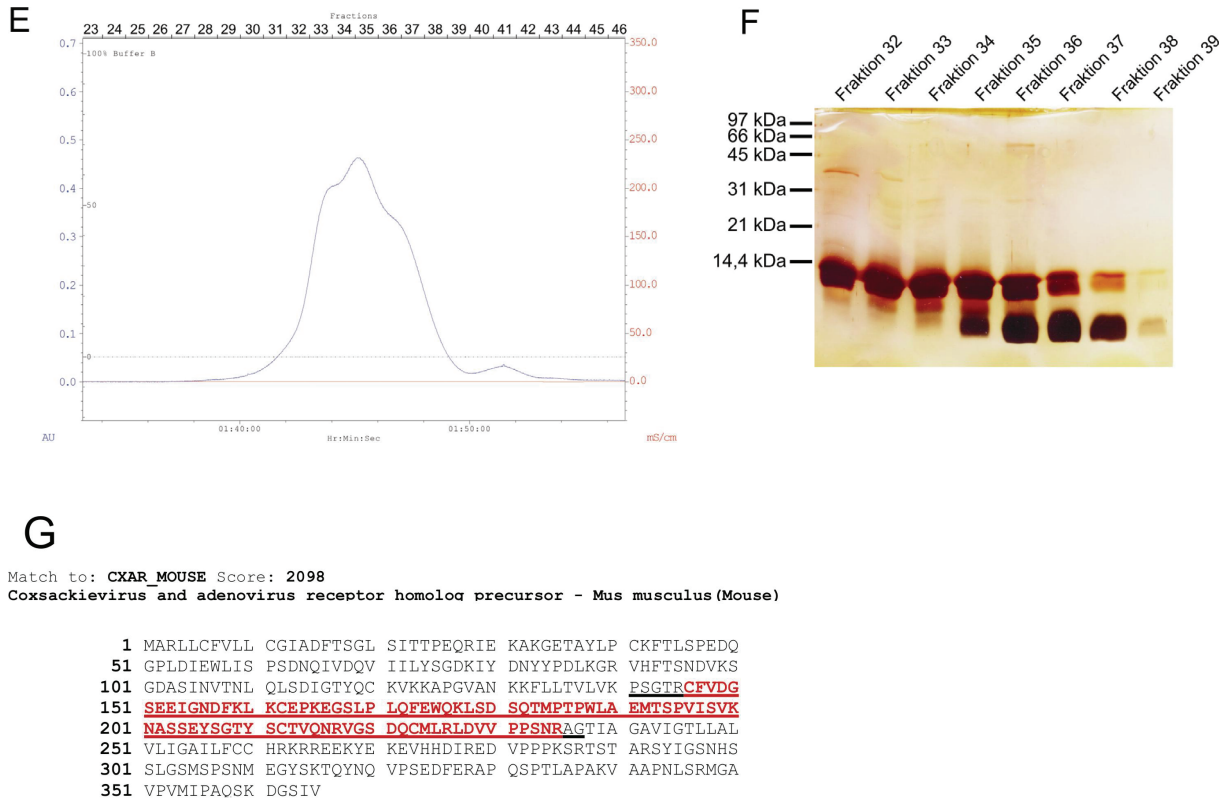
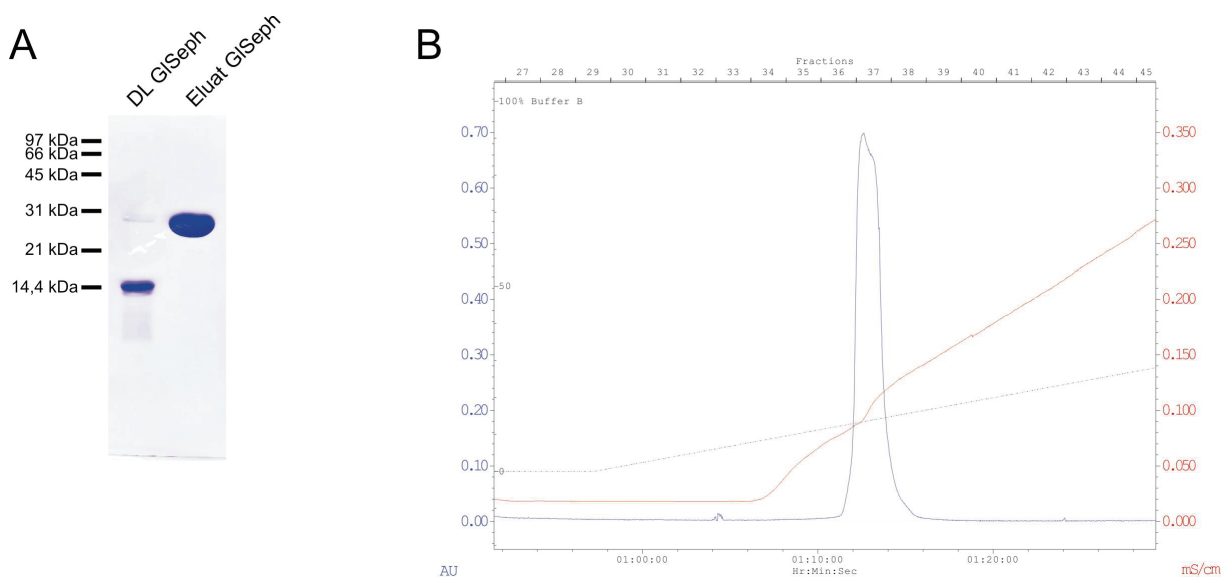


Abb. 4.4 Herstellung der zweiten Ig-Domäne (D2) vom mCAR. **A** Proteolytische Spaltung von bakteriellem GST-mCAR D2 durch Prescission-Protease an Glutathion-Sepharose. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zeigt abgespaltenes mCAR D2 im Säulendurchlauf und in der Waschelution mit einer apparenten Masse von etwa 12 kDa. Je Spur sind 10 μ L geladen. **B** Durchlauf von Glutathion-Sepharose eluiert vom Anionenaustauscher BioscaleQ2. In 20mM Tris pH 8 binden GST und andere bakterielle Proteine an BioscaleQ2, aber nicht mCAR D2. **C** Der Großteil von mCAR D2 befindet sich im Durchlauf von BioscaleQ2. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen: GST bindet an BioscaleQ2 und eluiert in den Fraktionen 21-29 mit einer apparenten Masse von etwa 27 kDa. Pro Spur sind 20 μ L geladen. **D** Ankonzentrierung durch Ultrafiltration des BioscaleQ2-Durchlaufs. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen: Es wurden 5 μ L geladen. **E** Gelfiltration vom Konzentrat des BioscaleQ2-Durchlaufes. **F** mCAR D2 eluiert in den Fr 32-34; Fr 35-38 enthalten Abbaukomponente. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen: Je Spur wurden 15 μ L geladen. **G** ESI-MS-Analyse hat Peptide aus mCAR D2 identifiziert. Nach tryptischem Verdau konnte Albrecht Otto mCAR D2 als korrekt identifizieren. Gefundene Peptide sind rot unterlegt, die theoretische AS-Sequenz ist unterstrichen. Dargestellt ist die gesamte AS-Sequenz vom mCAR SIV.

Ergebnisse

4.1.1.4 Zytoplasmatische Segmente vom CAR: mCAR_{cyt}TVV, mCAR_{cyt}SIV, chCAR_{cyt}SIV

Um das zytoplasmatische Segment vom CAR rekombinant herzustellen, wurde hier wiederum ein GST-Fusionsprotein aus *E. coli* BL21 gewonnen. Diesmal allerdings in drei verschiedenen Formen: GST-mCAR_{cyt}SIV, GST-mCAR_{cyt}TVV (Abb. 4.5 F) und GST-chCAR_{cyt}SIV (bislang einzige Isoform aus *Gallus gallus*). Da keines der Fusionsproteine in „inclusion-bodies“ angereichert wurde, konnte auf eine Denaturierung durch Harnstoff-haltigen Puffer verzichtet werden. Aus den in Triton-X-100 solubilisierten Bakterienlysaten konnten die jeweiligen GST-CAR_{cyt}-Konstrukte an Glutathion-Sepharose isoliert und proteolytisch gespalten werden (Abb. 4.5 A). Um das abgespaltene CAR_{cyt}-Protein von kontaminierenden *E.coli*-Proteinen abzutrennen, folgten zwei zusätzliche Reinigungsschritte durch Kationenaustauscherchromatographie und Gelfiltration (Abb. 4.5 B-E). In Abb.4.5 ist exemplarisch die Aufreinigung von mCAR_{cyt}TVV gezeigt, wobei mCAR_{cyt}SIV und chCAR_{cyt}SIV auf identische Art und Weise hergestellt wurden (Abb. 4.5 G+H).



Ergebnisse

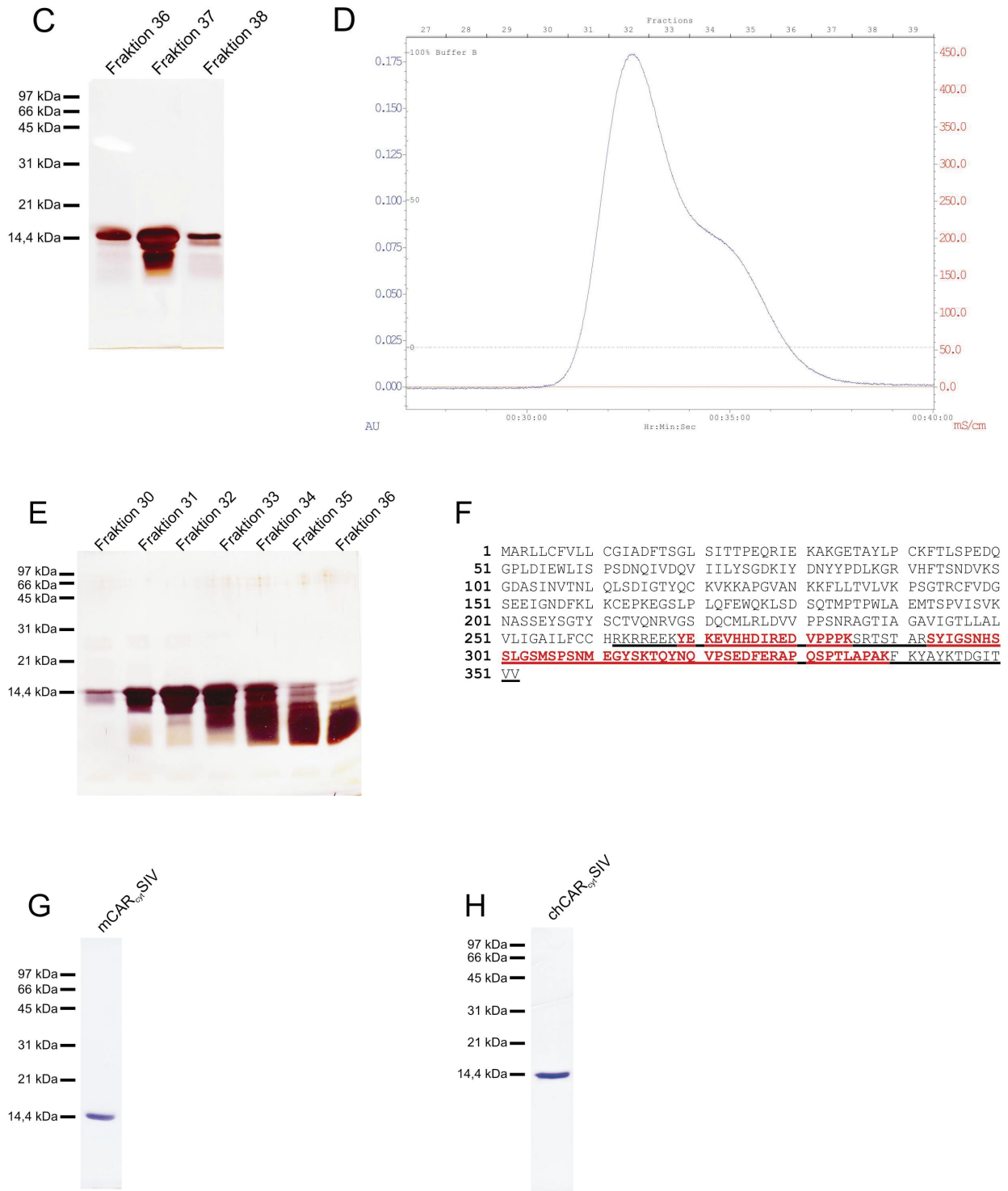


Abb. 4.5 Gewinnung des zytoplasmatischen Segmentes vom mCAR. **A** Proteolytische Spaltung von GST-mCAR_{cyt}TVV durch Precision-Protease an Glutathion-Sepharose. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen zeigt, dass mCAR_{cyt}TVV eine apparente Masse von 14 kDa hat. Geladen sind je Spur 20 μ L. **B** Elution vom Kationenaustauscher SourceS. Der Glutathion-Sepharose-Durchlauf wurde auf den Kationenaustauscher SourceS aufgetragen und eluiert überwiegend in Fr 37 bei etwa 90 mM NaCl. **C** 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Fraktionen des SourceS-Laufes. Deutlich zu erkennen ist eine dominierende Bande bei 14 kDa und ein Schmier darunter. GST ist nicht mehr enthalten. Je Spur sind 10 μ L Probe geladen. **D** Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufes von Fr 37 des SourceQ-Eluates. Zu sehen sind zwei Absorptionsmaxi-

Ergebnisse

ma: das erste in Fr 32 und das zweite in Fr 34. **E** 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Gelfiltrationsfraktionen 30-36. Die Hauptbande bei 14 kDa und die Abbaukomponenten, die als Schmier sichtbar sind, konnten voneinander getrennt werden. Pro Spur sind 20 μ L geladen. **F** ESI-MS-Analyse (von Albrecht Otto) der Bande aus der Gelfiltrationsfraktion 31. Es wurden Peptide (rot unterlegt) aus dem intrazellulären Segment vom mCAR TVV gefunden. Dargestellt ist hier die komplette AS-Sequenz von mCAR TVV; unterstrichen ist die theoretische Sequenz von mCAR_{cyt}TVV. **G + H** Gewonnenes zytoplasmatisches Segment vom mCAR SIV und chCAR SIV. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von mCAR_{cyt}SIV bzw. chCAR_{cyt}SIV, welche analog zu mCAR_{cyt}TVV hergestellt und gereinigt wurden. Pro Spur sind je 4 μ g aufgetragen.

4.1.2 Extrazelluläre CAR-Domänen: eukaryontisch hergestellt

Eine weitere Möglichkeit Proteine in rekombinanter Form zu gewinnen, ist die Expression in Säugerzellen in Form von Fc-Fusionsproteinen (Flanagan et al., 2007). Gegenüber der prokaryontischen Herstellung erlaubt diese Methode einerseits die Reinigung unter nativen Bedingungen. Das (aufgrund einer Signalsequenz) sekretierte Protein kann ohne Zugabe von Detergenzien aufgrund des aus humanem IgG1 stammenden Fc-Anteils mittels Protein-A-Sepharose direkt aus dem Kulturüberstand isoliert werden. Andererseits gewährleistet dieses Expressionssystem eine korrekte Faltung von nicht-prokaryontischen Protein-Domänen, wie etwa Ig-Domänen, und ermöglicht zudem post-translationale Modifikationen, wie z. B. Glykosylierungen.

Extrazelluläre CAR-Domänen wurden mittels transient transfizierter COS-7 Zellen gewonnen, mit dem Ziel deren molekulare Eigenschaften durch analytische Ultrazentrifugation und Gelfiltration zu bestimmen.

4.1.2.1 chCAR-Fc: Fusionsprotein aus Fc und den zwei extrazellulären Ig-Domänen vom chCAR

Dieses, aus den extrazellulären Domänen vom chCAR und einem C-terminalen Fc-Anteil bestehende Konstrukt (von Mechthild Henning angefertigt), wurde durch DEAE-Dextran-Transfektion zur Expression gebracht und aus dem COS-7 Zellkulturüberstand isoliert. Nach SDS-PAGE-Analyse von chCAR-Fc ist zu erkennen, dass es sich um ein über Disulfidbrücken verbundenes Dimer handelt (bewirkt durch den Fc-Anteil) (Abb. 4.6 A).

Ergebnisse

Allerdings ist eine kontaminierende Bande bei etwa 190 kDa zu erkennen (ohne Reduktionsmittel), welche durch Affinitätschromatographie mittels anti-chCAR-Antikörper (mAk12-36) abgereichert werden konnte (Abb. 4.6 B). Durch WB-Analyse konnte gezeigt werden, dass chCAR-Fc die extrazellulären Domänen vom chCAR enthält (Abb. 4.5 C).

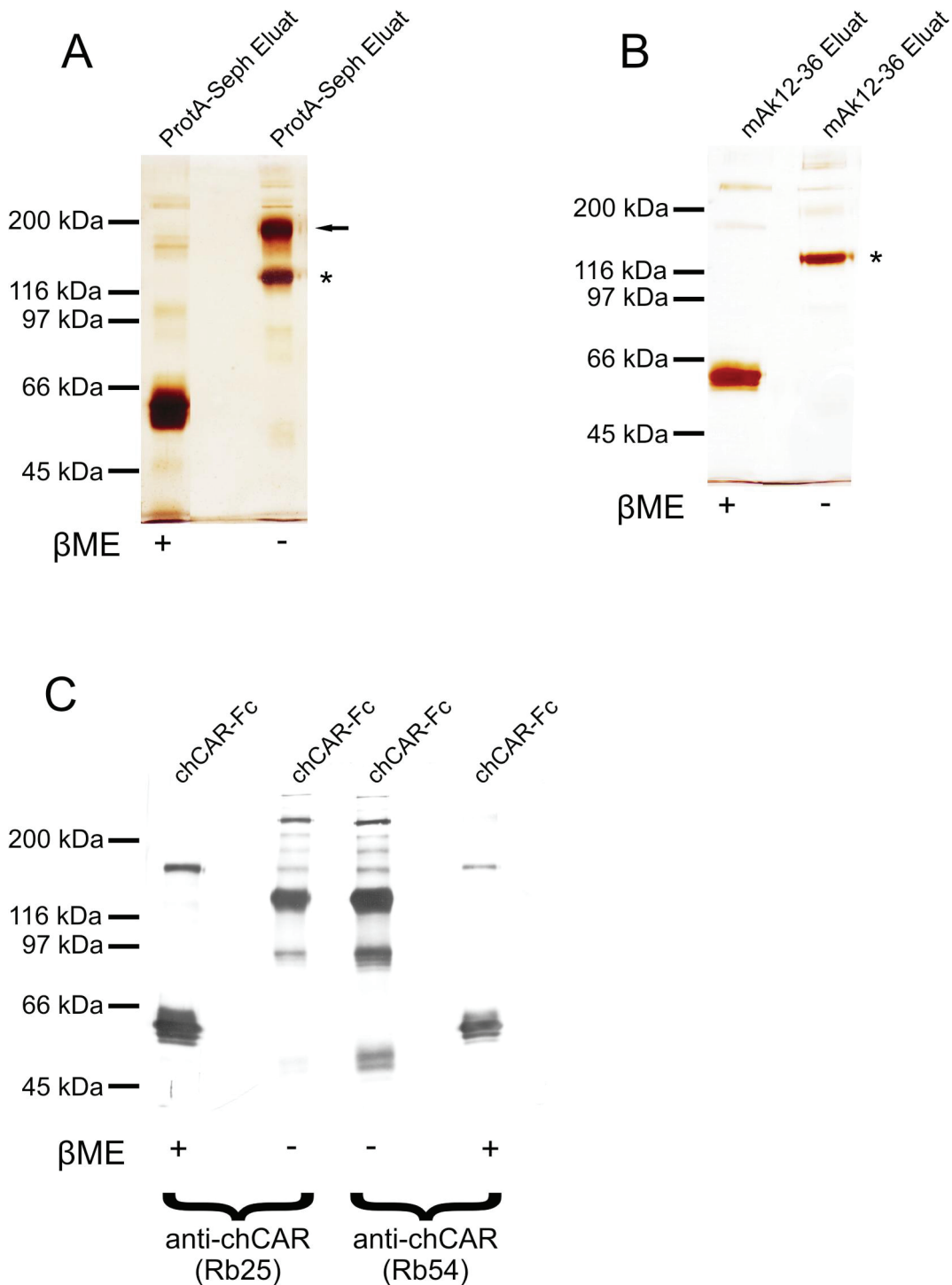


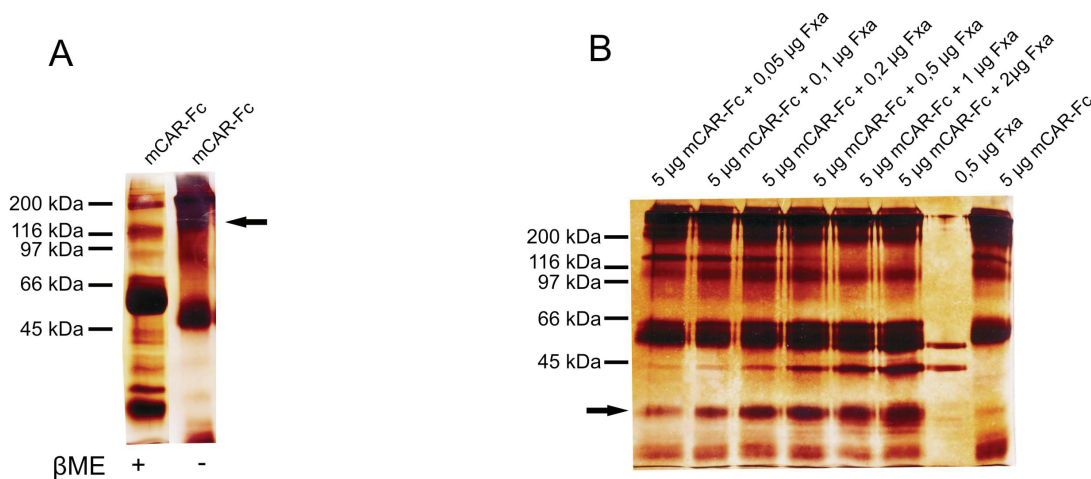
Abb. 4.6 Eukaryontische Herstellung und Reinigung von chCAR-Fc: **A** chCAR-Fc ist ein über Disulfidbrücken vernetztes Dimer. 10 % SDS-PAGE des Protein-A-Sepharose-Eluates unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen zeigt dominierende Banden bei 60 kDa bzw. bei 120 oder 190 kDa. Die theoretische

Ergebnisse

Masse von chCAR-Fc beträgt mehr als 100 kDa (mit Sternchen markiert). Durch Reduktion werden die Disulfidbrücken geöffnet, so dass ein Monomer mit apparenter Masse von 60 kDa entsteht. In der zweiten Spur ist eine zusätzliche Bande (mit Pfeil markiert) bei etwa 190 kDa zu erkennen. Diese Bande enthält Fc aber kein chCAR (durch WB-Analyse ermittelt, hier aber nicht abgebildet). Je Spur sind 3 µg geladen. **B** Affinitätschromatographie durch am chCAR-bindenden Antikörper (mAk12-36) entfernt kontaminierendes Protein. 10 % SDS-PAGE nach Elution von mAk12-36-Affigel. Je Spur sind 3 µg geladen. **C** WB-Analyse beweist, dass das Fc-Fusionsprotein chCAR enthält. 10 % SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durch anti-chCAR-Antikörper (Rb54 und Rb25) unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen. Je Spur sind 0,3 µg geladen.

4.1.2.2 mCAR_{ohne Fc}: die zwei extrazellulären Ig-Domänen vom mCAR

Um die Frage nach der selbstassoziierenden Eigenschaft der extrazellulären Domänen vom CAR zu klären, wurde hier der extrazelluläre Bereich vom mCAR, gefolgt von einer proteolytischen Spaltstelle und einem C-terminalen Fc-Fragment ebenfalls in COS-7 Zellen hergestellt (Das Konstrukt stammt von Mechthild Henning.). Das so gewonnene mCAR-Fc ließ sich durch steigende Konzentration der Protease Faktor Xa in mCAR_{ohne Fc} und Fc spalten. Anschließend wurden Fc und Faktor Xa mittels ProteinA- sowie Benzamidin-Sepharose abgereichert (Abb. 4.7 A-C). Ein finaler Reinigungsschritt erfolgte durch Anionenaustauscherchromatographie (Abb. 4.7 D). Ein Hinweis dafür, dass mCAR_{ohne Fc} über interne geschlossene Disulfidbrücken verfügt, liefert das unterschiedliche Wanderungsverhalten bei der SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (Abb. 4.7 E). WB-Analysen zeigen, dass mCAR_{ohne Fc} den extrazellulären Bereich vom mCAR, aber kein Fc enthält (Abb. 4.7 F).



Ergebnisse

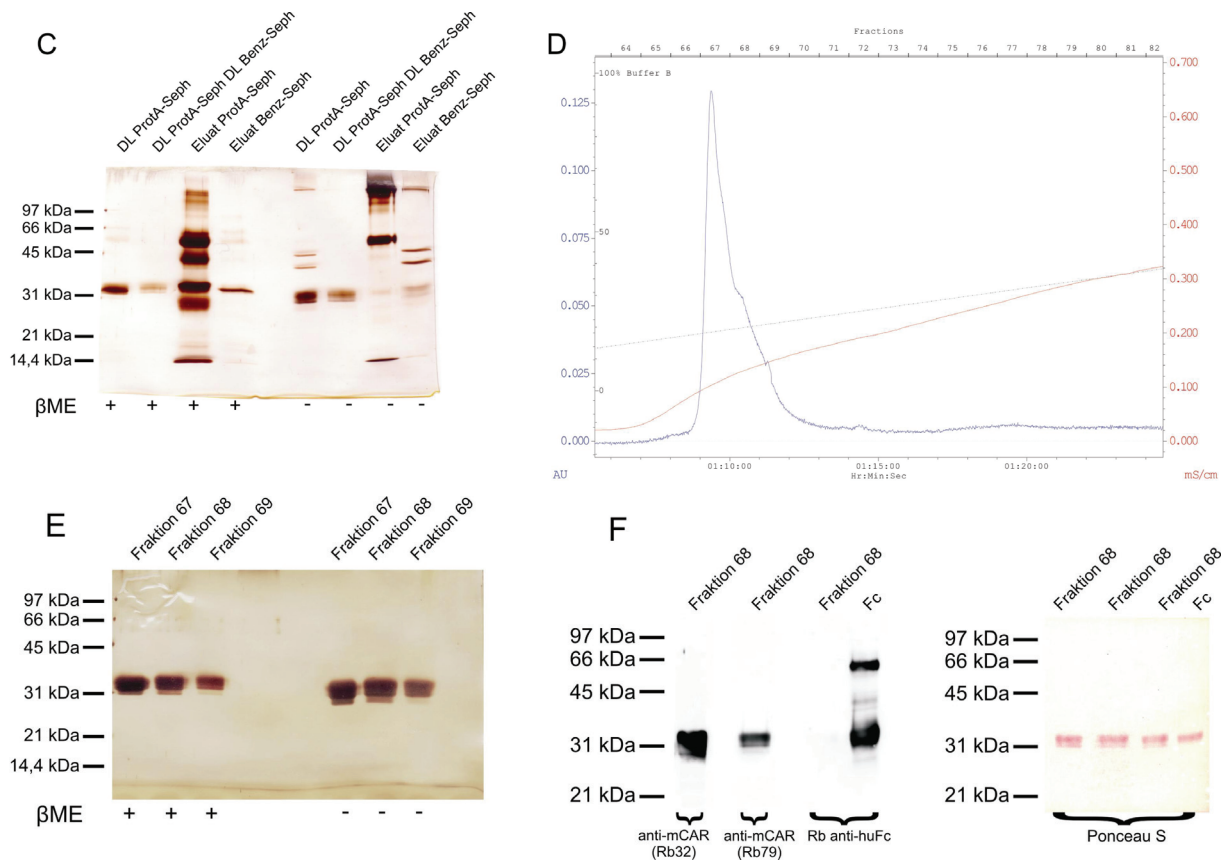
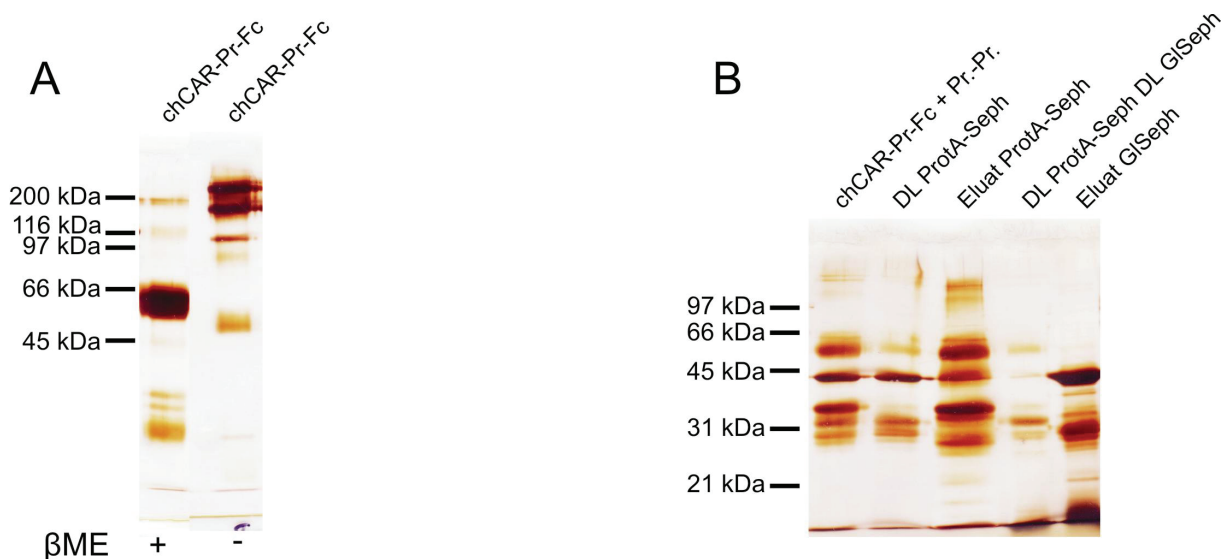


Abb. 4.7 Eukaryontische Herstellung und Reinigung von $mCAR_{\text{ohne Fc}}$: **A** $mCAR\text{-Fc}$ ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Dimer. 10 % SDS-PAGE des Protein-A-Sepharose-Eluates unter reduzierenden und unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigt dominierende Banden bei 60 kDa bzw. bei 120 oder 190 kDa. Je Spur sind 3 μg geladen. **B** Proteolytische Spaltung von $mCAR\text{-Fc}$ durch Protease Faktor Xa. 10 % SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen von Testspaltung mit verschiedenen Mengen an Faktor Xa. Faktor Xa selbst erscheint als Doppelbande bei 45 und 50 kDa. Steigende Mengen an Protease führen zu einer zusätzlichen Bande bei etwa 33 kDa (mit Pfeil markiert). **C** Affinitätschromatographische Trennung von $mCAR_{\text{ohne Fc}}$ und restlichen Proteinen. 12 % SDS-PAGE der proteolytischen Spaltung im präparativen Maßstab und Isolierung $mCAR_{\text{ohne Fc}}$. Nach der Spaltung bindet Fc an Protein-A-Sepharose; $mCAR_{\text{ohne Fc}}$ nicht. $mCAR_{\text{ohne Fc}}$ und Fc haben beide eine apparente Masse von etwa 33 kDa. Das Eluat der Protein-A-Sepharose enthält Fc und weitere kontaminierende Proteine. Der Durchlauf wurde auf Benzamidin-Sepharose aufgetragen, welche selektiv die unmarkierte Protease bindet, so dass das Benzamidin-Sepharose-Eluat Faktor Xa enthält. Im Durchlauf befindet sich $mCAR_{\text{ohne Fc}}$. Je Spur sind 20 μL geladen. **D** Elutionsprofil Anionenaustauscherchromatographie (MonoQ) vom Benzamidin-Sepharose-Durchlauf. $mCAR_{\text{ohne Fc}}$ eluiert bei steigender NaCl-Konzentration in den Fraktionen 67-69 (etwa 100 mM NaCl). **E** $mCAR_{\text{ohne Fc}}$ enthält interne geschlossen Disulfidbrücken. 12 % SDS-PAGE der MonoQ-Fraktionen 67-69. $mCAR$ ohne Fc erscheint unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgrund der internen Disulfidbrücken etwas kleiner als unter reduzierenden Bedingungen. Je Spur sind 2 μg geladen. **F** WB-Analyse beweist, dass es sich bei $mCAR_{\text{ohne Fc}}$ um extrazelluläre Domänen vom $mCAR$ handelt und nicht um Fc. 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse der MonoQ-Fraktion 68. Anti- $mCAR$ -Antikörper (Rb32 und Rb79) erkennen die Bande in Fraktion 68, Rb anti hu-Fc aber nicht. Als Kontrolle diente Fc.

4.1.2.3 chCAR_{ohne Fc}: die zwei extrazellulären Ig-Domänen vom chCAR

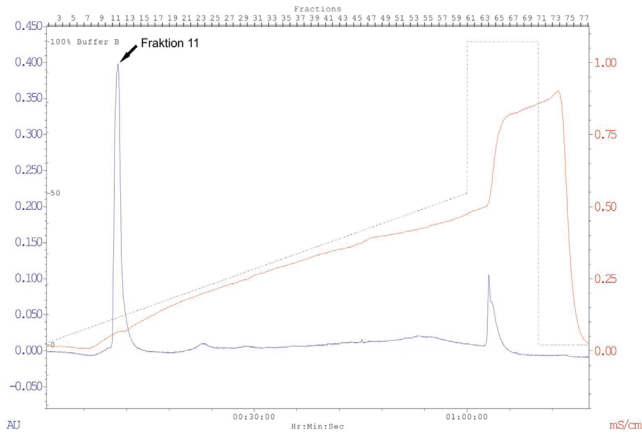
Mit dem Ziel die Frage nach der N-Glycosylierungsabhängigkeit der Selbstassoziation des extrazellulären Bereiches vom CAR zu klären, wurde ein weiteres chCAR-Fc-Konstrukt hergestellt, das wie mCAR-Fc eine proteolytische Spaltstelle zwischen CAR (extrazellulärer Anteil) und Fc enthält. Da sich das Fusionsprotein chCAR-Fc in größeren Mengen gewinnen lässt als mCAR-Fc, wurde dieses Konstrukt genommen, um das resultierende chCAR_{ohne Fc} mit PNGaseF enzymatisch zu deglycosylieren.

Durch SDS-PAGE ist zu erkennen, dass sich das chCAR-Fc Fusionsprotein (wiederum stammend aus den Kulturüberständen transient transfizierter COS-7 Zellen) analog zu dem Konstrukt ohne proteolytische Spaltstelle (4.1.2.1) verhält. Die acht zusätzlichen Aminosäuren der Protease-Erkennungssequenz erhöhen die apparente Masse nur geringfügig (Abb. 4.8 A). Nach Spaltung durch Prescission-Protease und Entfernung des Fc-Anteils (und der Protease), folgten weitere Reinigungsschritte mittels Anionenaustauscherchromatographie und Gelfiltration (Abb. 4.8 B-F). Das final erhaltene chCAR_{ohne Fc} scheint insofern korrekt gefaltet sein, als dass sich das Laufverhalten in der SDS-PAGE durch Zugabe oder Weglassen von β -Mercaptoethanol verändern lässt, was auf die Existenz von geschlossenen internen Disulfidbrücken hindeutet (Abb. 4.8 G). WB-Analyse und ESI-MS zeigen, dass chCAR_{ohne Fc} die extrazellulären Domänen vom chCAR enthält (Abb. 4.8 H und I).

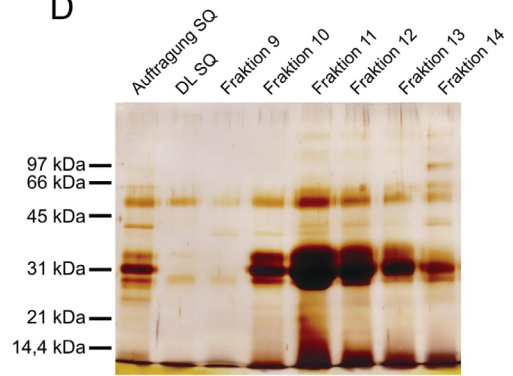


Ergebnisse

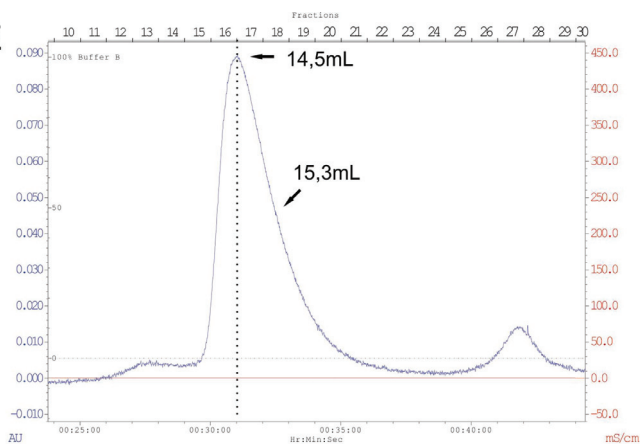
C



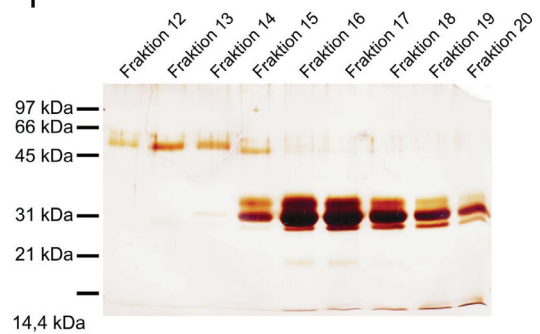
D



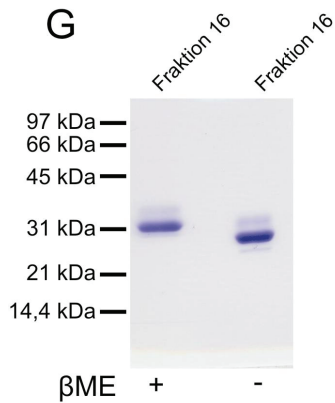
E



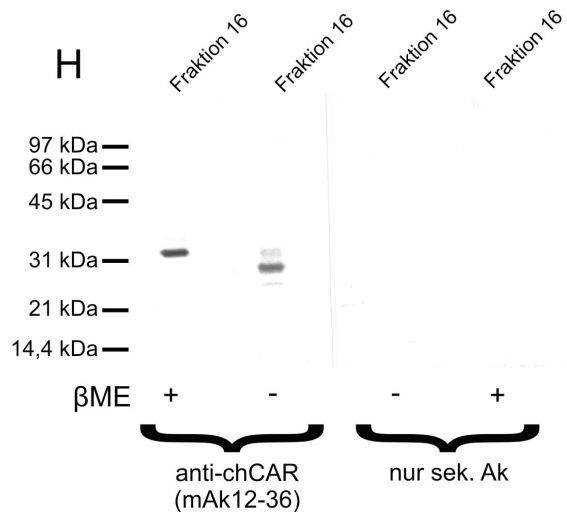
F



G



H



I

Match to: [gi|118083763](#) Score: 1138
 PREDICTED: similar to coxsackie and adenovirus receptor protein [Gallus gallus]

```

1  MEPPPLVLLV GLALLGAAGL TRLSITSAE SAFEKAQGER VTLTCTFELS
51  EEDVGLTDIE WVLIPADIOK KEETIILYSG DRIYNHYHPA LAGRLQFTSS
101 DPKSGDGSVD ILNLSADTG TYOCKVKKAP GVESLKIQLN VLVKPASTKC
151 SIEGSQEIGK DIVLKCASQE GTPLLYDWR RVVTGTOGLP ATSVLNKNTG
201 ELLKNAASKD YSGTYSCVAS NRVGTDECSV ELNVTTPPINT AGVIAGAILG
251 TLLGLALLAF LVICCKKHR EKYEKEVHH EIREDLVLPK SRSSTARSYI
301 GSNRSSLGSM SPSNMEGYK TPYSQVPSD FERTSGQNQT IASSKVAAPN
351 LSRMGAVPVM IPAOSKDGSI V
    
```

Ergebnisse

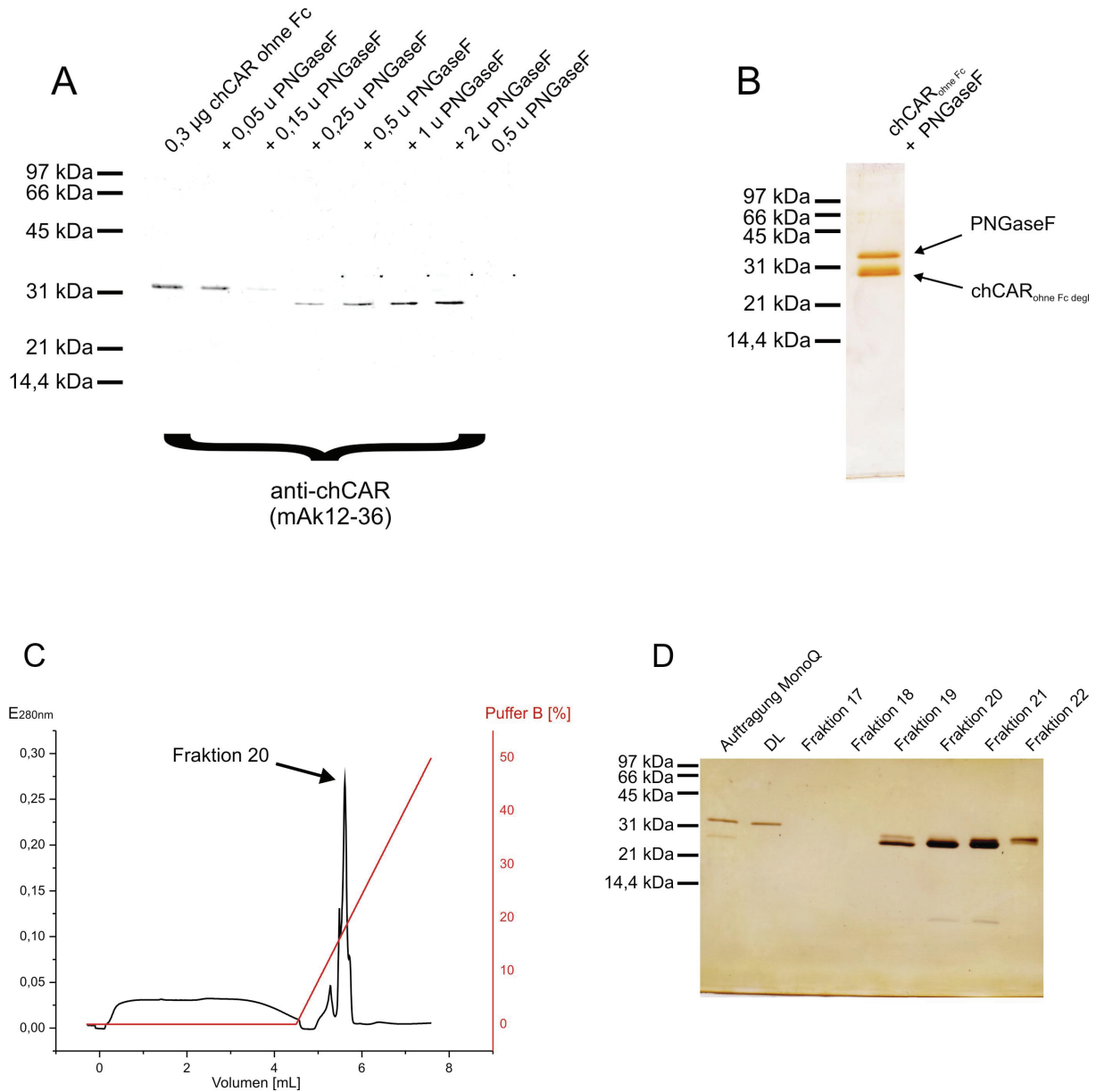
Abb. 4.8 Eukaryontische Herstellung und Reinigung von chCAR_{ohne Fc}: **A** Auch mit proteolytischer Spaltstelle versehenes chCAR-Fc ist ein über Disulfidbrücken verbundenes Dimer. 10 % SDS-PAGE des Protein-A-Sepharose-Eluates unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen zeigt dominierende Banden bei 60 kDa bzw. bei 120 oder 190 kDa. Je Spur ist 1 µg geladen. **B** Trennung von chCAR_{ohne Fc} und restlichen Proteinen nach proteolytischer Spaltung durch Prescission-Protease. 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen nach der proteolytischen Spaltung von chCAR-Fc im präparativen Maßstab. Durch die Spaltung wird die Bande bei 60 kDa stark dezimiert und es entstehen Produkte ober- und unterhalb des 31-kDa-Markers. Der Protein-A-Sepharose-Durchlauf enthält nur chCAR_{ohne Fc} und Prescission-Protease (die eine apparente Masse von 43 kDa hat) sowie etwas GST (apparentes Molekulargewicht von 27kDa), das aus der Prescission-Protease-Präparation stammt. Das Protein-A-Sepharose-Eluat enthält Fc und andere Proteine. Der Protein-A-Sepharose-Durchlauf wurde weiter über Glutathion-Sepharose gereinigt. Daran binden GST und die GST-markierte Prescission-Protease, welche im Glutathion-Sepharose-Eluat zu sehen sind. Im Durchlauf befindet sich chCAR_{ohne Fc}. Pro Spur sind je 3 µg geladen. **C** Elutionsprofil vom Anionenaustauscher SourceQ von chCAR_{ohne Fc}. chCAR_{ohne Fc} eluiert bei steigender NaCl-Konzentration in den Fraktionen 10-13 bei etwa 100 mM NaCl. **D** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Fraktionen 9-14 des SourceQ-Eluates. Zu sehen ist eine dominierende Bande leicht oberhalb des 31-kDa-Markers. Im Vergleich vom Säulenauftrag und Durchlauf des Anionenaustauschers SourceQ ist zu sehen, dass fast die gesamte Menge an chCAR_{ohne Fc} an SourceQ gebunden hat. Je Spur sind 10 µL geladen. **E** Gelfiltration von Fraktion 11 des SourceQ-Eluates. chCAR_{ohne Fc} eluiert in einem asymmetrischen Absorptionsmaximum bei einem Elutionsvolumen von 14,5mL und einem zweiten Maximum bei 15,3mL. **F** chCAR_{ohne Fc} eluiert in den Fr 15-20. 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Fr 12-20 des Gelfiltrationslaufs von SourceQ-Fr 11. Eine dominierende Bande auf der Höhe des 31-kDa-Markers ist zu erkennen. Je Spur sind 20 µL geladen. **G** Interne Disulfidbrücken von chCAR_{ohne Fc} sind geschlossen. 15 % SDS-PAGE der Gelfiltrationsfraktion 16. Geladen sind je 4 µg. **H** WB-Analyse beweist, dass es sich bei chCAR_{ohne Fc} um extrazelluläres Segment vom chCAR handelt. 15 % SDS-PAGE der Gelfiltrationsfraktion 16 mit anschließendem Western Blot mit anti-chCAR-Antikörper (mAk12-36). Als Kontrolle diente der sekundäre Antikörper G-anti-M-AP. Je Spur sind 0,4 µg geladen. **I** ESI-MS-Analyse (von Albrecht Otto) der Bande aus der Gelfiltrationsfraktion 16. Es wurden Peptide (rot unterlegt) aus dem extrazellulären Segment vom chCAR gefunden. Unterstrichen ist die theoretische AS-Sequenz des extrazellulären Segments vom chCAR. Dargestellt ist die komplette AS-Sequenz vom chCAR Pr.-Pr.: Prescission-Protease

4.1.2.4 Deglycosylierung von chCAR_{ohne Fc}

Die apparente Masse von chCAR_{ohne Fc} in der SDS-PAGE lässt sich durch die Behandlung mit der Endo-Glycosidase PNGaseF verringern (Abb. 4.9 A), was dafür spricht, dass es sich hierbei um ein N-glycosyliertes Protein handelt. Da allerdings chCAR_{ohne Fc} unter nicht-denaturierenden Bedingungen deglycosyliert werden sollte (PNGaseF arbeitet optimal wenn das Glycoprotein Hitze-denaturiert ist, musste für den präparativen Schritt (2 h bei 37 °C) eine große Menge an PNGaseF eingesetzt werden (Massen-Verhältnis etwa 1:1) (Abb. 4.9 B).

Ergebnisse

Das vollständig deglycosylierte chCAR_{ohne Fc} (chCAR_{ohne Fc} degl) wurde mittels Anionenaustauscher-Chromatographie von der PNGaseF abgetrennt (Abb. 4.9 C und D). Die apparente Masse von chCAR_{ohne Fc} degl gleicht in der SDS-PAGE derjenigen des bakteriell gewonnenen mCAR_{extra} (Abb. 4.9 E).



Ergebnisse

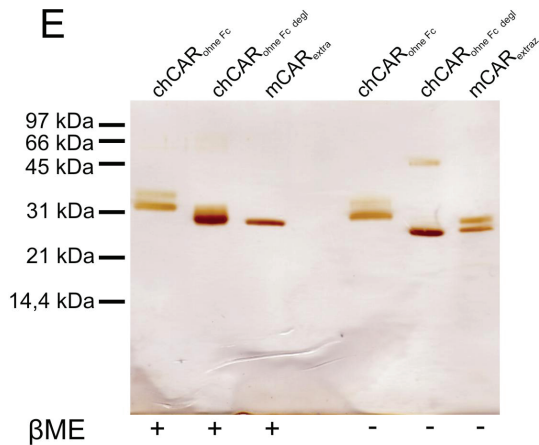


Abb. 4.9 chCAR_{ohne Fc}: enzymatische Entfernung der N-Glycosylierung. **A** Deglycosylierung von chCAR_{ohne Fc} durch PNGaseF reduziert apparente Masse. 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse mit anti-chCAR-Antikörper (mAk12-36) von chCAR_{ohne Fc} behandelt mit verschiedenen Mengen an PNGaseF. Die Pünktchen zeigen die nach Ponceau S Färbung sichtbare Bande der PNGaseF an. **B** Deglycosylierung von chCAR_{ohne Fc} durch PNGaseF im präparativen Maßstab. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von vollständiger Deglycosylierung von chCAR_{ohne Fc}. Die Bande unterhalb des 31-kDa-Markers ist chCAR_{ohne Fc degl} und die Bande darüber ist die PNGaseF. Um eine vollständige Deglycosylierung unter nativen Bedingungen zu erreichen, ist in etwa ein Massen-Verhältnis von 1:1 erforderlich. 3 µg Protein geladen. **C** Elutionsprofil vom Anionenaustauscher MonoQ des Deglycosylierungsansatzes zur Trennung von chCAR_{ohne Fc degl} und PNGaseF. Letztere bindet nicht an MonoQ und erscheint im Durchlauf (0-4,5 mL). chCAR_{ohne Fc degl} eluiert bei 100 mM NaCl. **D** chCAR_{ohne Fc degl} eluiert in den Fr 19-22. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Fraktionen des MonoQ-Durchlaufes und Eluates. Vor dem Auftrag auf den Anionenaustauscher wurde der Deglycosylierungsansatz einmal gegen den Laufpuffer (20 mM Tris pH 8) dialysiert, was zu einer Reduktion des Anteils an chCAR_{ohne Fc degl} führt. Je Spur sind 10 µL geladen. **E** chCAR_{ohne Fc degl} hat gleiche apparente Masse wie bakteriell gewonnenes mCAR_{extra}. 15 % SDS-PAGE von chCAR_{ohne Fc}, chCAR_{ohne Fc degl} und mCAR_{extra}.

4.1.3 Kontrollproteine oder potentielle Bindungspartner vom CAR

4.1.3.1 β 1-Neurexin LNS-Domäne: bakteriell hergestellt

Die extrazelluläre Domäne „laminin G-like domain“ (auch „Laminin, Neurexin, Sexhormone-binding protein domain“ (LNS-Domäne) genannt) von β 2-Neurexin diente in Bindungsversuchen als Kontrollprotein und wurde ebenfalls aus einem GST-Fusionsprotein gewonnen (Plasmid von Comoletti et al. zur Verfügung gestellt (Comoletti et al., 2007)). Die

Ergebnisse

bakterielle Expression und anschließende Aufreinigung an Glutathion-Sepharose wurde von Mechthild Henning durchgeführt. Die resultierende Fraktion wurde durch Anionenaustauscher-Chromatographie weiter gereinigt (Abb. 4.10 A und B).

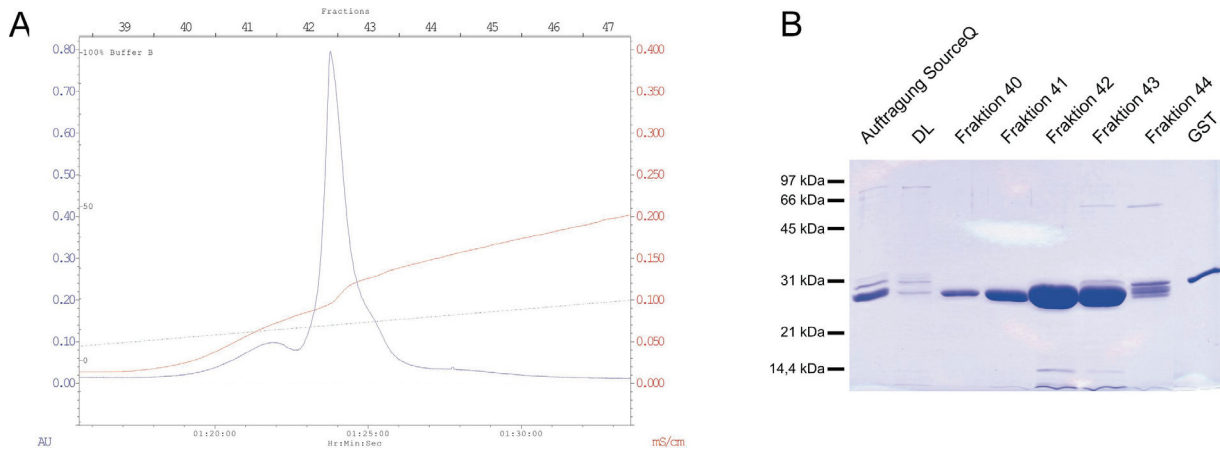


Abb. 4.10 Bakterielle Herstellung und Aufreinigung der LNS-Domäne des extrazellulären Segments von $\beta 2$ -Neurexin. **A** Elution vom Anionenaustauscher SourceQ, beladen mit Glutathion-Sepharose-Durchlauf nach proteolytischer Spaltung durch Prescission-Protease. **B** LNS-Domäne von $\beta 2$ -Neurexin eluiert in den Fr 40-43. 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der SourceQ-Fractionen. Die Fr 40-43 enthalten kein GST, sondern zum überwiegenden Teil nur die LNS-Domäne von $\beta 2$ -Neurexin. Fraktion 44 enthält vermutlich zusätzlich GST. Zum Vergleich ist GST rechts davon aufgetragen. Gel angefertigt von Mechthild Henning. Je Spur sind 30 μ L bzw. im Fall von GST 10 μ L geladen.

4.1.3.2 Zytoplasmatisches Neurexin: bakteriell hergestellt

Der zytoplasmatische Teil von $\alpha 2$ -Neurexin ($\alpha 2$ -Neurexin_{cyt}) wurde aus einem GST-Fusionprotein gewonnen (von Mechthild Henning zur Expression gebracht, an Glutathion-Sepharose gereinigt und mit Prescission-Protease gespalten). Zur Optimierung des Reinheitsgrades von $\alpha 2$ -Neurexin_{cyt} schlossen sich zusätzliche Reinigungsschritte mittels Kationenaustauscher Gelfiltration an, was eine nahezu GST-freie Präparation ergab (Abb. 4.11 A-D). In einer Parallelaufreinigung durchgeführt von Fritz G. Rathjen wurde das $\alpha 2$ -Neurexin_{cyt} Mäusen zur Gewinnung monoklonaler Antikörper gespritzt. Die resultierenden mAbs sind in der Lage im WB-Analysen Neurexin aus Gewebelysaten nachzuweisen.

Ergebnisse

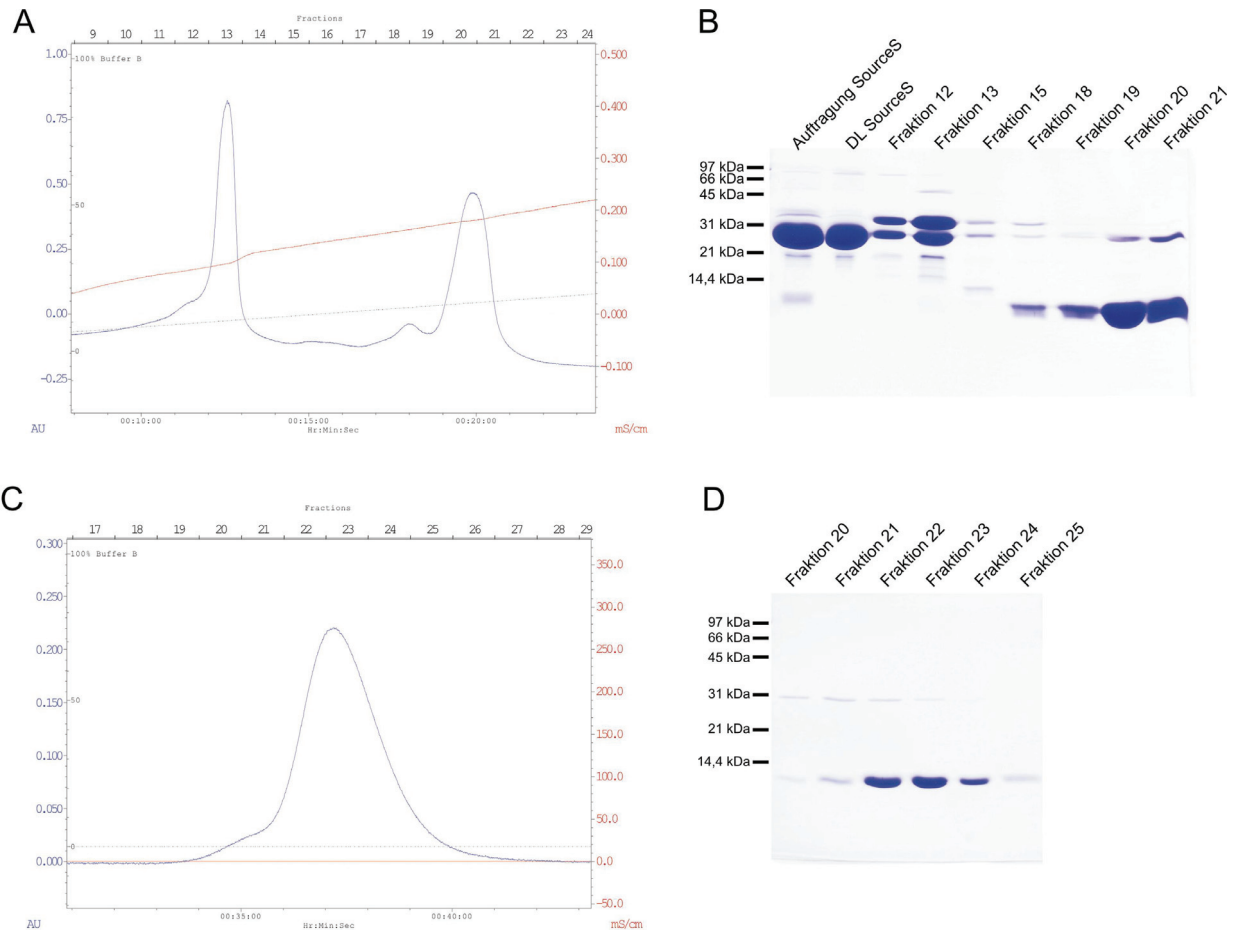


Abb. 4.11 Bakterielle Überexpression und Aufreinigung des zytoplasmatischen Segments von $\alpha 2$ -Neurexin. **A** Elutionsprofil des FPLC-Laufes mit dem Kationenaustauscher SourceS beschickt mit Glutathion-Sepharose-Durchlauf nach Precision-Protease-Verdau. **B** 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der SourceS-Fractionen. Ein Großteil des GST bindet im Gegensatz zu $\alpha 2$ -Neurexin_{cyt} nicht an SourceS. Vermutlich durch restliches GST verunreinigtes $\alpha 2$ -Neurexin_{cyt} eluiert in den Fraktionen 18-21. Geladen sind 20 μ L je Spur. **C** Elutionsprofil der Gelfiltration der SourceS-Fractionen 20 und 21. **D** 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Gelfiltrationsfraktionen. Die Fraktionen 23 und 24 sind „sauber“. Die sich aus AS-Sequenz ergebende Masse von $\alpha 2$ -Neurexin_{cyt} beträgt ca. 7 kDa. Auf dem Gel ist eine Bande unterhalb des 14,4-kDa-Markers zu sehen. Je Spur sind 20 μ L geladen.

4.1.3.3 Eukaryontisch hergestelltes und gereinigtes chAgrin

Um die These zu prüfen, ob Agrin ein extrazellulärer Bindungspartner vom CAR ist, wurde chAgrin aus den Zellkulturüberständen stabil transfizierter HEK-293 Zellen (von Stephan Kröger zur Verfügung gestellt) mittels Immunaffinitätschromatographie (mAk5B1: ebenfalls von Stephan Kröger zur Verfügung gestellt) isoliert. Diese Isolate wurden gesammelt

Ergebnisse

und durch einen Anionenaustauscher ankonzentriert (Abb. 4.12 A-E). Das Heparansulfat-Proteoglycan Agrin wurde in zwei verschiedene Formen hergestellt, die sich an den so genannten X-, Y- und Z-Positionen unterscheiden: chAgrin748 und chAgrin000 (Abb. 5.2). Agrin000 ist im Gegensatz zu Agrin748 nicht in der Lage die Aggregation des AChR zu induzieren (Bezakova und Ruegg, 2003).

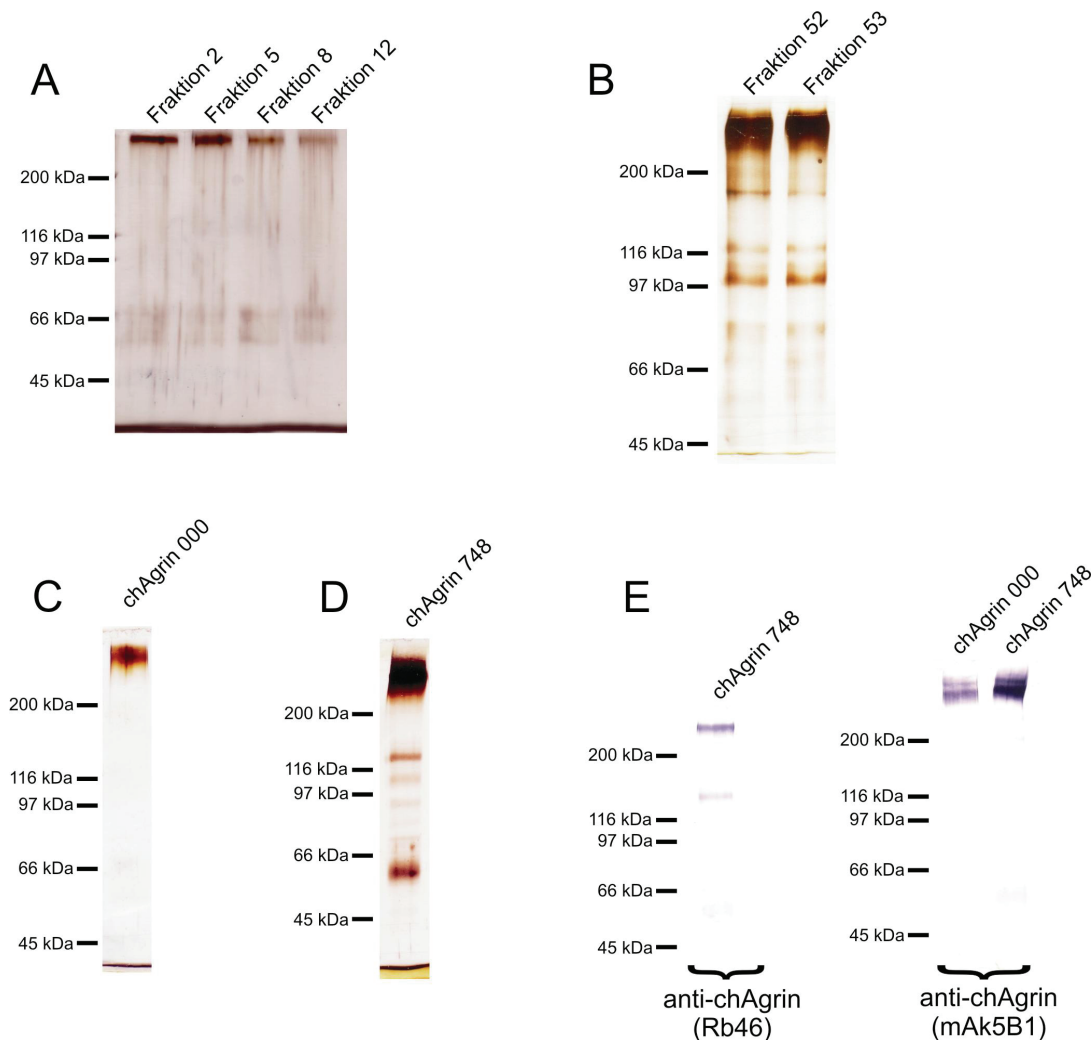


Abb. 4.12 Eukaryontische Herstellung und Aufreinigung von chAgrin 748 und 000 (beide Isoformen auf identische Weise gewonnen) aus Kulturüberständen stabil transfizierter HEK 293 Zellen. **A** Immunsaffinitätsreinigung von chAgrin 748. 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Elution (0,1M DEA pH 11,5) der Immunsaffinitätschromatographie von chAgrin (mAk5B1-Affigel), unterteilt in Fraktionen zu je 1 mL. chAgrin ist aufgrund seiner hohen Masse am oberen Ende des Gels zu sehen. Je Spur sind 20 μ L geladen. **B** chAgrin000 Eluat von mAk5B1-Affigel eluiert vom Anionenaustauscher MonoQ. 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. Da Agrin aufgrund seiner negativen Ladung, der massiven Heparansulfat-Glycosylierung geschuldet, an viele Oberflächen bindet, mussten Dialyse-Schritte und Ultrafiltrationsschritte eingeschränkt werden, um starke Verluste in der Proteinausbeute zu verhindern. Je Spur sind 10 μ L Probe geladen. **C + D** chAgrin000 und chAgrin748 nach Dialyse gegen PBS. 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von chAgrin 000 und chAgrin 748 aus. Deutlich zu sehen ist die durch Glycosylierung verursachte Mikroheterogenität der Agrin-Bande. Je 1 μ g Protein geladen. **E** WB-Analyse beweist, dass es sich bei isolierten Proteinen um

Ergebnisse

chAgrin handelt. 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von chAgrin 000 und chAgrin 748 mit anschließendem Immunnachweis mit anti-chAgrin-Antikörpern (pAk46 und mAk5B1). Je Spur sind 0,1 µg Agrin geladen.

4.1.3.3.1 Agrin bindet an FN

Eine Beobachtung soll hier angeführt werden: Agrin und FN interagieren miteinander. Das hieße, dass Agrin-haltige basale Laminae auch FN binden können, wobei CAR und Agrin möglicherweise um dieselbe Bindungsregion konkurrieren. Die zweite Heparinbindungsdomäne von FN (welche auch die CAR-Bindungsregion enthält, 4.2.2.3) stellt die hochaffine Heparinbindestelle von FN dar. Heparin ist im Gewebe überwiegend in Form von Heparansulfat-Proteoglycanen vorhanden, zu denen Agrin gehört.

Bei der Reinigung von chAgrin 748 zeigte sich, dass FN aus den Serum-haltigen Kulturüberständen ko-isoliert wird, wenn und nur wenn die Kulturüberstände Agrin-748-haltig sind (Abb. 5.27). Da FN selbst nicht an mAk5B1 bindet, ist es möglicherweise Agrin748, das an FN bindet. Ob Agrin 000 an FN bindet wurde nicht getestet.

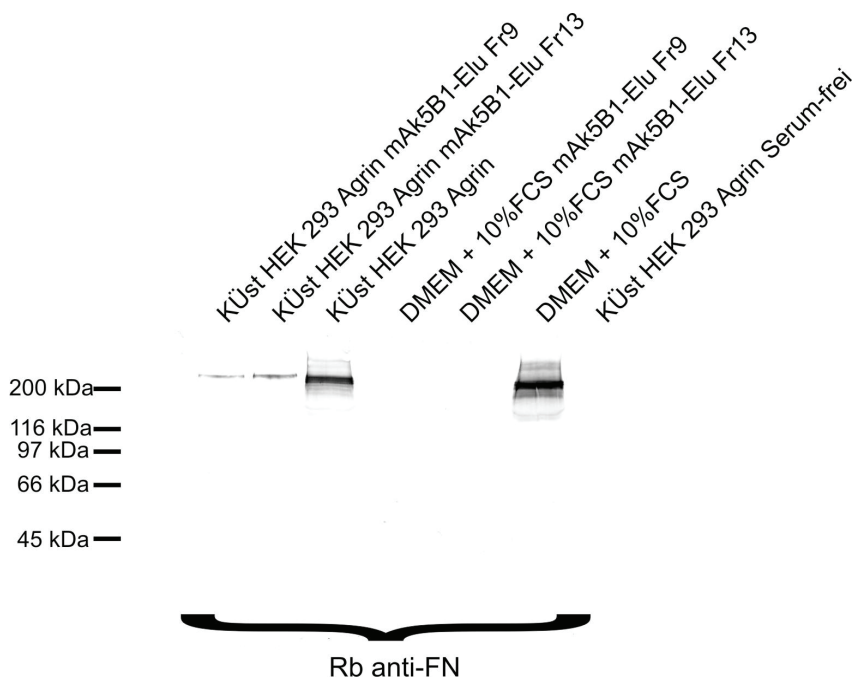


Abb. 4.13 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse gegen FN. Pro Spur sind je 25µL geladen. FN wird mit chAgrin 748 aus Serum-haltigen Kulturüberständen (KÜst) stabil transfizierter HEK-293 Zellen über anti-chAgrin-Ak-Affigel (mAk5B1) ko-isoliert. Wird unter gleichen Bedingungen

Ergebnisse

unbenutztes Kulturmedium (DMEM + 10% FCS) auf mAk5B1-Affigel aufgetragen, so ist keine FN-Isolation zu sehen.

4.1.3.4 Aufreinigung von nativem FN aus Plasma

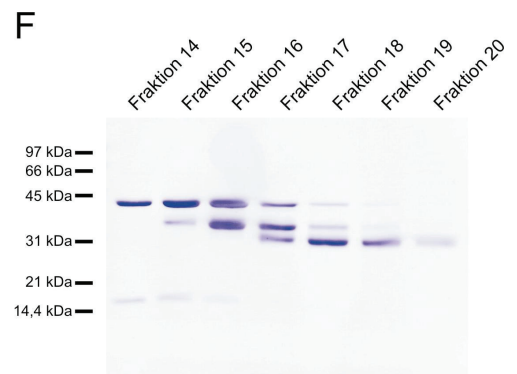
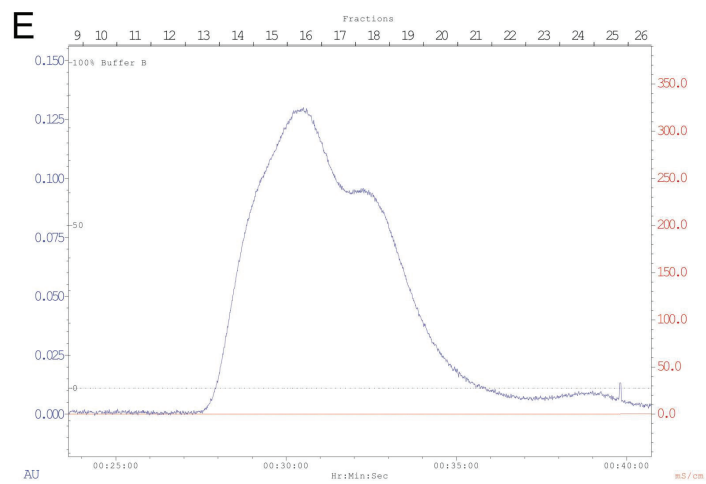
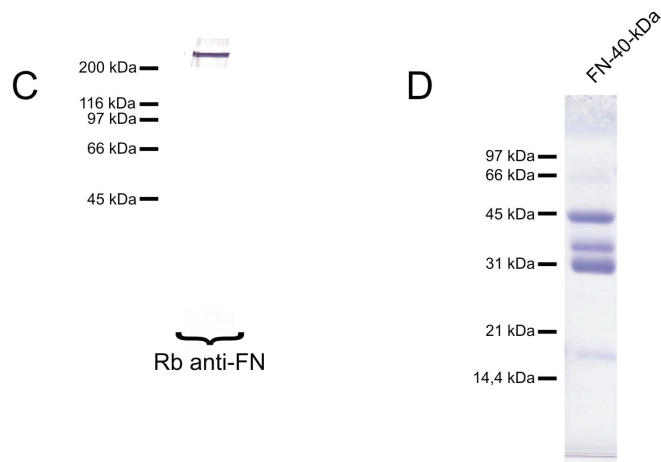
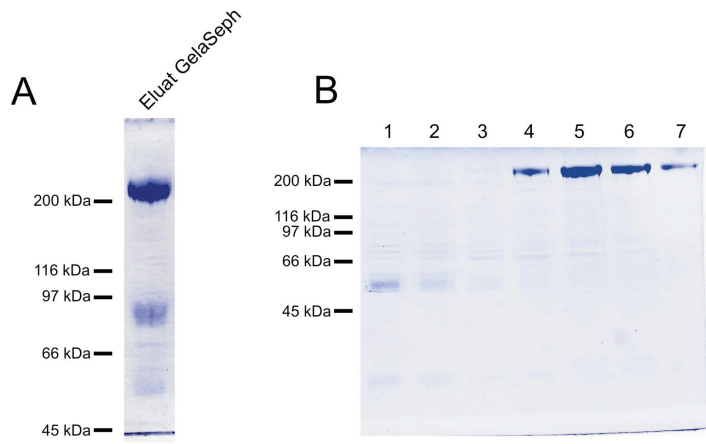
Für Affinitätschromatographische Zwecke (Kopplung von FN an CNBr-Sepharose, um zu prüfen, ob auf diese Weise CAR aus Gewebelysat isoliert werden kann) wurden größere Mengen an nativem FN benötigt. Dazu wurde aus bovinem Plasma FN (Vuento und Vahe-ri, 1979) isoliert. Die Aufreinigungsstrategie nutzt aus, dass FN N-terminal eine Bindungsstelle für Gelatine (bzw. Kollagen) und zudem noch zwei Heparinbindedomänen hat: die erste N-terminal und die zweite C-terminal. Mittels an Sepharose gekoppelter Gelatine (vom Schwein) wurden in einem ersten Reinigungsschritt FN und wenige weitere kontaminierende Proteine isoliert. Diese Fraktion wurde in einem zweiten Schritt durch Heparin-Sepharose weiter gereinigt und eine „saubere“ FN-Präparation konnte somit erhalten werden (Abb. 4.14 A-C).

4.1.3.5 FN-40-kDa und weitere FN-Fragmente

Mit der Absicht die CAR-Bindungsregion von FN durch Bindungsexperimente grob zu lokalisieren, wurden kommerziell erhältliche proteolytisch gewonnene FN-Fragmente verwendet. Eines dieser Fragmente war vom molekularen Gesichtspunkt her uneinheitlich: das α -chymotrypsische Fragment humanen Fibronektins (die zweite Heparinbindedomäne umfassend) enthielt nach SDS-PAGE zu urteilen drei Fraktionen (Abb. 4.14 D). Diese konnten mittels Gelfiltration soweit voneinander getrennt werden, dass die größte (ca. 40 kDa) und die kleinste (ca. 30 kDa) Komponente jeweils isoliert erhalten wurden (Abb. 4.14 E und F). Beide Fragmente erweisen sich als extrazellulärer Bindungspartner vom CAR (4.2.2.3). Um die genaue AS-Sequenz zu ermitteln wurde der N-Terminus dieses Fragmentes mittels Edman-Abbau durch die Firma WITA GmbH ermittelt sowie das genaue Molekulargewicht durch ESI-MS von Albrecht Otto bestimmt (Abb. 4.14 G-I)

Weitere FN-Fragmente, die kommerziell erworben wurden, sowie deren Sequenzabdeckung des intakten FNs sind in Abb. 4.14 (J-L) gezeigt.

Ergebnisse

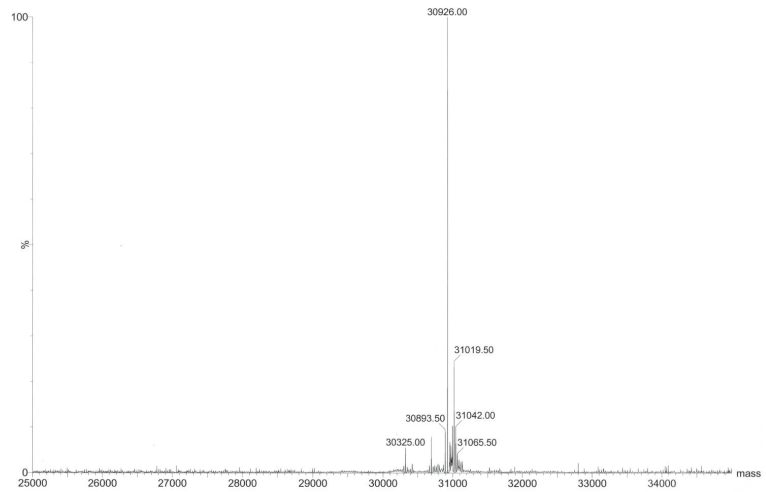


Ergebnisse

G

Cycle #	PTH- AA
1	V
2	Q
3	T
4	A
5	V
6	T
7	T
8	I
9	P
10	A
11	P
12	T
13	D
14	L
15	K

H

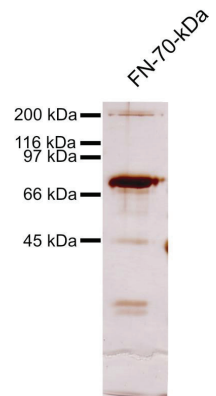


I

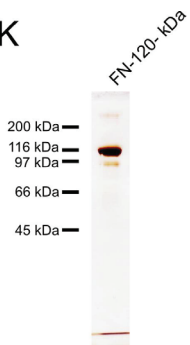
```

1  VQTAVTTIPA PTDLKFTQVT PLSLSAQWTP PNVQLTGYRV RVTPKEKTGP
51  MKEINLAPDS SSVVVSGLMV ATKYEVSVYA LKDTLTSRPA QGVVTTLENV
101 SPPRRARVTD ATETTITISW RTKTETITGF QVDAVPANGQ TPIQRTIKPD
151 VRSYTITGLQ PGTDYKIYLY TLNDNARSSP VVIDASTAID APSNLRFLAT
201 TPNSLLVSWQ PPRARITGYI IKYEKPGSPP REVVPRPRPG VTEATITGLE
251 PGTEYTIYVI ALKNNOKSEP LIGRKKTVOK TPF
    
```

J



K



L



N



C

Abb. 4.14 Aus Plasma gereinigtes FN und kommerziell erworbene FN-Fragmente: **A** FN aus bovinem Plasma eluiert von Gelatine-Sepharose. 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. FN (oberhalb von 200-kDa-Marker) ist die dominierende Bande. Eine andere Bande ist bei 80 kDa zu sehen. 20 μ L Probe geladen. **B** Gelatine-Sepharose-Eluat gereinigt über Heparin-Sepharose. 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedin-

Ergebnisse

gungen. In den Spuren 4-7 ist „sauberes“ FN zu sehen. Je Spur sind 5 μ L geladen. **C** WB-Analyse beweist, dass es bei Heparin-Sepharose-Eluat um FN handelt. 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließendem Immunnachweis mit Rb anti-FN. 0,1 μ g Protein geladen. **D** Kommerziell erworbenes 40-kDa-Fragment der 2.Heparinbindedomäne von FN enthält drei Haptanden. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen. 10 μ g Protein geladen. **E** Elutionsprofil der Gelfiltration (mit Superdex 200 HR) von 500- μ g des 40-kDa-Fragmentes. Innerhalb der Fraktionen 14-20 gibt es mehrere Absorptionsmaxima. **F** Verschiedene Komponenten des 40-kDa-Fragmentes lassen sich durch Gelfiltration voneinander trennen. 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen der Fr 14-20 aus der Gelfiltration. Fr 14 enthält fast ausschließlich die 40-kDa-Komponente und Fraktion 19 fast ausschließlich die 30-kDa-Komponente. Je Spur wurden 20 μ L geladen. **G** Von WITA GmbH durch Edman-Abbau ermittelter N-Terminus der 30-kDa-Komponente. **H** Von Albrecht Otto durch ESI-MS bestimmte Masse der 30-kDa-Komponente ist 30926 Da. **I** Mittels N-Terminusbestimmung, Masse und Sequenz-Datenbankeintrag des intakten hFN bestimmte AS-Sequenz der 30-kDa-Komponente. **J** 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen des gekauften N-terminalen 70-kDa-Fragments von hFN. 2 μ g Protein geladen. **K** 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen des gekauften 120-kDa-Fragments von hFN. Es umfasst die so genannte Zelladhäsionsdomäne. 2 μ g Protein geladen. **L** Schematische Darstellung einer Polypeptidkette von hFN und der Lokalisation der hier verwendeten proteolytischen Fragmente.

4.1.4 Zusätzliche verwendete potentielle CAR-Bindungspartner

4.1.4.1 SDS-PAGE von bFibulin-1, chTenascin-R, bFN, mLaminin-1, Ad2 C428N Fiber Knob, b α + β Tubulin, bProfilin-1, ch α -Actinin und bAktin

Die Proteine, deren Aufreinigung in den vorangegangenen Abschnitten nicht genauer beschrieben wurde, stammen entweder aus Aufreinigungen von Fritz G. Rathjen und Kollegen (chTenascin-R (Nörenberg et al., 1995) und Ad2 C428N Fiber Knob, wobei das Expressionsplasmid aus dem Labor von Paul Freimuth (Bewley et al., 1999) stammt) aus einer Aufreinigung während der Diplomarbeit (Patzke, 2004) (bFibulin-1), sind kommerzielle Produkte (bFN, mLaminin-1, b α + β Tubulin, ch α -Actinin und bAktin) oder wurden zur Verfügung gestellt (bProfilin-1 von Herwig Schüler). Da diese Proteine ebenfalls für Bindungsversuche und Zellkulturexperimente verwendet wurden, sind hier SDS-PAGE gezeigt, um einen Eindruck von der Qualität der Aufreinigungen zu vermitteln.

Ergebnisse

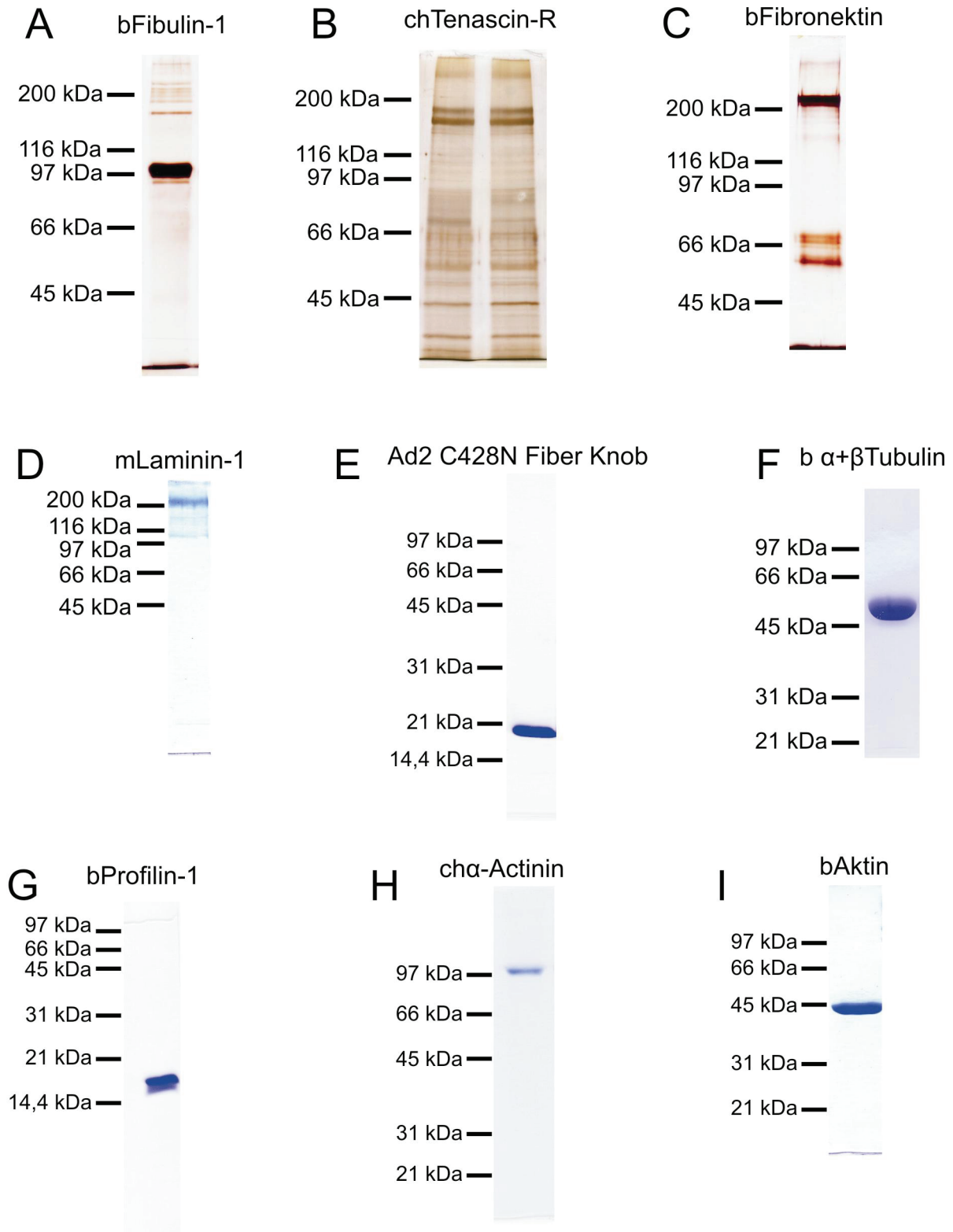


Abb 4.15 SDS-PAGE von weiteren in dieser Arbeit verwendeten Proteinen. **A** 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 20 μ L (240 μ g/mL) bFibulin-1 gereinigt aus FCS. **B** 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 20 μ L (137 μ g/mL) von immunaffinitätsisoliertem chTenascin-R. Gel angefertigt von Hannelore Drechsler. **C** 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen bFN (1 μ g Protein geladen). **D** 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 5 μ L (1 mg/mL) mLaminin-1. **E** 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 1 μ L (12,5 mg/mL) von rekombinant (in *E.coli*) hergestelltem Ad2

Ergebnisse

C428N Fiber Knob. **F** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 20 μ L (1 mg/mL) β -Tubulin, gekauft bei Cytoskeleton. **G** 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 10 μ L (1 mg/mL) Profilin-1. **H** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 10 μ L (620 μ g/mL) α -Actinin. **I** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von 10 μ L (1 mg/mL) bei Cytoskeleton gekauftem Aktin aus dem Herzmuskel.

4.2 Interaktionen der extrazellulären Domänen vom CAR

In einer anderen Arbeit wurden Evidenzen dafür erbracht, dass der extrazelluläre Bereich vom CAR eine adhäsive Funktion hat (Patzke, 2004). Beispielsweise führt eine Blockierung anti-CAR-Antikörper (gegen extrazelluläre Domänen) zu einer Morphologieveränderung von CAR-positiven HeLa und HEK-293 Zellen, adhärert auf FN-beschichteten Kulturschalen. Die äußere Struktur der Zellen wechselt durch Antikörpergabe von abgerundet und flächig ausgebreitet zu zusammengezogen und spitz zulaufend. Es werden vermutlich Zell-Zell-Kontakte aber auch Zell-FN-Kontakte gelöst. Antikörper gegen mL1, mNCAM oder mContactin-1 haben nicht diese drastische Wirkung (Abb. 2.6) (Patzke, 2004). Andere Experimente wiederum haben nahe gelegt, dass CAR besonders stark an Zell-Zell-Kontakten auf der apikalen Seite von epithelialen Zellen lokalisiert ist und ein Bestandteil der „tight junctions“ sein könnte (Cohen et al., 2001b). Am Beispiel der embryonalen Retina wurde gezeigt, dass CAR in frühen Stadien (E4 Hühnchenembryo) nicht nur an der vitrealen Grenze, sondern auch an der Grenze zum Pigmentepithel stark exprimiert wird, wo keine (retinale) basale Lamina, aber besonders N-Cadherin als Bestandteil der „adherens junctions“ vorkommt (Abb. 2.3) (Rathjen, unpubliziert). Diese Resultate lassen also unter anderem den Schluss zu, dass CAR eine adhäsive Funktion ausübt. Um diese Hypothese zu prüfen, sollten hier die molekularen Interaktionen des extrazellulären Segmentes studiert werden.

4.2.1 Homophile Interaktionen der extrazellulären Domänen vom CAR

Die gegenwärtig in der Literatur vorherrschende Meinung über CAR ist, dass es sich dabei um homophiles Zelladhäsionsmolekül handelt (Freimuth et al., 2008; Zhang und Bergelson, 2005; Coyne und Bergelson, 2005). Diese Ansicht beruht zum einem auf Sequenzho-

Ergebnisse

mologien. Andere IgSF-Mitglieder wie NCAM oder L1 sind selbstassoziiierend und vermitteln die homotypische Zelladhäsion (Brümmendorf und Rathjen, 1995). Auch die am nächsten mit CAR verwandten Proteine wurden als homophile Zelladhäsionsmoleküle beschrieben (Raschperger et al., 2004). Wird CAR selbst in CAR-negativen CHO oder C6 Zellen zur Expression gebracht, dann fördert dies ebenfalls die homotypische Zellaggregation (Raschperger et al., 2004; Honda et al., 2000; Excoffon et al., 2005; Excoffon et al., 2007). Ein anderes Argument ist die Tatsache, dass Strukturanalysen gezeigt haben, dass die erste Ig-Domäne vom CAR (D1) ein Dimer ist (Jiang et al., 2004; van Raaij et al., 2000). Daraus wird der Schluss gezogen, dass die homotypische Zelladhäsion über eine D1-D1-Wechselwirkung vermittelt ist.

Auch in dieser Arbeit konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass der extrazelluläre Bereich vom CAR selbstassoziiierend ist.

4.2.1.1 Verstärkte Aggregation von *chCAR*-exprimierenden CHO und NIH 3T3 Zellen unter serumfreien Bedingungen

Um zu untersuchen, ob CAR die homophile Zelladhäsion beeinflusst, wurden CAR-negative CHO und NIH 3T3 Zellen mit *chCAR* stabil transfiziert (von Mechthild Henning vorgenommen) und einem Aggregationsversuch unterzogen. Wie erwähnt wurden diese Versuche bereits von anderen vorgenommen. Allerdings muss erwähnt werden, dass dies ausschließlich unter serumhaltigen Bedingungen geschah, so dass die extrazellulären Bindungspartner vom CAR FN und Fibulin-1 (4.2.2.2) oder andere eventuell dimere ECM-Proteine, die in FCS enthalten sind, eine Art Brücke zwischen den Zellen ausbilden könnten, um eine direkte trans-CAR-Interaktion nur vorzutäuschen. Aus diesem Grund wurden die hier dargestellten Versuche unter serumfreien Bedingungen vorgenommen. Als Kontrolle dienten parentale Zellen oder mit einem anderen Gen transfizierte Zellen (im Fall von NIH 3T3: *SH3-BP4*). Das Ergebnis ist, dass CAR auch unter serumfreien Konditionen die Zell-Aggregation von CHO und NIH 3T3 Zellen fördert (Abb. 4.16). Es wird bereits nach wenigen Minuten eine Abnahme der Partikel-Zahl um etwa 30 % beobachtet. Zellulär gebundenes FN jedoch ist als Ursache dafür unwahrscheinlich, da die Zellen vor dem Versuch etwa 10 min mit PBS / 1 mM EDTA abgelöst wurden, was auch zu einer Loslösung von peripher gebundenem FN führt. Außerdem lässt sich in Extrakten von CHO-Zellen kein FN nachweisen.

Ergebnisse

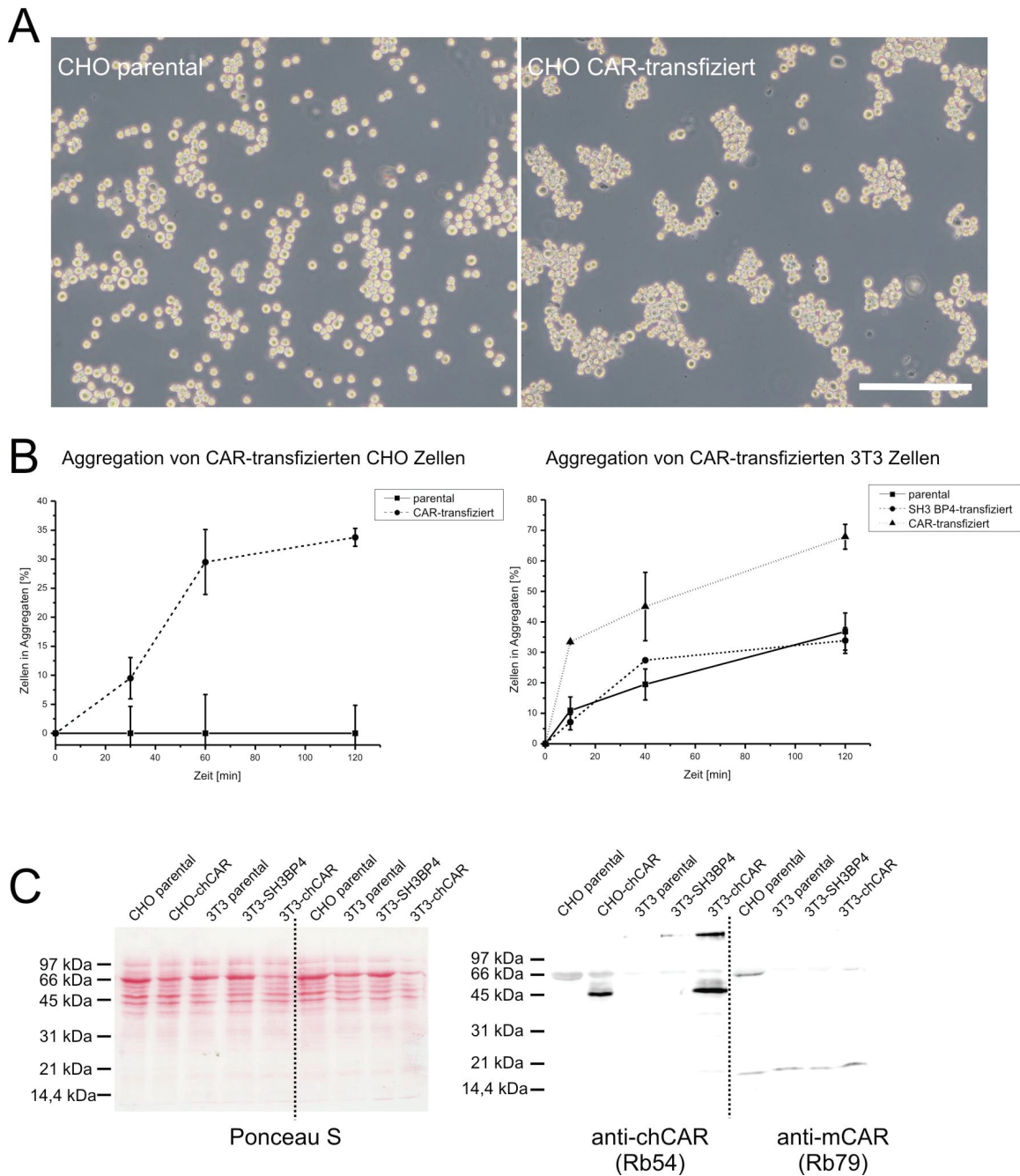


Abb. 4.16 Zell-Aggregation: Mit chCAR stabil transfizierten CHO und NIH 3T3 Zellen (deren Parental-Zellen CAR-negativ sind) zeigen eine verstärkte Zell-Aggregation unter serumfreien Bedingungen während zwei stündiger Inkubation auf einem Schüttler (90 rpm) bei 37 °C. **A** Gegenüber den Parental-Zellen ist bei chCAR-transfizierten CHO Zellen eine Zunahme der Verklumpung bereits nach 10min zu sehen. Maßbalken: 200 µm. **B** Zu vier verschiedenen Zeitpunkten gemessene Partikelzahl erlaubt die prozentuale Bestimmung der Zell-Aggregate. Nach 2 h ist bei CHO sowie NIH 3T3 Zellen, ein Anstieg der Zellaggregate um etwa 30 % zu verzeichnen. Die angegebenen Werte sind das Ergebnis der Messungen an je zwei unterschiedlichen Kulturen. Außerdem wurde das Experiment mindestens zweimal an CHO und NIH 3T3 Zellen durchgeführt, was jedes Mal das Ergebnis erbrachte, dass chCAR die homotypische Aggregation unterstützt. Zur Kontrolle wurden zudem auch *SH3-BP4* stabil transfizierten Zellen verwendet (ein intrazelluläres Protein), die aber keine verstärkte Aggregation zeigten. **C** chCAR-transfizierten Zellen exprimieren chCAR: WB-Analyse der verwendeten Zellli-

Ergebnisse

nien (hier 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen), wobei gleiche Mengen an Zelllysate aufgetragen wurden (je Spur 30 µg Protein). Ein Teil der Nitrocellulose-Membran wurde mit anti-chCAR (pAk54) und der andere Teil mit anti-mCAR (pAk79) inkubiert. pAk79 zeigt, dass die Zellen kein endogenes CAR exprimieren. pAk54 zeigt jeweils eine deutliche Bande bei 45 kDa für die CAR-transfizierten Zellen.

4.2.1.2 Das Fehlen vom CAR führt zu einer Verschlechterung der Zell-Aggregation

Nach 24 h Inkubation embryonaler Maus-Neuronen auf FN-40-kDa-beschichteten (CAR-bindendes FN-Fragment, s. 4.2.2.3) Kulturschalen ist deutlich zu erkennen, dass mCAR-defiziente Neuronen zu etwa 40 % weniger in Aggregaten vorliegen als Wildtyp oder heterozygote Neuronen (Abb. 4.31 D). Nach 48 h allerdings geht dieser Unterschied verloren, was damit zu erklären ist, dass nun insgesamt wesentlich mehr aggregierte Zellen vorliegen als nach 24 h. Der Anteil mCAR-abhängiger Aggregation geht hier in der Masse unter oder wird kompensiert. Auf Laminin-1 gibt es keinen Unterschied im homotypischen Verhalten. Die genetische Inaktivierung vom mCAR beeinträchtigt die homotypische Zellaggregation.

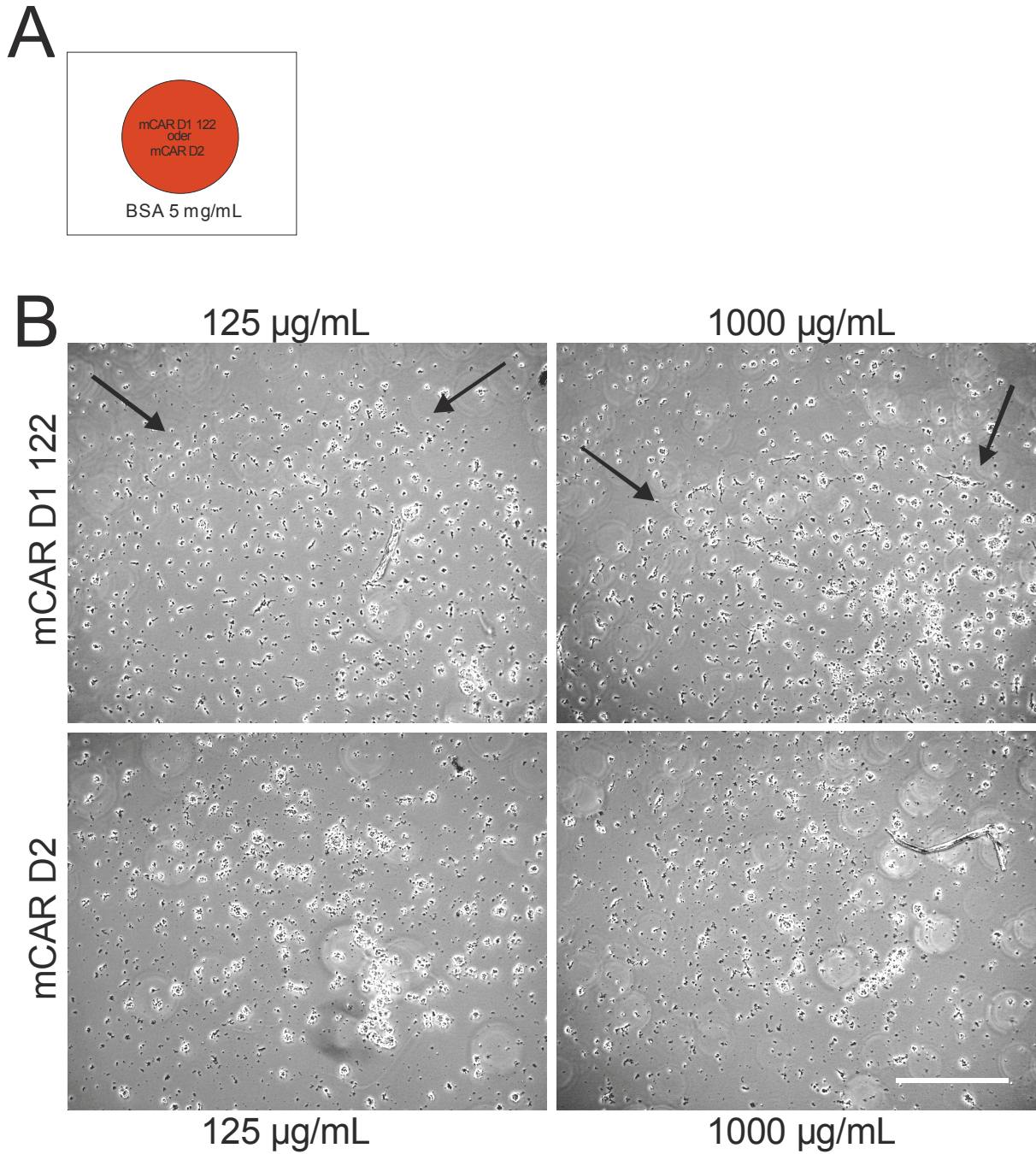
4.2.1.3 Neuronen adhärieren auf mCAR D1 122

Tectale Hühnerneuronen (E6) wurden dissoziiert und auf mCAR D1 122- oder mCAR D2-beschichteten Kulturschalen ausgesät. mCAR D1 122 und mCAR D2 wurden jeweils als 2 µL Tropfen zur Beschichtung der Kulturschale in die Mitte pipettiert. Anschließend wurde der gesamte Kulturgefäßboden mit BSA abgesättigt. (Abb. 4.17 A). Es zeigt sich nach visueller Einschätzung, dass auf mCAR D1 122 schon bei einer Konzentration von 125 µg/mL mehr Neuronen mit der Matrix interagieren und Neuriten ausbilden als auf BSA (4.17 B und C). Bei mCAR D2 ist das kaum der Fall. Geringere Konzentrationen von mCAR D1 122 eignen sich nicht als Substrat (hier nicht abgebildet). Telencephale Neuronen adhärieren schwächer auf mCAR D1 122 und retinale Neuronen so gut wie gar nicht (hier nicht abgebildet).

Um die Substrat-Eigenschaften von mCAR D1 122 besser zu charakterisieren wurden in einem nächsten Experiment die Kulturschalen komplett mit mCAR D1 122 oder mCAR D2 beschichtet und tectale sowie telencephale Neuronen darauf für 24 h kultiviert (Abb. 4.17 C).

Ergebnisse

Dabei bestätigt sich der visuelle Eindruck, dass tectale Neuronen auf mCAR D1 122 adhären und Neuriten ausbilden können. Auf mCAR D2-beschichteten Kulturschalen ist gegenüber BSA-beschichteten Kulturschalen (nicht abgebildet) kein Unterschied zu erkennen.



Ergebnisse

C

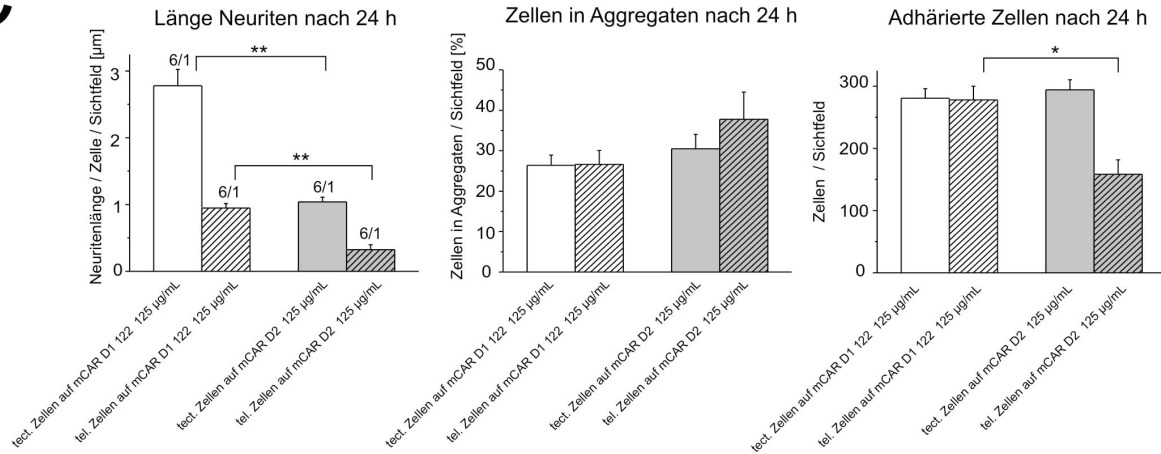


Abb. 4.17 Neuronen adhären und bilden Neuriten aus auf mCAR D1 122, aber nicht auf mCAR D2. Adhäsionsversuch mit mCAR D1 122 und mCAR D2: **A** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Die Kulturschalen wurden jeweils in der Mitte mit einem Tropfen von 2 µL mCAR D1 122 oder mCAR D2 in verschiedenen Konzentrationen beschichtet. Die Form des Tropfens bleibt erhalten. Der Rest der Kulturschale bleibt zunächst trocken. Nach Absättigung mit HBSS-BSA (5 mg/mL) werden tectale (E6 Hühchen) Neuronen darauf ausgesät und für 24 h kultiviert. **B** Tectale Neuronen haften bei mCAR D1 122-Konzentrationen von 125 und 1000 µg/mL bevorzugt in der Mitte der Schale, also auf mCAR D1 122 an und bildeten dort auch Neuriten aus. mCAR D2 wirkt auf die tectalen Neuronen kaum attraktiver als BSA, so dass keine bevorzugte Adhäsion in der Mitte der Kulturschale zu sehen war. Pfeile markieren den Rand des ursprünglichen Tropfens und stellen den Übergang von der mCAR D1 122- zur BSA-Matrix dar. **C** Auswertung der Adhäsion. Tectale (E6 Hühchen) oder telencephale (E6 Hühchen) Neuronen auf mCAR D1 122 oder mCAR D2 (je 125 µg/mL). Gesamte Fläche des Kulturgefäßbodens wurde mit mCAR D1 122 oder mCAR D2 beschichtet. Absolute Werte für durchschnittliche Neuritenlänge pro Foto, durchschnittlicher Anteil der aggregierten Neuronen (Ansammlung von mehr als 3 Zellen) der Gesamtzellzahl pro Foto und durchschnittliche Anzahl der adhären Zellen pro Foto. Tectale Neuronen zeigen stärkeres Neuritenwachstum auf mCAR D1 122 als auf mCAR D2. Außerdem stärkeres Neuritenwachstum auf mCAR D1 122 von tectalen als von telencephalen Zellen. Die Zahl über den Säulendiagrammen x/y gibt an: Es wurden für diesen Mittelwert x Bilder von insgesamt y Kulturen ausgewertet. Maßbalken: 400µm.

4.2.1.4 HeLa Zellen adhären auf chCAR-Fc

Wie unter Punkt 4.2.2.1 genauer beschrieben sind CAR-positive HeLa Zellen in der Lage, an chCAR-Fc-beschichtete aber nicht an Fc-beschichtete Kulturschalen zu adhären. Dieses Resultat kann entweder so gedeutet werden, dass auf dem Kulturgefäßboden immobilisiertes chCAR-Fc dem zellulären CAR als Ligand dient und möglicherweise CAR als homophiles Zelladhäsionsmolekül fungiert oder dass ein weiterer unbekannter zellulärer Rezeptor an CAR bindet.

4.2.1.5 mCAR D1 122, mCAR D2 sowie Ad2 Fiber Knob C428N fördern Neuritenwachstum und Desaggregation auf mLaminin-1

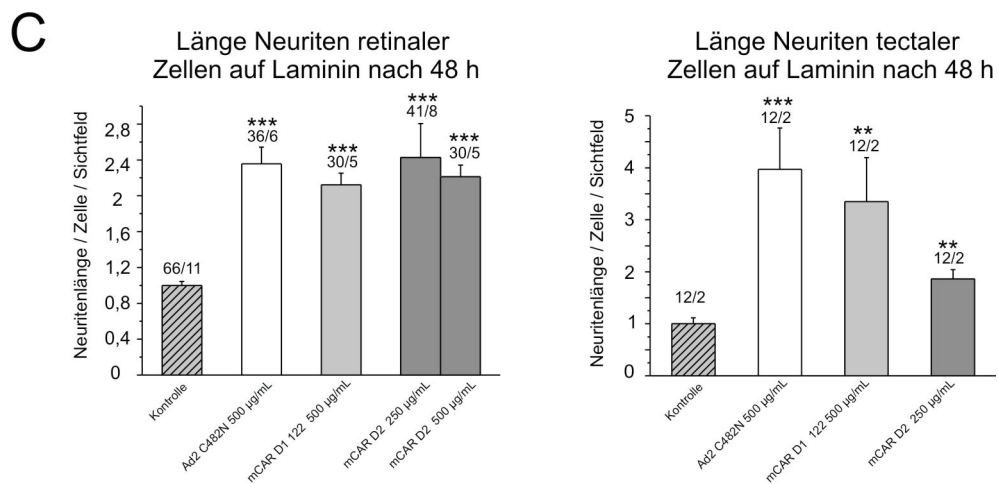
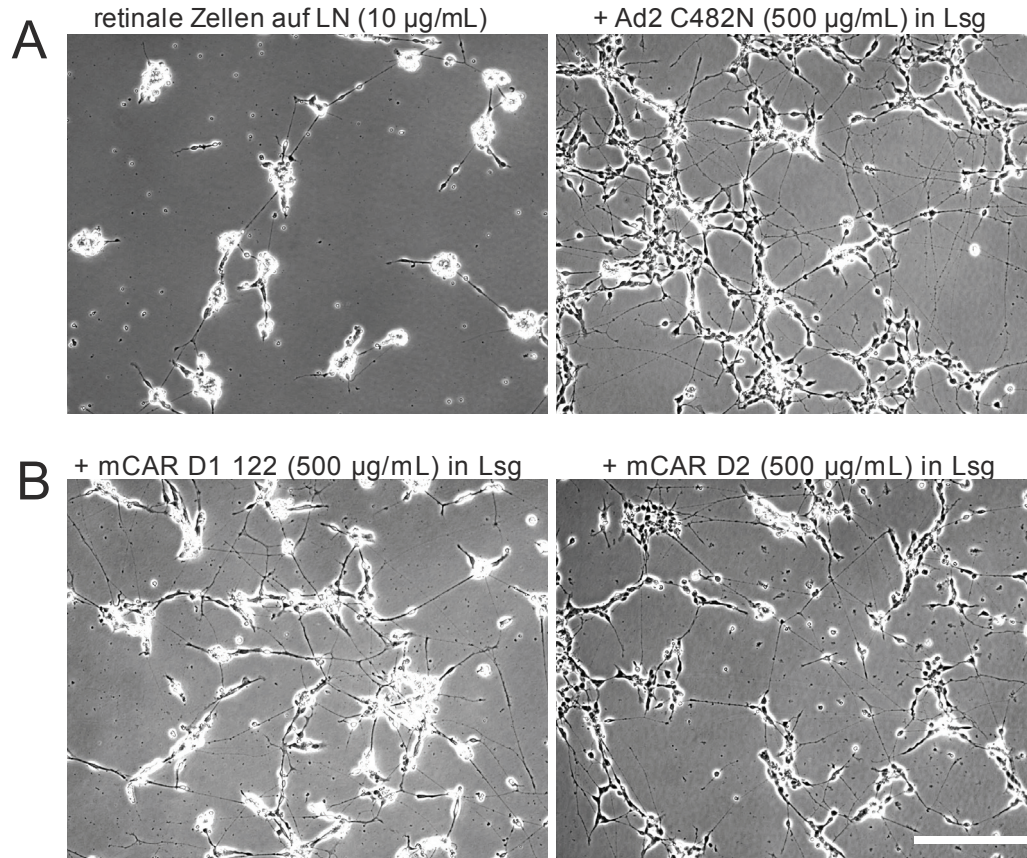
E8 Retinae aus Hühnchen-Embryonen wurden dissoziiert auf mLaminin-1-beschichteten Kulturschalen (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in Gegenwart von gelöstem mCAR D1 122, mCAR D2 oder Ad2 Fiber Knob C428N kultiviert. Um Zell-Laminin-1-Interaktion besonders gut beobachten zu können, wurden retinale Zellen verwendet, da diese im Vergleich zu tectalen oder telencephalen Neuronen (Abb. 4.31 B) ohne Zugabe der genannten Proteine nur ein eingeschränktes Neuritenwachstum auf Laminin-1 zeigen. Alle drei Proteine (bei 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bewirken mindestens eine Verdopplung der durchschnittlichen Neuritenlänge pro Zelle (Abb. 4.18 A-C), wobei zu beachten ist, dass mCAR D2 eventuell (analog zu seiner Bindung an FN, 4.2.2.3) auch an Laminin-1 binden kann und somit auch einen Neuritenwachstumshemmenden Einfluss haben könnte. Letzteres trifft auch zu, wenn die eingesetzten Konzentrationen von mCAR D2 noch weiter ansteigen (hier nicht abgebildet). Die homotypische Zelladhäsion hingegen wird stark beeinträchtigt, was vermutlich zur Folge hat, dass die Interaktion der Neuronen zur Matrix gestärkt wird. Ad2 Fiber Knob C428N sorgt dafür, dass mehr Zellen als in der Kontrolle an Laminin-1 binden (Abb. 4.18 D und E).

Um zu prüfen, ob das beobachtete Verhalten auf die Retina beschränkt ist, wurden auch tectale Neuronen (E6) für diesen Versuch verwendet (Abb. 4.18 C-E). Auch hierbei wird deutlich, dass mCAR D1 122, mCAR D2 und Ad2 Fiber Knob C428N eine Neuritenwachstums-fördernde Wirkung haben, allerdings in einem höheren Maße als bei retinalen Zellen. Wobei erwähnt sein muss, dass tectale Zellen von vornherein längere Neuriten auf mLaminin-1 ausbilden als retinale Zellen bzw. auch weniger Aggregate. Was zur Folge hat, dass die Zugabe der genannten löslichen Proteine nur eine minimale Abnahme der in Aggregaten vorliegenden Neuronen bewirkt. mCAR D2 bewirkt eine erhöhte Anzahl adhärierter tectaler Neuronen, was möglicherweise mit einer eventuellen Bindung an zelluläres chCAR D1 zusammenhängt.

Verschiedene Interpretationen sind möglich: Fiber Knob bewirkt aufgrund seiner trimeren Struktur (Abb. 4.20 A) eine lokale Gruppierung vom CAR auf der Zelloberfläche, was zu einer Veränderung der Bindungsaktivität vom CAR gegenüber weiteren hier nicht identifizierten Interaktionspartnern und letztendlich zu verstärktem Neuritenwachstum führt. Dagegen spricht, dass mCAR D2, welches ein Monomer ist (Abb. 4.29 D) und mCAR D1 122 dies auch bewirken. Alternativ könnten auch andere Rezeptoren für mCAR D1 122 und mCAR D2 beteiligt sein. Jedoch ist dies für den CAR-spezifischen Fiber Knob eher unwahrscheinlich.

Ergebnisse

Zusammengenommen könnten diese Resultate dann widerspruchsfrei gedeutet werden, wenn angenommen wird, dass Ad2 Fiber Knob C428N, mCAR D1 122 und mCAR D2 durch eine Bindung an zelluläres CAR in der Lage sind, die Attraktivität der Zellen untereinander zu verringern, also die homophil-adhäsive Funktion vom CAR zu reduzieren, was die Attraktivität von mLaminin-1 auf die Zellen erhöht.



Ergebnisse

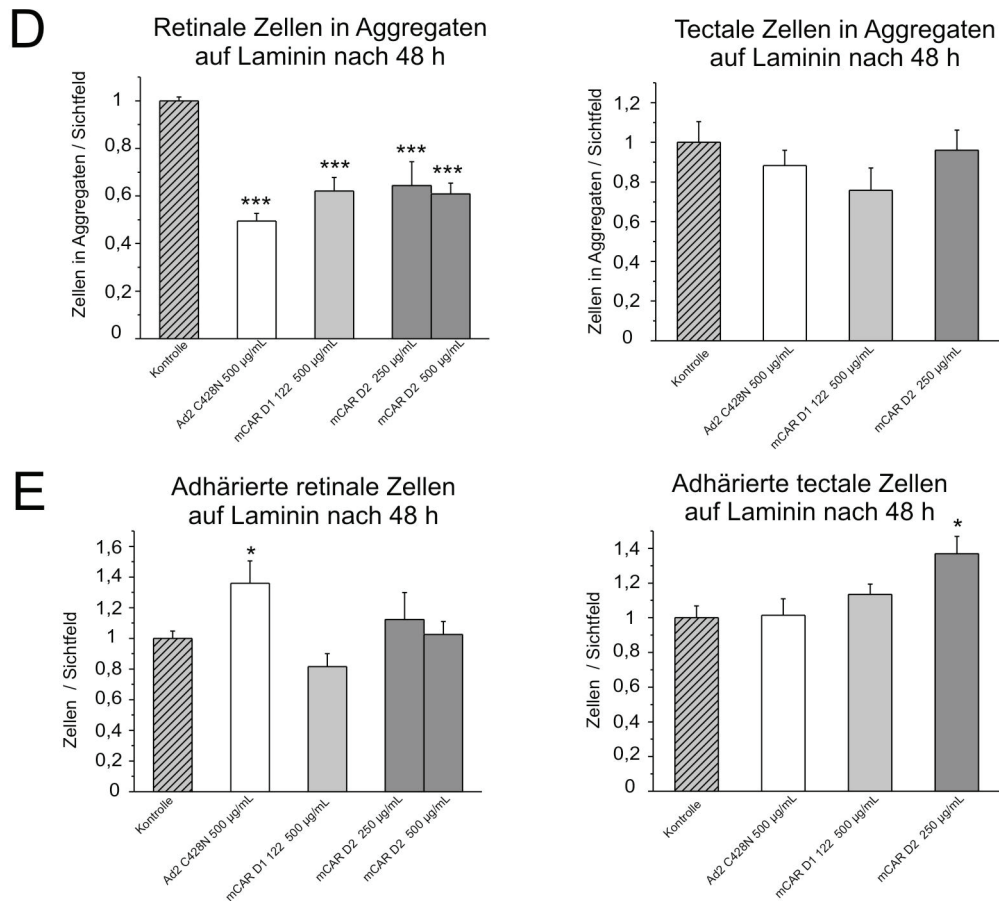


Abb. 4.18 Fiber Knob, mCAR D1 122 und mCAR D2 bewirken Neuritenwachstum embryonaler Neuronen auf mLaminin-1 (10 µg/mL): Retinale Zellen (E8) des Hühnchens sind für 48 h dissoziiert kultiviert auf Laminin-1. Die Anwesenheit von löslichem Ad2 Fiber Knob C428N, mCAR D1 122 oder mCAR D2 fördert Neuritenwachstum und schwächt die Aggregation. **A** Retinale Neuronen auf Laminin-1 liegen zum überwiegenden Teil als Aggregate vor und bilden kaum Neuriten; die Kultivierung in Anwesenheit von Ad2 Fiber Knob C428N führt zu einer deutlich stärkeren Interaktion mit der Matrix, die Aggregate gehen auseinander und das Neuritenwachstum wird gestärkt. **B** Auch in Gegenwart von mCAR D1 122 oder mCAR D2 wird die Interaktion zur Matrix verstärkt. **C** Gemessene durchschnittliche Neuritenlängen pro Zelle pro Foto zeigen, dass Ad2 Fiber Knob C428N (500 µg/mL) den Wert mehr als verdoppelt gegenüber der Kontrolle. Für mCAR D1 122 (500 µg/mL) gilt das gleiche. mCAR D2 hat bei Konzentrationen von 250-500 µg/mL ebenfalls eine stark Neuritenwachstumsfördernde Wirkung. Dieser Effekt ist auch zu beobachten, wenn tectale Neuronen kultiviert werden. **D** Anteil der Zellen pro Foto, die in Aggregaten von mehr als 5 Zellen vorliegen. Durch Kultivierung retinaler Zellen in Anwesenheit der drei genannten Proteine wird die Aggregation stark beeinträchtigt. Tectale Zellen zeigen ein analoges aber schwächeres Verhalten. **E** Vergleicht man die Anzahl der Zellen miteinander, so wird deutlich, dass bei der Retina Ad2 Fiber Knob C428N für eine leichte Zunahme der Adhäsion sorgt. Die Anzahl der an der Matrix angehafteten tectalen Zelle variiert kaum, bis auf eine leichte Zunahme in Gegenwart von mCAR D2 (250 µg/mL).

Alle gemessenen Werte wurden auf den unbehandelten Kontrollwert normalisiert. LN: mLaminin-1. Lsg: Lösung. Maßbalken: 200µm

4.2.1.6 Das extrazelluläre Segment vom CAR ist nur im N-glycosylierten Zustand selbstassoziierend

Nachdem auf zellulärer Ebene geprüft wurde, ob die Möglichkeit besteht, dass die extrazellulären Domänen vom CAR eine Bindung zwischen Zellen vermitteln, sollen hier die molekularen Eigenschaften der CAR-Selbstassoziation untersucht werden. Eine Methode, die dabei zum Einsatz kam, ist die analytische Ultrazentrifugation, im besonderen die Sedimentationsgleichgewicht-Analyse. Diese Technik bietet die Möglichkeit das hydrodynamische Verhalten von Molekülen in Lösung zu betrachten. Wenn Moleküle mit einander in Wechselwirkung treten oder selbstassoziierend sind, dann wird ein Anstieg der durchschnittlichen molekularen Masse beobachtet. Liegt ein Wert vor, der zwischen der Masse des Monomers und des Dimers liegt, so kann auf ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht geschlossen werden.

chCAR-Fc, mCAR_{extra}, mCAR_{ohne Fc} und chCAR_{ohne Fc} wurden mittels Sedimentationsgleichgewicht-Analyse auf ihre selbstassoziativen Eigenschaften hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass chCAR-Fc (in COS-7 Zellen hergestellt) in einem Konzentrationsbereich bis 700 µg/mL in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt, mit einem K_d -Wert von 4,2 µM. Wird mit diesem Resultat aber die Analyse des Fc-Teils verglichen, so ist zu erkennen, dass dies bei gleichen molaren Konzentrationen (die Molmasse von Fc beträgt in etwa die Hälfte von chCAR-Fc) ebenfalls in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt, mit einer Affinität in der gleichen Größenordnung (Abb. 4.19 A und B). Daraus lässt sich zunächst schließen, dass die selbstassoziativen Eigenschaften von chCAR-Fc hauptsächlich dem Fc-Anteil geschuldet sind. Werden nun aber die Eigenschaften von mCAR_{ohne Fc} (in COS-7 Zellen hergestellt) betrachtet, welches wiederum bei gleichen molaren Konzentrationen (die Molmasse von mCAR_{ohne Fc} beträgt in etwa die Hälfte von Fc) in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt (Abb. 4.19 C), so muss die letzte Schlussfolgerung korrigiert werden. Die extrazellulären Domänen vom CAR sind selbstassoziierend. Im Fall von chCAR-Fc kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch der chCAR-Anteil zur homophilen Bindung beiträgt, denn auch chCAR_{ohne Fc} ist selbstassoziierend (Abb. 4.19 E).

Erstaunlicherweise ist mCAR_{extra} (in Bakterien hergestellt) in dem gleichen Konzentrationsbereich nicht selbstassoziierend (Abb. 4.19 D), obwohl die AS-Sequenz nahezu 100% identisch mit derjenigen des mCAR_{ohne Fc} ist. Eine Fehlfaltung von mCAR_{extra} als Ursache dieser Diskrepanz gilt als unwahrscheinlich, da trotz der bakteriellen Herstellung eine Reihe von Wechselwirkungen mit anderen Proteinen nachgewiesen werden konnte (4.2.2.2). Wie unter 4.2.2.3 bzw. 4.2.1.7 gezeigt wird, ist für die Bindung an FN die D2-Domäne und für die

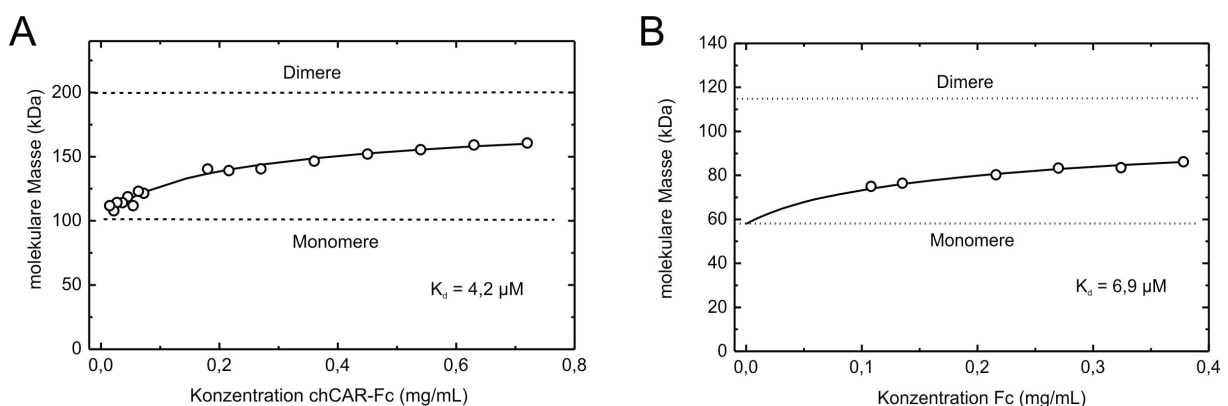
Ergebnisse

Bindung an Ad2 Fiber Knob die D1-Domäne verantwortlich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass beide Domänen funktionell aktiv sind. Trotzdem kann eine Fehlfaltung als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Ein alternatives Argument zur Klärung dieses scheinbaren Widerspruchs lautet: post-translationale Modifikation. Und in der Tat zeigt sich, dass die N-Glycosylierung des extrazellulären Segments vom CAR einen Einfluss auf die selbstassoziativen Eigenschaften hat.

chCAR_{ohne Fc} wurde analog zu mCAR_{ohne Fc} exprimiert und gereinigt. Anschließend wurde es mit PNGaseF unter nicht-denaturierenden Bedingungen deglycosyliert. In der anschließenden Sedimentationsgleichgewicht-Analyse zeigte sich, dass es nicht mehr in der Lage ist homophil zu binden (Abb. 4.19 E). Zieht man zum Vergleich unbehandeltes chCAR_{ohne Fc} heran, welches ebenso wie mCAR_{ohne Fc} in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt, ist die Schlussfolgerung legitim, dass die N-Glycosylierung für die Selbstassoziation in dem untersuchten Konzentrationsbereich (mCAR_{extra} bis etwa 220 µg/mL (Abb. 4.19 C und D) verantwortlich ist.

Die Wahrscheinlichkeit, dass natives neurales CAR ebenfalls N-glycosyliert vorliegt, ist hoch, da die apparente molekulare Masse in der SDS-PAGE von immunaffinitätsgereinigtem chCAR durch die Behandlung mit PNGaseF (Abb. 4.20 A), aber nicht durch β -N-Acetylglucosaminidase, O-Glycosidase, α -2(3,6,8,9)-Neuraminidase und β -1,4-Galactosidase, reduziert wird.

Eine genaue Bestimmung der Masse von chCAR_{ohne Fc} durch ESI-MS zeigt (Abb. 4.20 B), dass es mehrere Maxima gibt, von denen eines der theoretischen Masse des unglycosylierten extrazellulären chCAR sehr nahe kommt. Die Heterogenität kann auf unterschiedlich lange Glycosylierung oder durch Abspaltung im Verlauf der Messung zurückzuführen sein. Das Hauptmaximum zeigt einen um etwa 1,7 kDa höheren Wert als die theoretische Masse (gemäß AS-Sequenz). Der höchste Wert liegt bei ca. 2 kDa über der theoretischen Masse. Das ist ein Hinweis darauf, dass chCAR_{ohne Fc} in etwa einen Kohlenhydratanteil von 1,7-2 kDa hat.



Ergebnisse

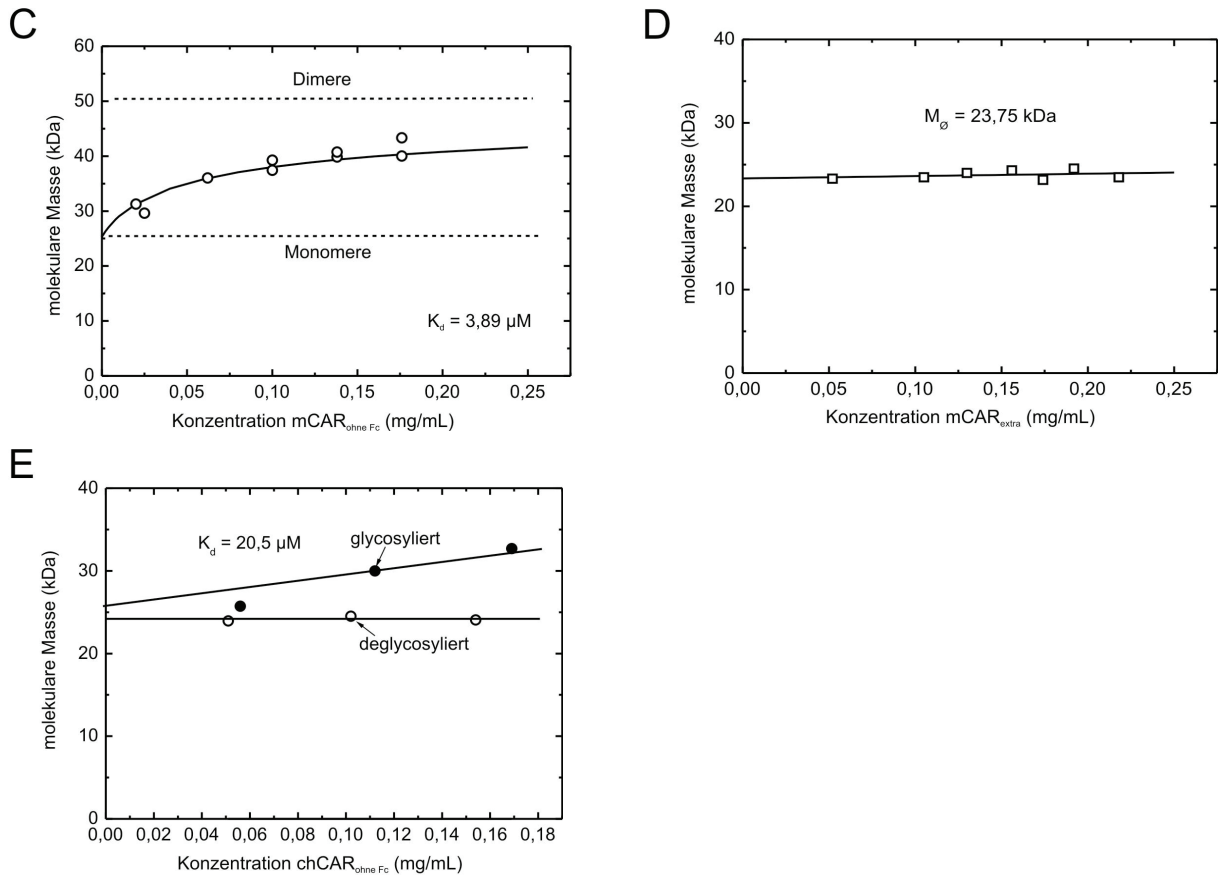


Abb. 4.19 Die extrazellulären Domänen vom CAR sind im N-glycosylierten Zustand. Bindungskurven aus Sedimentationsgleichgewicht-Analysen (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke). **A** Die erhaltene molekulare Masse von chCAR-Fc ist abhängig von der eingesetzten Konzentration. Es liegt ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor. **B** Die gleiche Konzentrationsabhängigkeit zeigt sich auch bei Fc. **C** mCAR_{ohne Fc} zeigt abermals eine gleiche Konzentrationsabhängigkeit. **D** Das nicht-glycosylierte mCAR_{extra}, da aus Bakterien stammend, liegt im gleichen Konzentrationsbereich nur als Monomer vor, da kein Anstieg der Molmasse mit steigender Konzentration zu sehen ist. **E** chCAR_{ohne Fc} dimerisiert nur dann (bei einer Konzentration bis 150 µg/mL), wenn es N-glycosyliert ist. Durch PNGaseF abgespaltene N-Glycosylierung bewirkt bei allen drei eingesetzten Konzentrationen eine gleich bleibende Molmasse. Unbehandeltes chCAR_{ohne Fc} zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Molmasse.

Ergebnisse

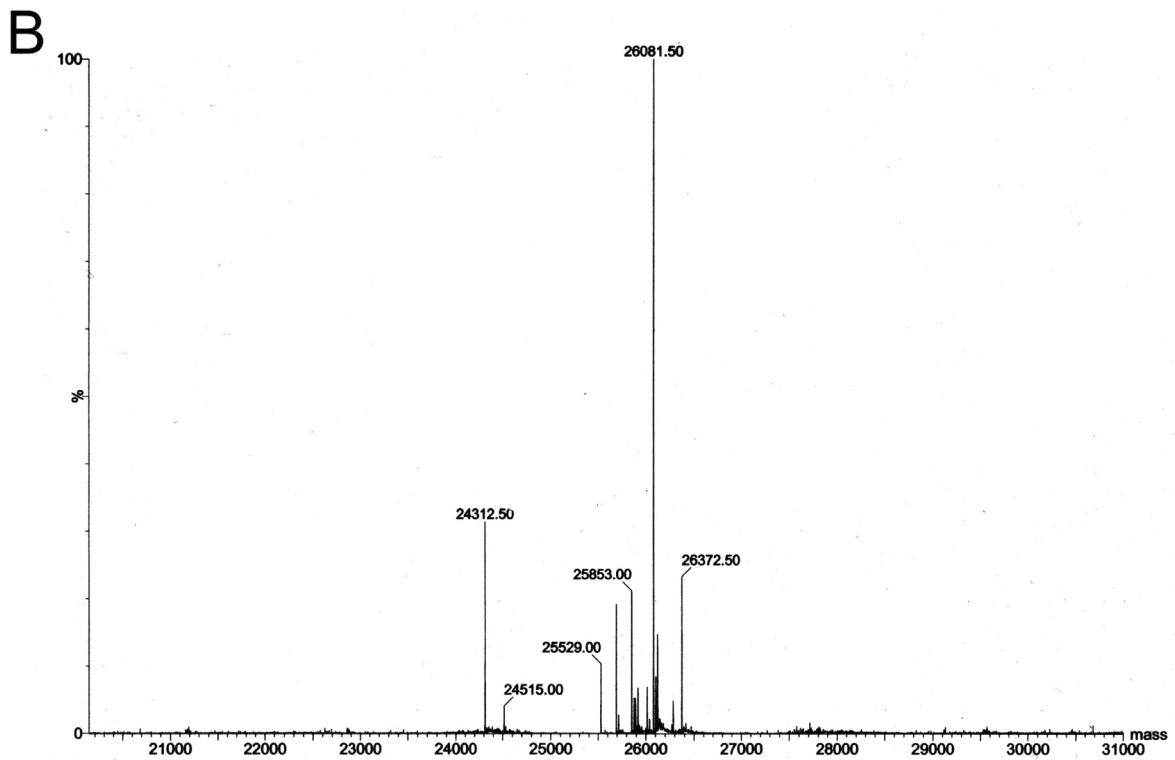
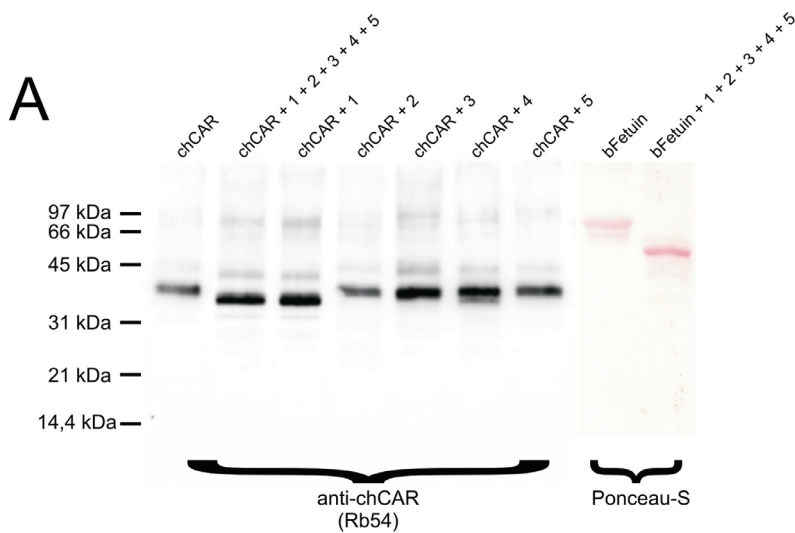


Abb. 4.20 nativer chCAR und chCAR_{ohne Fc} sind N-glycosyliert. **A** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse gegen chCAR sowie Ponceau-S-Färbung von bFetuin. Immunaffinitätsgereinigter chCAR und bFetuin wurden nach Denaturierung mit verschiedenen Deglycosidasen während 2 h bei 37 °C behandelt. Nur PNGaseF reduziert die apparente Masse vom chCAR. chCAR wandert in zwei Banden: eine bei etwa 45 kDa, die zweite (hier dominierende Bande), bei der es sich vermutlich um ein Abbauprodukt handelt bei etwa 37 kDa. Je Spur sind 0,15 µg geladen. 1 = PNGaseF; 2 = β-N-Acetylglucosaminidase; 3 = O-Glycosidase; 4 = α-2(3,6,8,9)-Neuraminidase; 5 = β-1,4-Galactosidase Als Kontrolle diente das Glycoprotein bFetuin, dessen apparente Masse aufgrund der Reaktionen von PNGaseF, O-Glycosidase und α-2(3,6,8,9)-Neuraminidase von etwa 66 kDa auf etwa 52 kDa reduziert wird. **B** Molekulare Masse von chCAR_{ohne Fc} bestimmt durch ESI-MS (in Zusammenarbeit mit Albrecht Otto). Die bestimmte Masse liegt in den Hauptfraktio-

Ergebnisse

nen bei 26081,5 und 26372,5. Die theoretische ist: 24321,5. Der Unterschied beläuft sich auf rund 2 kDa, welche durch N-Glycosylierung hinzukommen.

4.2.1.7 mCAR D1 122 bindet mCAR D2

Wenn das extrazelluläre Segment vom CAR selbstassoziiierend ist, dann muss die Frage gestellt werden, welche Domäne die CAR-Bindungsstelle enthält.

Von mCAR D1 wurden hier zwei verschiedene Konstrukte angefertigt: mCAR D1 122 und mCAR D1 213, wobei mCAR D1 213 um vier AS länger ist, die laut SwissProt-Datenbank schon zu mCAR D2 gehören (4.1.1.2). Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da es in der Literatur widersprüchliche Daten über das hydrodynamische Verhalten von hCAR D1 gibt. Van Raaij et al. (2000) benutzen ein Konstrukt, das mit mCAR D1 122 nahezu identisch ist und beobachten bei Sedimentationsgleichgewicht-Analysen ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht (K_d (16 \pm 7) μ M) allerdings in einem Konzentrationsbereich von 0,2-1 mg/mL. Jiang et al. (2004) hingegen verwenden ein hCAR D1-Konstrukt, das analog zu mCAR D1 213 um vier AS länger ist, und messen in NMR-Analysen, dass es sich dabei ausschließlich um ein Dimer handelt. Erst bei pH 3,0 liegt das Molekül als Monomer vor, was Sedimentationsgeschwindigkeit-Analysen ergaben (in einer Konzentration von 0,62 mg/mL). Genau der gleiche Widerspruch kann auch hier in dieser Arbeit reproduziert werden. Denn konzentrationsabhängige Sedimentationsgleichgewicht-Analysen zeigen, dass mCAR D1 122 in einem Konzentrationsbereich bis zu 1,4 mg/mL in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt (Abb. 4.21 B) und mCAR D1 213 hingegen bis zu einer Konzentration von 0,5 mg/mL als stabiles Dimer vorliegt (Abb. 4.21 C). Die vier zusätzlichen AS von mCAR D1 213 bewirken also eine Stabilisierung der Selbstassoziation. Beide Konstrukte mCAR D1 122 und mCAR D1 213 müssen wenigstens insofern korrekt gefaltet sein, als dass sie beide Ad2 Fiber Knob mit etwa gleicher Affinität binden können (Abb. 4.21 D und E), wobei hier deutlich wird, dass ein Fiber-Knob-Trimer (Abb. 4.21 A) mehr als zwei mCAR D1 122 oder mCAR D1 213 binden kann. Bei der Form der Darstellung ist darauf zu achten, dass Selbstassoziationen generell bezogen auf einen Anstieg der durchschnittlichen molekularen Masse abgebildet werden (Abb. 4.21 A). Fremdassoziationen hingegen werden z. B. bezogen auf das Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem mCAR D1 122 dargestellt (Abb. 4.21 D).

Erstaunlicherweise kann mCAR D1 122 (mCAR D1 122 konstant vorgelegt in einer Konzentration von 37,8 μ g/mL, bei der es überwiegend im monomeren Zustand ist) an

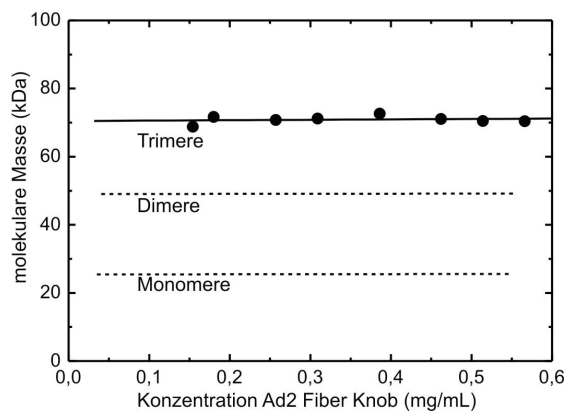
Ergebnisse

mCAR D2 binden und das mit einer Affinität von 5,2 μM (Abb. 4.21 F), die um zwei Größenordnungen höher ist, als diejenige der Selbstassoziation von mCAR D1 122. Dieser Wert entspricht der Affinität der Selbstassoziation von chCAR-Fc oder mCAR_{ohne Fc}. Außerdem sind die erforderlichen Konzentrationen, um eine Wechselwirkung messen zu können (bei etwa 40 $\mu\text{g/mL}$ mCAR D1 122 und 130 $\mu\text{g/mL}$ mCAR D2 sind etwa 70 % von mCAR D1 122 gebunden) erheblich geringer als es bei der mCAR D1 122-Selbstassoziation der Fall ist (bei etwa 1,3 mg/mL mCAR D1 122 sind nur 50 % der Moleküle gebunden).

Ersetzt man mCAR D1 122 durch mCAR D1 213, so ist kein Molmassenzuwachs durch die Zugabe von mCAR D2 zu verzeichnen (Abb. 4.21 E). Das mCAR D1 213-Dimer bindet nicht an mCAR D2, was entweder bedeutet, dass mCAR D1 213 ein stabiles Dimer bleibt und einfach nicht an mCAR D2 bindet oder es doch eine Bindung gibt, die allerdings zu einer Auflösung des mCAR D1 213-Dimers führt, weil nur das Monomer an mCAR D2 binden kann. In beiden Fällen ist die Schlussfolgerung, dass es keine Bindung zwischen einem D1-Dimer und D2 gibt, was bedeutet, dass eine D1-Selbstassoziation eine D1-D2-Wechselwirkung ausschließt.

Die Antwort auf die eingangs gestellte Frage, muss also lauten: Sowohl D1 als auch D2 enthalten jeweils eine Bindungsstelle für D1.

A



Ergebnisse

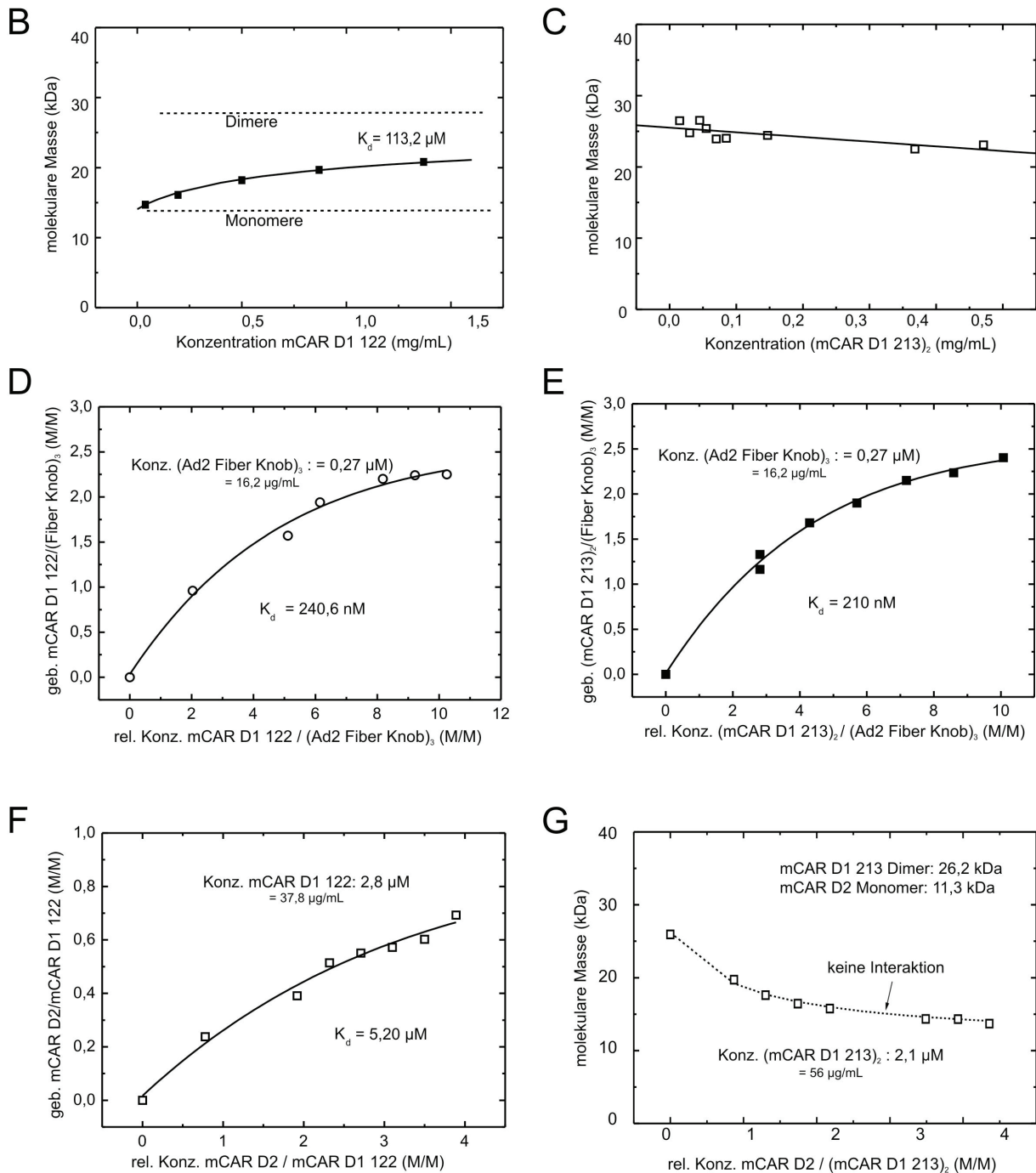


Abb. 4.21 mCAR D1 122 bindet an mCAR D2. Bindungskurven von Sedimentationsgleichgewicht-Analysen (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke). **A** Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung von Ad2 Fiber Knob zeigt, dass es um ein stabiles Trimer handelt. **B** Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung von mCAR D1 122 zeigt, dass es sich um Monomer-Dimer-Gleichgewicht handelt. **C** Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung von mCAR D1 213 zeigt, dass es sich um stabiles Dimer handelt. **D** mCAR D1 122 bindet das Fiber-Knob-Trimer (Ad2). Ein Trimer kann mehr als zwei mCAR D1 122 binden. Fiber Knob wurde in einer Konzentration von $0,27 \mu\text{M}$ vorgelegt und mCAR D1 122 in steigenden Mengen hinzugegeben. **E** mCAR D1 213 bindet das Fiber-Knob-Trimer (Ad2). Ein Trimer kann mehr als zwei mCAR D1 213 binden. Fiber Knob wurde in einer Konzentration von $0,27 \mu\text{M}$ vorgelegt und mCAR D1 213 in steigenden Mengen hinzugegeben. **F** mCAR D1 122 bindet an mCAR D2. Die Affinität übersteigt die Affinität der mCAR D1 122

Ergebnisse

Selbstassoziation um zwei Größenordnungen. mCAR D1 122 wurde in einer Konzentration von 2,8 μM (bei der es überwiegend als Monomer vorliegt) vorgelegt und mCAR D2 in steigenden Mengen hinzugegeben. Das mCAR D1 213-Dimer bindet nicht an mCAR D2. Die Molmasse steigt durch Zugabe von mCAR D2 nicht an, so dass es keine Trimerisierung oder noch größere Aggregationen gibt. Die Molmasse fällt, da mCAR D2 eine deutlich geringere Masse als das mCAR D1 213-Dimer hat. mCAR D1 213 wurde einer Konzentration von 2,1 μM vorgelegt und mCAR D2 in steigenden Mengen hinzugegeben.

Bindungsexperiment	K_d
chCAR-Fc / chCAR-Fc	$4,2 \times 10^{-6}$
Fc / Fc	$6,9 \times 10^{-6}$
mCAR _{extra} / mCAR _{extra}	keine Sa.
mCAR _{ohne Fc} / mCAR _{ohne Fc}	$3,89 \times 10^{-6}$
chCAR _{ohne Fc} / chCAR _{ohne Fc}	$20,5 \times 10^{-6}$
chCAR _{ohne Fc degl} / chCAR _{ohne Fc degl}	keine Sa.
mCAR D1 122 / mCAR D1 122	$113,2 \times 10^{-6}$
mCAR D1 213 / mCAR D1 213	st. Dimer
mCAR D2 / mCAR D2	keine Sa.
mCAR D1 122 / mCAR D2	$5,2 \times 10^{-6}$
mCAR D1 213 / mCAR D2	keine Bndg.

Tab. 4.1 Zusammenfassung der Dissoziationskonstanten [M] aus Sedimentationsgleichgewicht-Analysen die homophile Aktivität der extrazellulären Domänen vom CAR betreffend. Sa.= Selbstassoziation; st. Dimer = stabiles Dimer; Bndg.= Bindung

4.2.1.8 Unterschiedliches Laufverhalten von mCAR_{extra} und chCAR_{ohne Fc} bei der Gelfiltration

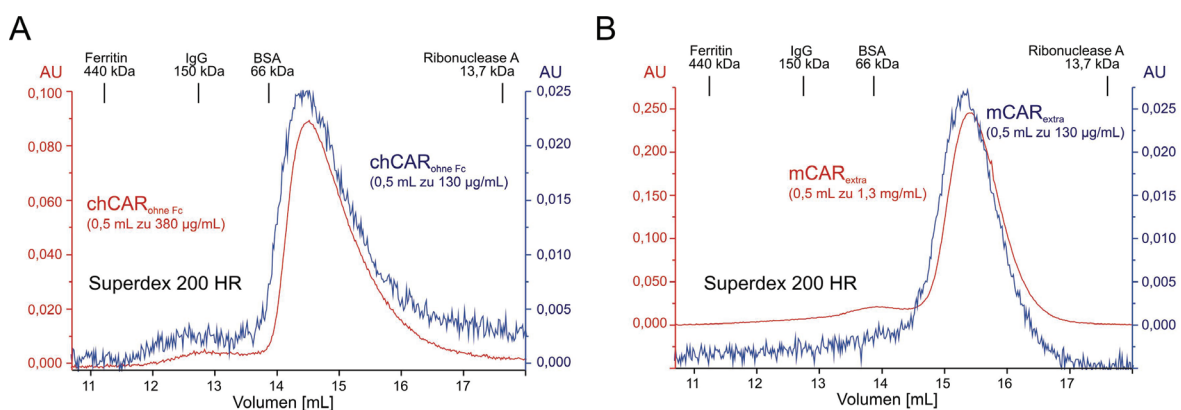
Auch mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie konnten Unterschiede zwischen mCAR_{extra} und chCAR_{ohne Fc} festgestellt werden. chCAR_{ohne Fc} eluiert nach 14,5 mL (Abb. 4.22 C rote Linie und A), wobei es bei 15,3 mL nochmal ein zweites Absorptionsmaximum zu geben scheint. mCAR_{extra} eluiert nach 15,4mL (Abb. 4.22 C blaue Linie). Vergleicht man die Differenz der Elutionsvolumina von mCAR_{extra} sowie chCAR_{ohne Fc} und errechnet anhand von Kalibrierungsproteinen (Abb. 3.1) die daraus resultierende apparente Masse, so ergibt sich eine Differenz von ca. 25 kDa. Dieser Wert entspricht genau der theoretischen sich aus der Sequenz ergebenden Molmasse von chCAR_{ohne Fc}. Daraus kann gefolgert werden, dass chCAR_{ohne Fc} in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht auftritt, wobei der überwiegende Teil als Dimer vorliegt, wenn man Faltungsfragen (wie z.B. Stäbchen oder globulär) außer acht lässt. Demnach repräsentiert die Schulter bei 15,3 mL das Monomer. Ob allerdings die Glyco-

Ergebnisse

sylierung von $\text{chCAR}_{\text{ohne Fc}}$ allein (ohne dass ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt) eine Ursache des unterschiedlichen Laufverhaltens sein könnte, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist jedoch gering, da die zusätzliche durch Glycosylierung verursachte molekulare Masse von $\text{chCAR}_{\text{ohne Fc}}$ gegenüber $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ höchstens 2 kDa beträgt (Abb. 5.20 B; molekulare Masse von $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ gemäß AS-Sequenz: 24433,6 Da, gegenüber $\text{chCAR}_{\text{ohne Fc}}$: maximal 26372,5 Da).

Wird eine hohe Konzentration $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ (wie in Abb. 4.22 B rote Linie) geladen, dann sieht man zusätzlich ein Absorptionsmaximum bei 14 mL. Werden die unterschiedlichen Elutionsvolumina wiederum mit der Eichung der Säule verglichen, so ist festzustellen, dass die apparente Masse mit einem Absorptionsmaximum nach 14 mL genau doppelt so hoch ist wie diejenige nach 15,4 mL. Daraus kann ebenfalls geschlossen werden, dass es sich auch hierbei um ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht handelt, welches bei den hier eingesetzten Konzentrationen auf Seiten des Monomers liegt. Der Stockesche Radius des $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ -Dimers scheint größer zu sein als derjenige des $\text{chCAR}_{\text{ohne Fc}}$ -Dimers.

Auch das Laufverhalten von chCAR-Fc ist abhängig von der eingesetzten Konzentration. Bei beiden hier eingesetzten Konzentrationen ist ein verdecktes Maximum bei etwa 1,58 mL zu sehen, was dem Monomer entsprechen könnte. Das Hauptmaximum des Laufes von chCAR-Fc (zu 120 $\mu\text{g/mL}$) repräsentiert demnach ein Dimer (Abb. 4.22 D, blaue Linie). Bei höheren Konzentrationen scheint es eine Verschiebung zu noch höheren Komplexen zu geben (Abb. 4.22 D, rote Linie). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass chCAR-Fc aufgrund des Fc-Anteils und zusätzlich dazu auch aufgrund seines CAR-Anteils Oligomere bildet.



Ergebnisse

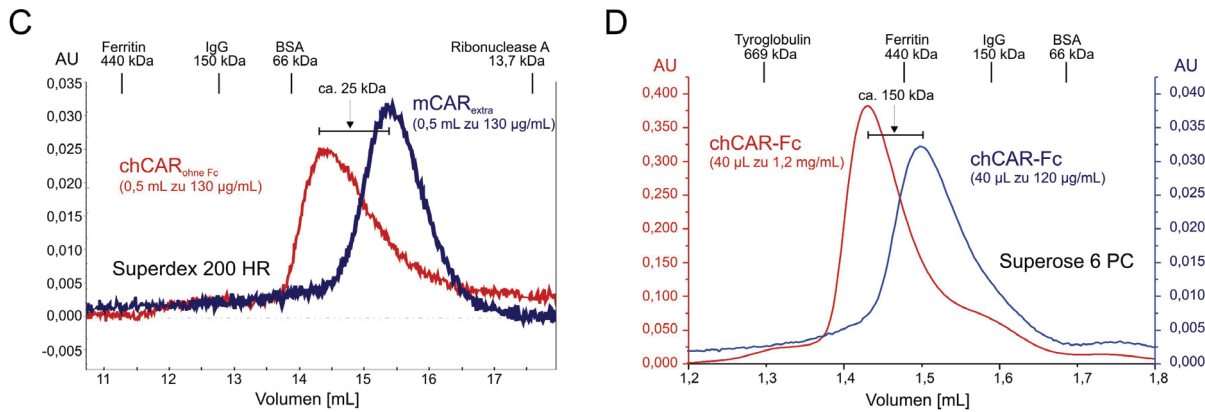


Abb. 4.22 Unterschiedliches Laufverhalten der extrazellulären Domänen vom CAR. **A** Elutionsvolumina von verschiedenen Konzentrationen chCAR_{ohne Fc}. In beiden Läufen ist das Elutionsvolumen nahezu unverändert. Das zusätzliche Absorptionsmaximum nach 13 mL entspricht nicht chCAR_{ohne Fc}, sondern vermutlich einem kontaminierenden Protein (siehe SDS-PAGE dazu, Abb. 4.8 F Fraktionen 13 und 14). Gelfiltrationssäule war Superdex 200 HR 10/30. **B** Das Elutionsvolumen der dominierenden Fraktion von mCAR_{extra} verschiebt sich nicht, wenn die aufgetragene Menge um 90 % reduziert wird. Wenn 0,5 mL zu 1,3 mg/mL injiziert werden, dann entsteht zusätzlich ein geringes Absorptionsmaximum nach 14 mL. Gelfiltrationssäule war Superdex 200 HR 10/30. **C** Elutionsprofile von chCAR_{ohne Fc} (rot) und mCAR_{extra} (blau). Von beiden Proteinen wurden in zwei von einander unabhängigen FPLC-Läufen je 500 µL (130 µg/mL) auf die Gelfiltrationssäule Superdex 200 HR geladen. Beide Proteine eluieren bei unterschiedlichen Elutionsvolumina. Der Abstand beider Absorptionsmaxima entspricht nach Kalibrierung der Säule durch Eichungsproteine in etwa 25 kDa. **D** Elutionsprofile von chCAR-Fc eingesetzt in verschiedenen Konzentrationen. Wird die aufgetragene Menge um 90 % reduziert, so verschiebt sich das Elutionsvolumen von 1,42 auf 1,5 mL. Gelfiltrationssäule war Superose 6 PC 3.2/30 Der Laufpuffer war in allen Fällen PBS. Läufe fanden bei 4 °C statt.

4.2.1.9 Röntgen-Kristallstruktur: mCAR_{extra} ist ein Dimer

Bakteriell hergestelltes und gereinigtes mCAR_{extra} (4.1.1.1) wurde von Klaas Max (AG Kristallographie, MDC, Berlin) einem Kristallisationsprozess unterzogen. Mittels Röntgenbestrahlung konnte die molekulare Struktur bestimmt werden (Abb. 4.23). Da diese Daten ausschließlich das Ergebnis einer Kooperation sind, seien hier nur einige Eckpunkte präsentiert.

mCAR_{extra} liegt als Dimer vor und dimerisiert über die D1-Domäne (mit einer Affinität von etwa 3,8 mM), dessen Struktur sich mit derjenigen von van Raaij et al. (Structure, 2000) deckt. D1 und D2 liegen als zwei globuläre Domänen vor, die durch einen beweglichen Linker miteinander verbunden sind. Das D1-D1 Interface ist komplementär, d.h. genau zwischen den Monomeren verläuft eine Symmetrieachse. Eine Interaktion zwischen D1 und D2 ist nicht zu sehen. Ob dieses Dimer auf zellulärer Ebene in cis- oder trans-Form vorläge, kann nicht

Ergebnisse

genau bestimmt werden. Van Raaij et al. behaupten das D1-Dimer beschreibe das Modell eines trans-Dimers zwischen zwei Zellen.

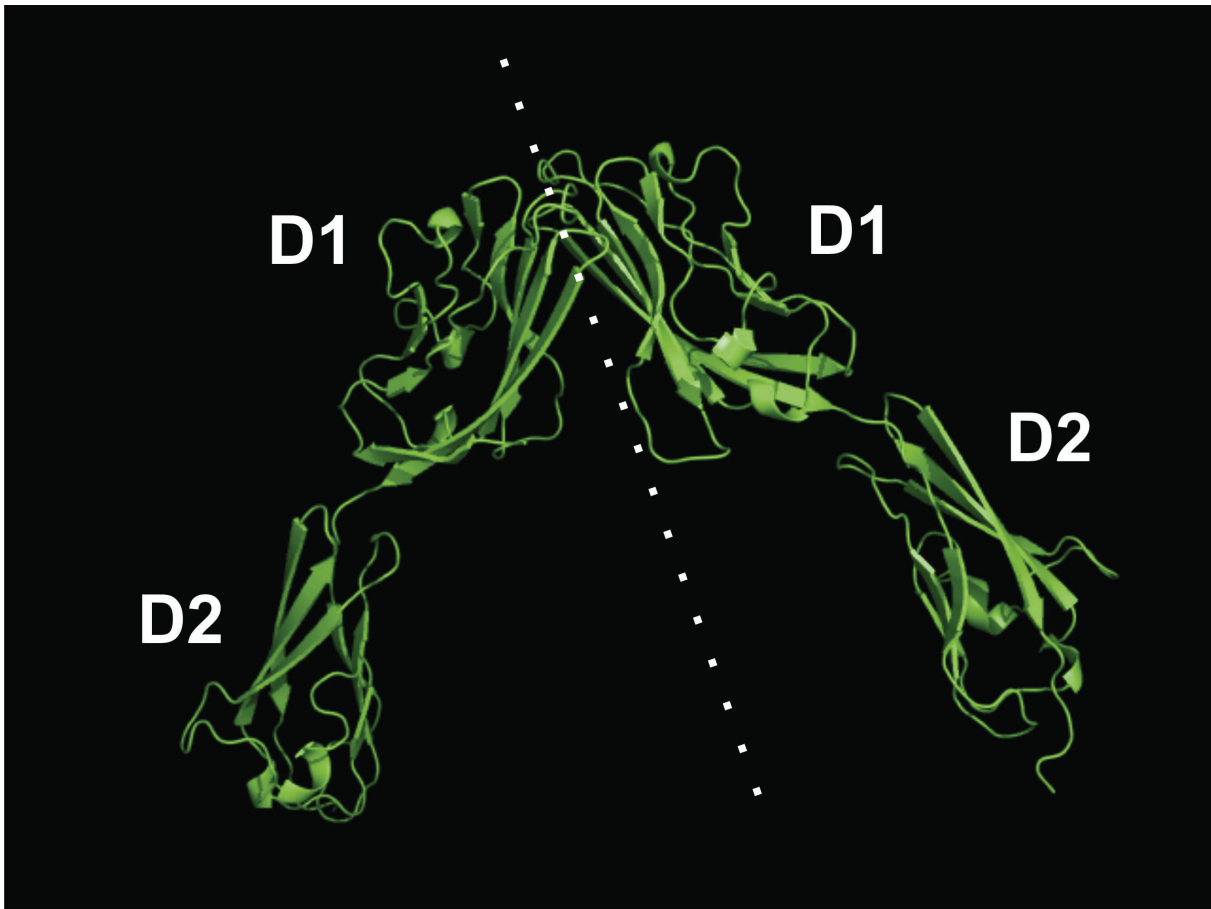


Abb. 4.23 Schematische Darstellung der Röntgen-Kristallstruktur von $mCAR_{extra}$ (in Zusammenarbeit mit Klaas Max). Pfeile stellen β -Faltblätter und Spiralen α -Helices dar. Die Orientierung des Proteins ist so gewählt, dass der N-Terminus oben und der C-Terminus (mit dem theoretisch folgenden Transmembranbereich im nativen CAR) am unteren Bildrand ist. $mCAR_{extra}$ bildet ein über eine D1-D1 Interaktion vermitteltes Dimer. D1 und D2 sind jeweils globuläre Domänen, die durch einen kurzen aber flexiblen Linker (Leucin₁₃₈-Valin₁₃₉) miteinander verbunden sind. Die Symmetrieachse ist gepunktet dargestellt.

4.2.1.10 Chemische Vernetzung vom neuronalen chCAR mit sich selbst

Um die Frage zu klären, über welche Reaktionspartner CAR im embryonalen ZNS verfügt, ist eine chemische Vernetzung des Gewebes vorgenommen worden. Trotzdem ist dabei auf folgende Einschränkung zu achten: nur funktionelle Gruppen im entsprechenden

Ergebnisse

Abstand können miteinander verbunden werden. Als chemischer Vernetzer diente DSP, ein homobifunktioneller NHS-Ester (kovalente Amidbindungen mit primären Aminen ausbildend) mit einer Länge von 12 Å, welcher Thiol-spaltbar ist. In einem auf das intakte Retinagewebe (Retina und Glaskörper von E8 Hühnchen wurden als Einheit belassen) beschränkten analytischen Maßstab ergaben WB-Untersuchungen, dass DSP gegenüber unvernetzter Retinae eine Intensitätsabnahme der chCAR-Banden bei 45 kDa und darunter wandernden Abbaukomponenten bewirkt. Gleichzeitig entstehen Produkte mit apparenten molekularen Massen von 75 kDa und mehr, was in etwa der Masse eines chCAR-Dimers und noch größeren Aggregaten entspricht (bezogen auf die dominierende 37-kDa-Komponente) (Abb. 4.24 A und B). Durch einen weiteren mit embryonalen Gehirnhomogenat (von E14/15 Hühnchen) durchgeführten Versuch ließ sich dieses Resultat auf das gesamte embryonale Gehirn ausweiten.

Ob es sich bei den durch chemische Vernetzung entstandenen Produkten tatsächlich um CAR-Oligomere handelt, sollte ein im präparativen Maßstab durchgeführtes Experiment zeigen. In einem Großansatz wurden 43g Gehirnhomogenat von E14/15 Hühnchen mit 0,5 mM DSP versetzt, um anschließend gezielt chCAR mittels Affinitätschromatographie daraus zu isolieren (Abb. 4.24 C und D). Dieses Affinitätsisolat wurde durch SDS-PAGE nach zwei Dimensionen getrennt (Abb. 4.24 G): die 1.Dimension unter nicht-reduzierenden Bedingungen (unter denen der chemische Vernetzer intakt bleibt) und die 2.Dimension unter reduzierenden Bedingungen (die Thiol-Bindung des Vernetzers wird gespalten). Der größte Teil chCAR befindet sich unter den gewählten Bedingungen im nicht-vernetzten Zustand (mit Sternchen markiert). Trotzdem wird deutlich, dass ein weiterer Teil chCAR homophil vernetzt ist (durch Pfeile markiert). Als Vergleich dient ein Parallel-Ansatz ohne vorherige Zugabe eines chemischen Vernetzers (Abb. 4.24 H).

Subtrahiert man beide Gele voneinander, zu ist der Schluss erlaubt, dass vermutlich ein Teil vom chCAR im Gewebe als homophil gebunden vorliegt.

Es muss aber auch darauf hingewiesen werden, dass nativer chCAR auch ohne Zusatz von chemischen Vernetzern durch Ankonzentrierung mittels Ultrafiltration SDS-resistente Dimere bildet (Abb. 4.24 E und F).

Ergebnisse

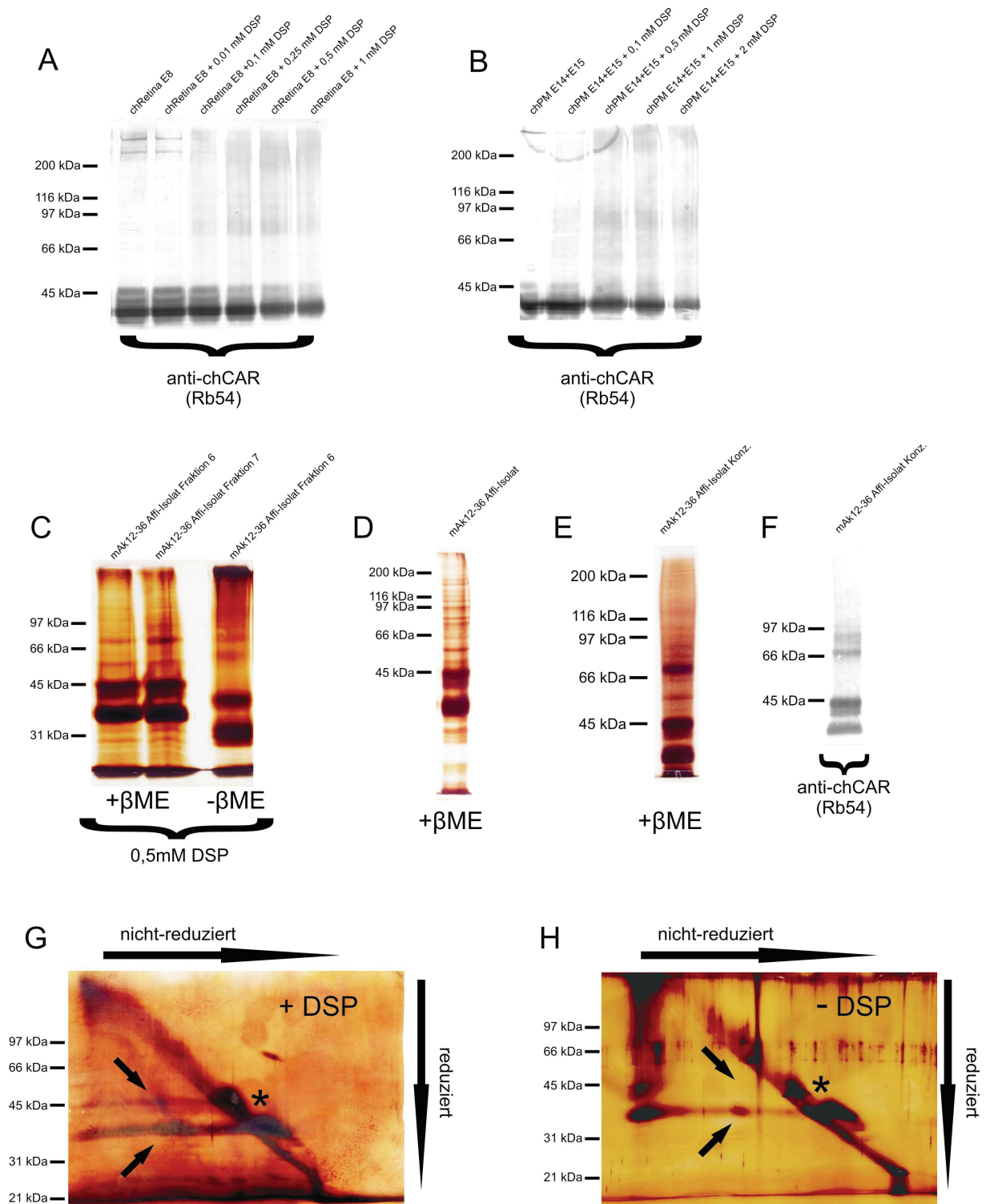


Abb. 4.24 chCAR liegt im embryonalen ZNS zum Teil als Dimer vor. **A** 7,5 % SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse mit anti-chCAR-Antikörper von 6 Retinae aus Hühnchen-Embryonen (E8) behandelt mit verschiedenen Mengen an DSP während 2 h bei 4 °C in PBS pH 8. Auf Höhe des 45-kDa-Markers läuft chCAR, und darunter laufen Abbaukomponenten (durch ESI-MS

Ergebnisse

identifiziert, hier nicht gezeigt). Eine steigende Konzentration an DSP schwächt die Intensität der CAR-Banden (45-37kDa) und fördert gleichzeitig die Intensität von Banden bei 75 kDa und höher. Geladen sind je Spur 60 µg Gewebelysate. **B** 7,5 % SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse mit anti-chCAR-Antikörper von Plasmamembran-Präparationen aus Gehirnen von E14/15 Hühnchen ebenfalls mit verschiedenen Mengen an DSP während 2 h bei 4 °C in PBS pH 8 behandelt. Auch hier werden die Monomer-Banden schwächer und Banden bei 75 kDa und höher werden intensiver. Geladen sind je Spur 40 µg. **C** 10 % SDS-PAGE vom chCAR Affinitätsisolat mittels mAk12-36-Affigel von 43 g gepackter Plasmamembranen aus Gehirnen von E14/15 Hühnchen mit 0,5 mM DSP während 2 h bei 4 °C in PBS pH 8 inkubiert. Geladen sind je Spur 15 µL Affinitätsisolat. **D** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von nicht-vernetztem affinitätsisoliertem chCAR. 30 µL geladen. **E** 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von nicht-vernetztem affinitätsisoliertem aber durch Ultrafiltration ankonzentriertem chCAR. Die Bande bei 75kDa ist intensiver als in D. chCAR bildet SDS-resistente Dimere. Es wurden 1,5 µL des Konzentrates geladen. **F** 7,5 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse gegen chCAR von ankonzentriertem affinitätsisoliertem chCAR. Die Banden bei 75 kDa sind chCAR. 0,5 µL des Konzentrates wurden auf die Spur geladen. **G** Von chemisch-vernetztem chCAR (30 µL von Fr 6 geladen) wurde eine 10 % SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen (1.Dimension) durchgeführt, die komplette Spur ausgeschnitten, 30 min bei 37 °C in Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol und zusätzlich 25 mM DTT zum Spalten der DSP-Verbindungen inkubiert und anschließend erneut einer 10 % SDS-PAGE (2.Dimension) unterzogen. Wenn Proteine unter reduzierenden und unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein unterschiedliches Wanderungsverhalten zeigen, dann befinden sie sich außerhalb der Diagonalen. Mit Sternchen ist unvernetzter chCAR markiert. Die Pfeile zeigen an, wo sich chCAR unter nicht-reduzierenden Bedingungen homophil vernetzen ließ und unter reduzierenden Bedingungen (2.Dimesion) als Monomer läuft. **H** Nicht-vernetzter affinitätsisolierter chCAR, ansonsten identisch zu G behandelt. Deutlich weniger Dimere in der 1.Dimension. Ebenfalls 30 µL aus einer Parallel-Affinitätsisolation vom chCAR aus unvernetztem Gehirnhomogenat.

4.2.2 Heterophile Interaktionen der extrazellulären Domänen vom CAR

Eine völlig neue Konzeption der Funktion vom CAR, ist dessen mögliche Interaktion mit ECM-Glycoproteinen. Wie bereits unter Punkt 2.7 erwähnt, lassen einige experimentelle Resultate den Schluss zu, dass die extrazellulären Domänen vom CAR nicht nur durch homophile, sondern auch durch heterophile Assoziationen adhäsiv wirken können und dadurch im sich entwickelnden Nervensystem Neuriten- oder axonales Wachstum regulieren bzw. im PNS die Fertigstellung der neuromuskulären Synapse beeinflussen. Bevor auf molekularer Ebene untersucht wird, ob es direkte Bindungen zwischen CAR und ECM-Glycoproteinen gibt, soll hier kurz ein zusätzliches biologisches Indiz für die heterophile Adhäsivität vom CAR präsentiert werden.

4.2.2.1 chCAR-Fc blockiert die Adhäsion von HeLa Zellen an Fibulin-1 und FN

Die Tatsache, dass CAR-positive HeLa Zellen auf den ECM-Glycoproteinen Fibulin-1 und FN adhären können, und dieser Prozess nicht nur durch anti-CAR-Antikörper, sondern auch durch chCAR-Fc in Lösung gestört werden kann, ist ein weiterer Hinweis dafür, dass CAR möglicherweise heterophil fungiert (Abb. 4.25 C-F).

Aber auch der entgegengesetzte Weg ist möglich: HeLa Zellen können wie bereits erwähnt an chCAR-Fc adhären, was wiederum durch Fibulin-1 in Lösung gestört werden kann (Abb. 4.25 A und B).

Für den HeLa Adhäsionsversuch erfolgte die Beschichtung der Kulturschalen mit unterschiedlichen Konzentrationen von chCAR-Fc, Fibulin-1 oder FN in einem Tropfen von 2 μ L (analog zu Abb. 4.17 A). Dabei zeigte sich, dass die Zellen in Abhängigkeit der zur Beschichtung eingesetzten Konzentration nach 3 h bevorzugt an chCAR-Fc, Fibulin-1 oder FN adhären. Die Adhäsion an chCAR-Fc kann durch die Zugabe von Fibulin-1 oder anti-chCAR-Antikörper (mAk12-36) in Lösung inhibiert werden, was dafür spricht, dass Fibulin-1 entweder auf der Oberfläche der Zellen die Bindungsstellen für chCAR-Fc blockiert oder selbst an das auf dem Boden der Kulturschale befindliche chCAR-Fc bindet und auf diese Weise die Bindungsstellen absättigt. mAk12-36 bindet nur am chCAR und nicht an die HeLa-Zellen (laut Immunfluoreszenzfärbung; hier nicht abgebildet) und blockiert damit die Bindungsstelle von chCAR-Fc (Abb. 4.25 A und B). Für den Effekt des mAk12-36, dessen Epitop Teil der D1-Domäne ist (Abb. 4.34 C), gibt es zwei Erklärungen: Entweder blockiert die Bindung des mAk12-36 an die D1-Domäne des chCAR-Fc aufgrund von sterischen Gründen die Adhäsion der HeLa Zellen (möglicherweise durch zellulären CAR) oder die Bindungsstelle ist Teil der D1-Domäne von chCAR-Fc, was für eine D1-D1-Interaktion sprechen könnte. Die Adhäsion an Fibulin-1 oder FN kann ebenfalls durch die Zugabe von chCAR-Fc in Lösung (Abb. 4.25 C und D) inhibiert werden. Auch hier sind mehrere Interpretationen zulässig: chCAR-Fc bindet an die Fibulin-1- bzw. FN-Beschichtung oder an die HeLa Zellen. Unabhängig davon welche Interpretation zutrifft, ist doch die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Adhäsion der HeLa Zellen an Fibulin-1 bzw. FN CAR-abhängig ist, denn entweder bindet lösliches chCAR-Fc an Fibulin-1 bzw. FN oder es bindet an zelluläres CAR und verhindert somit das Attachement an Fibulin-1 bzw. FN. Trotzdem könnten auch nicht-identifizierte zelluläre Rezeptoren die Ursache für eine verminderte Adhäsion sein.

Ergebnisse

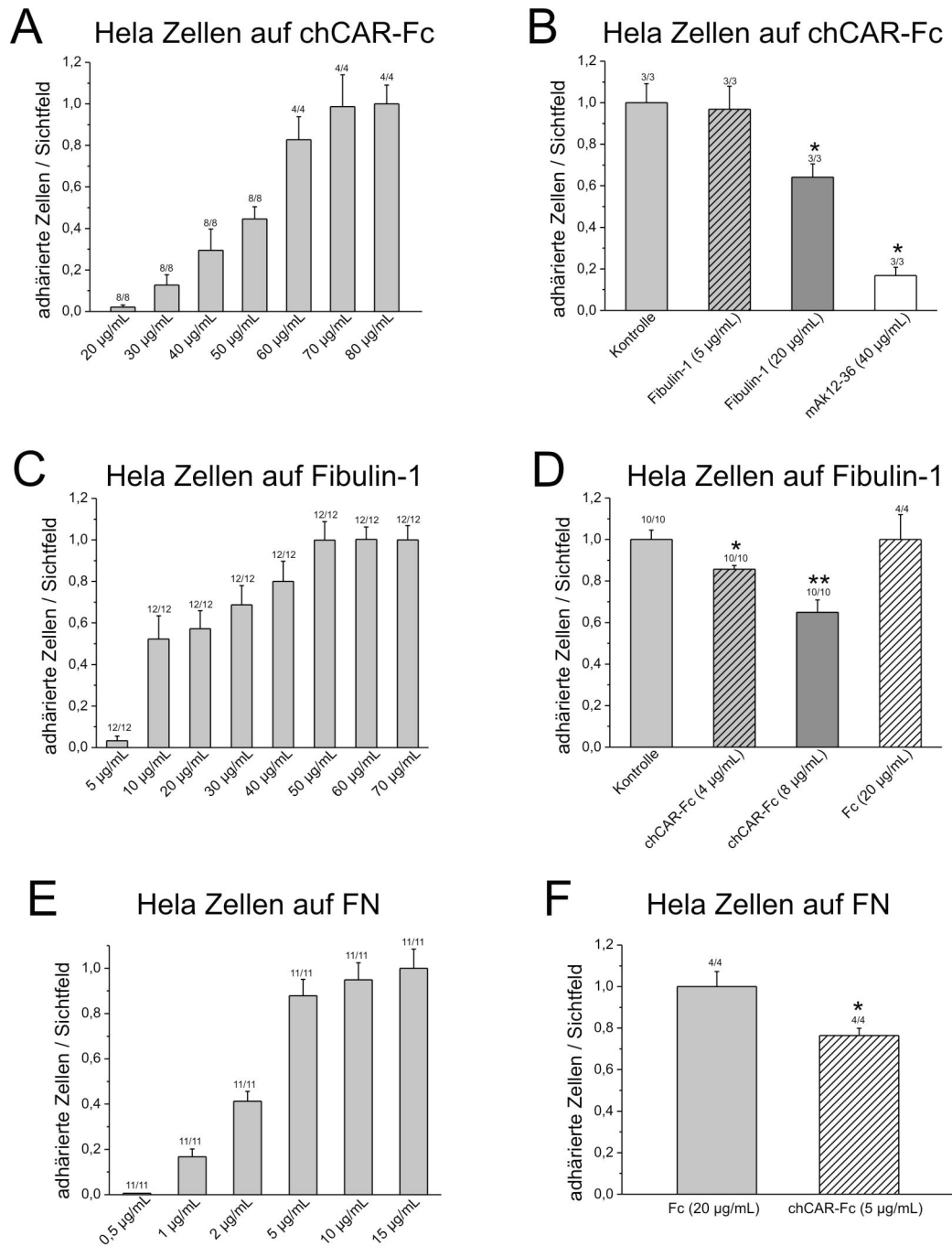


Abb. 4.25 chCAR-Fc inhibiert HeLa Adhäsion auf FN und Fibulin-1 bzw. HeLa Adhäsion auf chCAR-Fc kann durch Fibulin-1 inhibiert werden. **A** HeLa Zellen adhärerem auf chCAR-Fc in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Eine Verbesserung der Adhäsion ist mit Zunahme der Konzentration zu sehen. Ab 70 µg/mL chCAR-Fc (in 2 µL) ist keine Verbesserung der Adhäsion mehr zu beobachten. **B** Anhaftung von HeLa Zellen auf chCAR-Fc (70 µg/mL) kann durch die Zugabe von Fibulin-1 inhibiert werden. Auch der ausschließlich an chCAR-Fc bindende anti-chCAR-Antikörper (mAk12-36) blockiert die Zelladhäsion. Zellzahlen beziehen sich auf Kontrolle. **C** HeLa Zellen binden an Fibulin-1 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Ab 50 µg/mL Fibulin-1 (in 2 µL) ist keine Verbesserung der Adhäsion mehr zu beobachten. **D** Adhäsion von HeLa Zellen auf Fibulin-1 (50 µg/mL) kann durch Zugabe von chCAR-Fc inhibiert werden. Fc allein hat keine inhibierende Wirkung. Zellzahlen beziehen sich auf Kontrolle. **E** Auch auf FN (10 µg/mL) kann die Adhäsion durch chCAR-Fc inhibiert werden. Zellzahl für chCAR-Fc bezieht sich auf Fc-Wert. Das optische Sichtfeld umfasste die gesamte

Ergebnisse

Fläche des zur Beschichtung eingesetzten Tropfens von 2 μL . Alle gemessenen Werte wurden auf den unbehandelten Kontroll-Wert oder Fc-Wert normalisiert. Bei konzentrationsabhängiger Adhäsion galt der Wert der höchsten Konzentration als Norm.

4.2.2.2 Die extrazellulären Domänen vom CAR binden an ECM-Glycoproteine wie FN, Laminin-1, Fibulin-1, Tenascin-R und Agrin

Nachdem anhand von biologischen Versuchen eine Reihe von Hinweisen gesammelt werden konnten, dass CAR auch in die heterophile Adhäsion involviert ist, sollte an dieser Stelle geprüft werden, ob eine direkte physikalische Interaktion vom CAR und ECM-Glycoproteinen als mögliche Erklärung dieser Versuche dient.

Das Fusionsprotein chCAR-Fc, welches das extrazelluläre Segment vom chCAR enthält (4.1.2.1), wurde auf seine molekulare Wechselwirkung mit ECM-Glycoproteinen mittels Sedimentationsgleichgewicht-Analysen hin untersucht. Als Kontrolle wurde Fc (aus humanem IgG1) verwendet.

Der erste Hinweis darauf, dass chCAR-Fc ein adäquates Modell für die Analyse vom CAR ist, ist die Tatsache, dass es an den Ad2 Fiber Knob binden kann (Abb. 4.26 A), der als das CAR-bindende Protein des Ad2 identifiziert wurde (Bergelson et al., 1997; Freimuth et al., 1999). Da der Fiber Knob ein Trimer ist, wurde auch die Möglichkeit geprüft, ob er mehr als ein chCAR-Fc binden kann. Auch diese Frage konnte positiv beantwortet werden, denn tatsächlich ist zu beobachten, dass die Bindungskurve den Wert von 1 entlang der Ordinaten übersteigt. Wenn man chCAR-Fc durch Fc ersetzt, fällt die Affinität der Bindung um drei Größenordnungen, was zeigt, dass chCAR-Fc ein Ligand für den Fiber Knob ist (4.26 A).

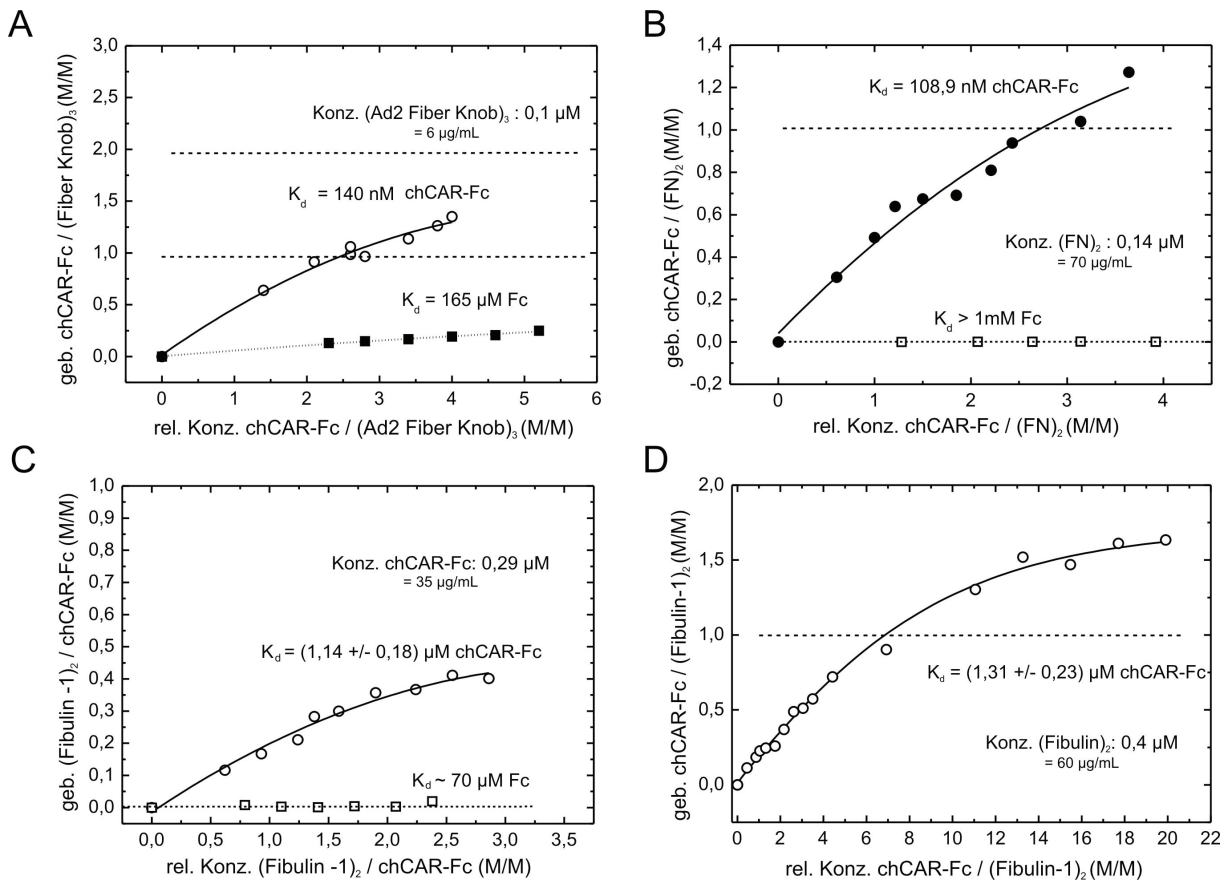
FN ist ein dimeres Protein (im Einzellauf ergab es eine apparente Masse von 493,3 kDa (hier nicht abgebildet); der theoretische Wert liegt bei etwa 500 kDa) und kann im gesättigten Zustand zwei Moleküle chCAR-Fc binden (Abb. 4.26, B). Die Affinität von chCAR-Fc zu FN ist mit 108,9 nM in der gleichen Größenordnung wie die Affinität von chCAR-Fc zum Fiber Knob. Fc bindet mindestens 10 000mal schwächer, so dass FN als neuer extrazellulärer Bindungspartner vom CAR betrachtet werden kann.

Fibulin-1 ist ebenfalls ein dimeres Protein und bindet auch im Sättigungsbereich mehr als ein chCAR-Fc (Abb. 4.26, D). Die Affinität von 1,14 (+/- 0,18) μM (Abb. 4.26, C) ist etwas schwächer als zu FN. Betrachtet man Fc, dann ergibt sich jedoch eine um etwa zwei Grö-

Ergebnisse

Benordnungen geringere Affinität, so dass auch Fibulin-1 als neuer extrazellulärer Interaktionspartner vom CAR betrachtet werden kann. Wie auch beim Fiber-Knob-Trimer und FN-Dimer schließt eine Bindung von Fibulin-1 an chCAR-Fc die Dimerisierung von Fibulin-1 nicht aus, was ein Hinweis dafür ist, dass die jeweiligen CAR-Bindungsstellen sich nicht mit den Selbstassoziationsstellen dieser dimeren ECM-Glycoproteine überlappen.

Auch Laminin-1, Tenascin-R und Agrin sind ECM-Glycoproteine, die mit ähnlicher Affinität wie FN an chCAR-Fc binden, wobei auch hier die Wechselwirkung zu Fc deutlich schwächer ist, so dass der extrazelluläre chCAR als Grund für diese Bindungen zu betrachten ist (Abb. 4.26 E-F). Die Möglichkeit der Oligomere Laminin-1 und Tenascin-R mehr als ein chCAR-Fc zu binden wurde nicht geprüft. Das an der Entstehung der neuromuskulären Synapse beteiligte Agrin (Bezakova und Ruegg, 2003) wurde hier in zwei verschiedenen Isoformen benutzt, die sich in nur wenigen Aminosäuren voneinander unterscheiden. Nur Agrin 748 ist in der Lage, die Aggregation der Ach-Rezeptor-Untereinheiten auf der Muskelseite zu induzieren (Bezakova und Ruegg, 2003). chCAR-Fc bindet an beide Isoformen mit gleicher Affinität (Abb. 4.26 G).



Ergebnisse

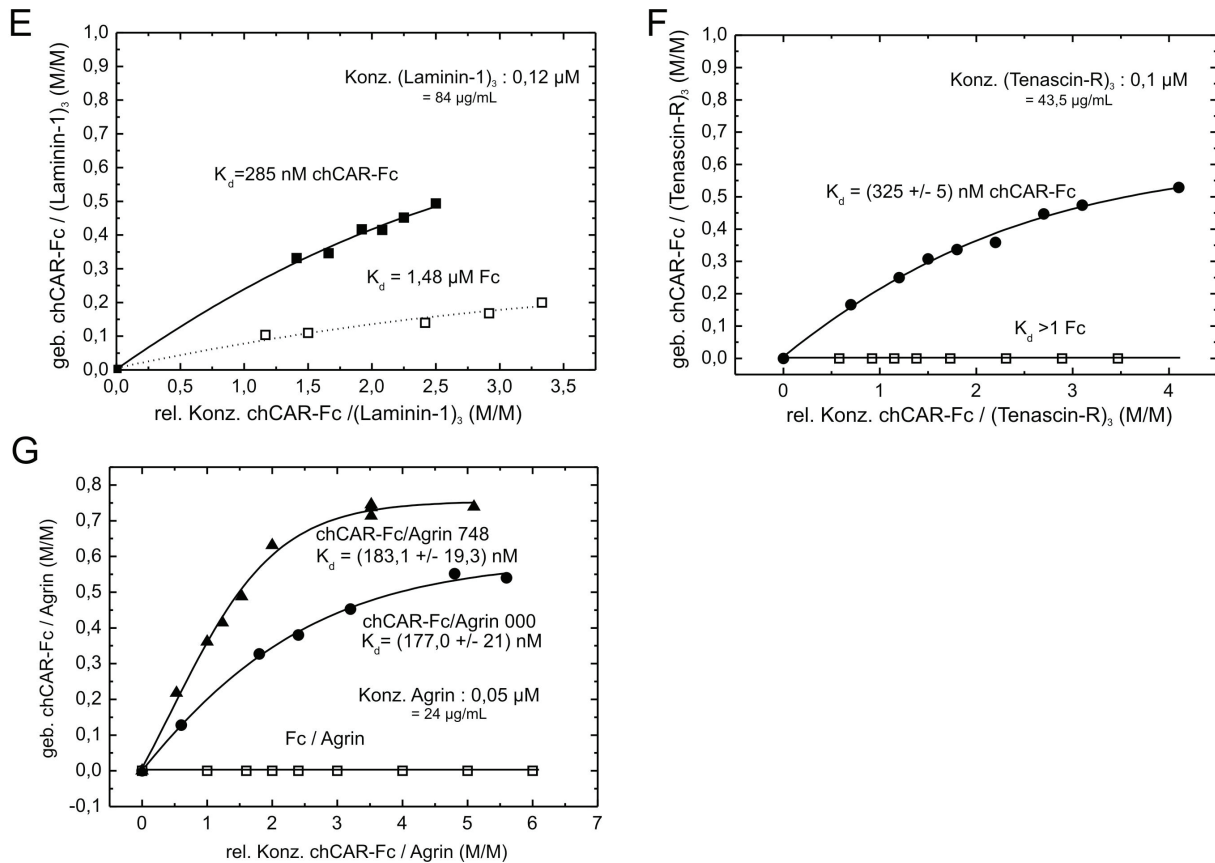


Abb. 4.26 chCAR-Fc bindet an ECM-Glycoproteine. Bindungskurven der Interaktionsstudien mittels Sedimentationsgleichgewicht-Analyse zwischen dem Fusionsprotein chCAR-Fc und diverser affinitätsgereinigter ECM-Glycoproteine. Als Kontrolle wurde chCAR-Fc durch Fc ersetzt, was in allen hier gezeigten Fällen die Dissoziationskonstanten erheblich ansteigen lässt, was zeigt, dass es sich um spezifische direkte Interaktionen des extrazellulären Domänen vom chCAR handelt (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke). **A** chCAR-Fc bindet das Fiber-Knob-Trimer, wobei bis zu einem vierfachen molaren Überschuss an chCAR-Fc ein Trimer mehr als ein chCAR-Fc aufnehmen kann. Ad2 Fiber Knob wurde in einer Konzentration von 0,1 μM vorgelegt und chCAR-Fc in steigenden Mengen hinzugegeben. **B** chCAR-Fc bindet das FN-Dimer. Bis zu einem etwa vierfachen molaren Überschuss an chCAR-Fc bindet ein FN-Dimer mehr als ein chCAR-Fc. FN wurde in einer Konzentration von 0,14 μM vorgelegt und chCAR-Fc in steigenden Mengen hinzugegeben. **C** chCAR-Fc bindet das Fibulin-1-Dimer. chCAR-Fc wurde in einer Konzentration von 0,29 μM vorgelegt und bFibulin-1 aus Serum in steigenden Mengen hinzugegeben. **D** Diesmal wurde Fibulin-1 in einer Konzentration von 0,4 μM vorgelegt und chCAR-Fc in steigenden Mengen hinzugegeben. Bis zu einem 20fachen molaren Überschuss bindet ein Fibulin-1-Dimer mehr als ein chCAR-Fc. **E** chCAR-Fc bindet das Laminin-1-Trimer (bestehend aus α -, β - und γ -Untereinheit). Auch Fc bindet an Laminin-1, aber deutlich schwächer. mLaminin-1 wurde in einer Konzentration von 0,12 μM vorgelegt und chCAR-Fc in steigenden Mengen hinzugegeben. **F** chCAR-Fc bindet das Tenascin-R-Trimer. Affinitätsgereinigtes chTenascin-R wurde in einer Konzentration von 0,1 μM vorgelegt und chCAR-Fc in steigenden Mengen hinzugegeben. **G** chCAR-Fc bindet Agrin 748 und Agrin 000. Sowohl rekombinantes chAgrin 748 als auch rekombinantes chAgrin 000 wurden in einer Konzentration von 0,05 μM vorgelegt und chCAR-Fc in steigenden Mengen hinzugegeben. Gestrichelte Linien: mehr als 100 % oder 200 % (zwei Bindungsstellen oder drei Bindungsstellen) der Komponente x sind an Komponente y gebunden.

Ergebnisse

Auch der eukaryontisch hergestellte extrazelluläre Bereich vom mCAR, dessen Fc-Teil proteolytisch entfernt wurde, ist in der Lage, an FN zu binden (Abb. 4.27). Es kann also ausgeschlossen werden, dass der Fc-Teil in irgendeiner Weise die Bindung zu FN unterstützt.

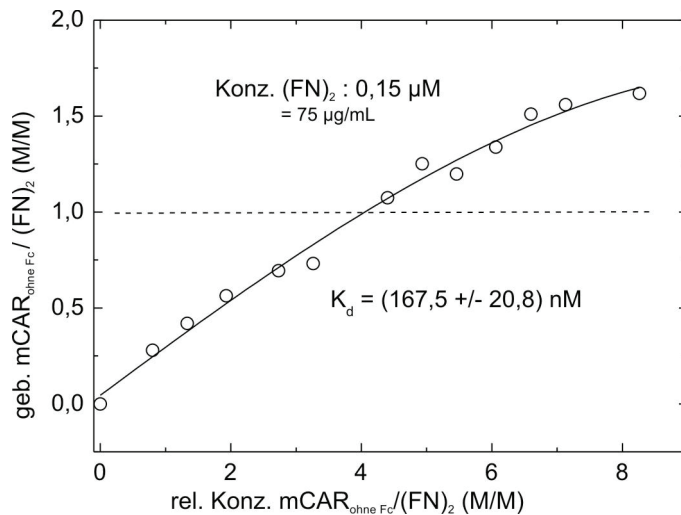


Abb. 4.27 mCAR_{ohne Fc} bindet FN. Bindungskurve nach Sedimentationsgleichgewicht-Analyse (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke). Die Affinität ist analog zu mCAR_{extra} und chCAR-Fc. Bei achtfachem molaren Überschuss an mCAR_{ohne Fc} ist durchschnittlich ein FN-Dimer an 1,5 mCAR_{ohne Fc} gebunden. mCAR_{ohne Fc} ist bei den eingesetzten Konzentration 0,15-1,2 µM (bis 38,5 µg/mL) überwiegend ein Monomer. FN wurde in einer Konzentration von 0,15 µM vorgelegt und mCAR_{ohne Fc} in steigenden Mengen hinzugegeben.

Nicht nur eukaryontisch gewonnener extrazellulärer CAR, sondern auch das bakteriell hergestellte mCAR_{extra} (siehe 4.1.1.1) wurde in Sedimentationsgleichgewicht-Analysen eingesetzt, um die Bindung an FN und Agrin zu überprüfen. In einem ersten Versuch, der dazu diente die korrekte Funktionsfähigkeit von mCAR_{extra} zu testen, wurde die Fähigkeit untersucht an Ad2 Fiber Knob zu binden und konnte positiv bestätigt werden (Abb. 4.28, A), da es mit ähnlicher Affinität bindet wie chCAR-Fc. Daraus ist zu entnehmen, dass, obwohl mCAR_{extra} aus *E. coli* stammt, zumindest eine korrekte Faltung der D1-Domäne vorliegen sollte, die für die Bindung an Fiber Knob verantwortlich ist (Freimuth et al., 1999; van Raaij et al., 2000). Das Fiber-Knob-Trimer kann mehr als ein mCAR_{extra} binden.

Als Negativ-Kontrolle wurde die Bindung an BSA untersucht, die aber um mindestens drei Größenordnungen schwächer ist (Abb. 4.28, B). Die Bindung an Agrin 000 und FN zeigt ein ähnliches Ergebnis wie das Experiment mit chCAR-Fc (Abb. 4.28 C und D). Die K_d -Werte sind in der gleichen Größenordnung (Abb. 4.26 B und G). Das FN-Dimer bindet zwei mCAR_{extra} im Sättigungsbereich, geht aber auch bei einem siebenfachen molaren Überschuss

Ergebnisse

an $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ nicht über zwei hinaus, was ein Hinweis darauf ist, dass das FN-Monomer (d.h. eine Kette des Disulfid vernetzten Moleküls) nur eine Bindungsstelle für $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ besitzt.

Es wird also gezeigt, dass das extrazelluläre Segment vom CAR (unabhängig davon, ob murin oder aus dem Hühnchen stammend, ob eu- oder prokaryontisch hergestellt) direkt mit ECM-Glycoproteinen interagiert.

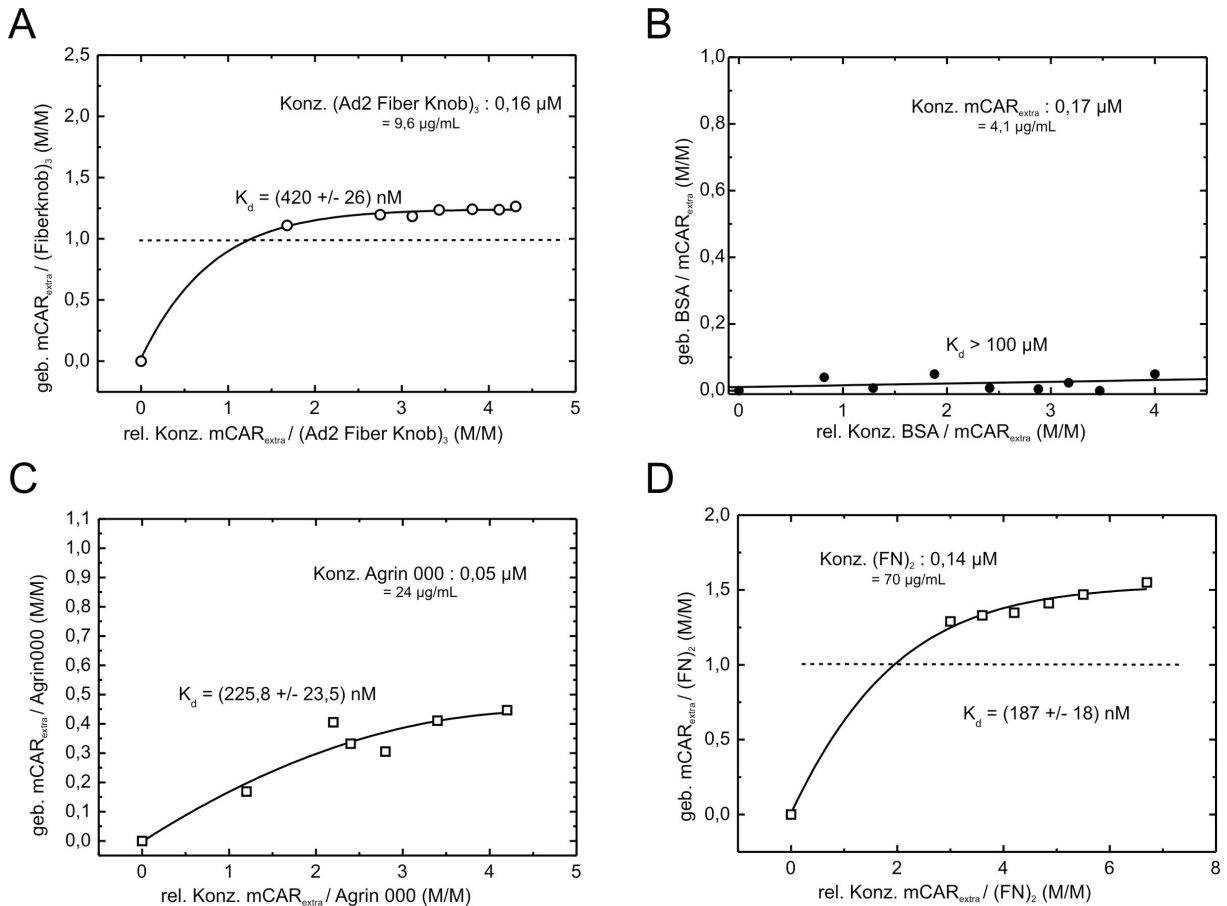


Abb 4.28 $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ bindet Agrin und FN. Bindungskurven der Interaktionsstudien mittels Sedimentationsgleichgewicht-Analyse zwischen $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ und chAgrin sowie FN (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke). **A** $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ bindet das Fiber-Knob-Trimer, wobei bis zu einem dreifachen molaren Überschuss an $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ ein Fiber-Knob-Trimer mehr als ein $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ aufnehmen kann. Ad2 Fiber Knob wurde in einer Konzentration von 0,16 μM vorgelegt und $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ in steigenden Mengen hinzugegeben. **B** $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ und BSA binden so gut wie nicht aneinander. Bis zu einem vierfachen molaren Überschuss an $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ sind noch mehr als 90 % des BSA ungebunden. BSA wurde in einer Konzentration von 0,17 μM vorgelegt und $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ in steigenden Mengen hinzugegeben. **C** $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ bindet chAgrin 000. Bei vierfachem molaren Überschuss an $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ liegt ca. 50 % des Agrin als Teil eines Komplexes vor. Rekombinantes chAgrin 000 wurde in einer Konzentration von 0,05 μM vorgelegt und $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ in steigenden Mengen hinzugegeben. **D** $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ bindet an FN. Unter gesättigten Bedingungen bindet ein FN-Dimer mehr als ein $\text{mCAR}_{\text{extra}}$. FN wurde in einer Konzentration von 0,14 μM vorgelegt und $\text{mCAR}_{\text{extra}}$ in steigenden Mengen hinzutitriert.

Ergebnisse

K_d	chCAR-Fc	Fc	mCAR _{ohne Fc}	mCAR _{extra}
Agrin 748	$1,83 \times 10^{-7}$	keine Bindung		
Agrin 000	$1,77 \times 10^{-7}$	keine Bindung		$2,26 \times 10^{-7}$
Fiber Knob Ad2	$1,4 \times 10^{-7}$	$1,65 \times 10^{-4}$		$4,2 \times 10^{-7}$
Tenascin-R	$3,25 \times 10^{-7}$	keine Bindung		
Laminin-1	$2,85 \times 10^{-7}$	$1,46 \times 10^{-6}$		
Fibulin-1	$1,14 \times 10^{-6}$	$7,0 \times 10^{-5}$		
FN	$1,089 \times 10^{-7}$	$> 10^{-3}$	$1,67 \times 10^{-7}$	$1,87 \times 10^{-7}$
rβ1-Neurexin LNS-Domäne				keine Bindung
BSA				$> 10^{-4}$

Tab. 4.2 Zusammenfassung der K_d -Werte [M] der heterophilen Bindungen des extrazellulären Segments vom CAR aus Sedimentationsgleichgewicht-Analysen. Zwischen rβ1-Neurexin (LNS-Domäne) und mCAR_{extra} konnte keine Bindung gemessen werden, da bis zu einem vierfachen molaren Überschuss an mCAR_{extra} keine Komplexbildung deutlich wurde.

4.2.2.3 Kartierung der Bindungsregionen im CAR und FN: CAR bindet mit seiner zweiten Ig-Domäne an die zweite Heparinbindungsdomäne von FN

Um die Bindungsregionen vom CAR und FN einzugrenzen, wurden Sedimentationsgleichgewicht-Analysen mit CAR-Domänen und FN-Fragmenten durchgeführt. Die Fragmente FN-40-kDa und FN-30-kDa (deren Sequenzen sich überlagern; Abb. 4.14 L) aus der C-terminal gelegenen 2.Heparinbindungsdomäne sind in der Lage an die extrazellulären Domänen vom CAR zu binden. Diese Tatsache bekräftigt zusätzlich die Hypothese, dass eine Polypeptidkette des FN-Dimers nur eine CAR-Bindungsstelle enthält, da diese FN-Fragmente Monomere sind. Bis zu einem dreifachen molaren Überschuss an mCAR_{extra} geht die Bindungskurve entlang der Ordinaten nicht über 1 hinaus, wobei die gemessenen Affinitäten ähnlich derjenigen des intaktes FN sind (Abb. 4.29 A und B).

Werden die Fragmente FN-30-kDa oder FN-40-kDa durch das N-terminale Fragment FN-70-kDa (Abb. 4.29 C) oder das zentral lokalisierte Fragment FN-120-kDa ersetzt nicht abgebildet aber analog zu Abb. 4.29 C), dann ergibt sich keine Bindung.

Zusammengefasst decken die drei proteolytischen Fragmente FN-70-kDa, FN-120-kDa und FN-40-kDa nahezu die komplette AS-Sequenz von FN ab. Das bedeutet, dass eine Polypeptidkette von FN nur eine Bindungsstelle für den extrazellulären Bereich vom CAR enthält.

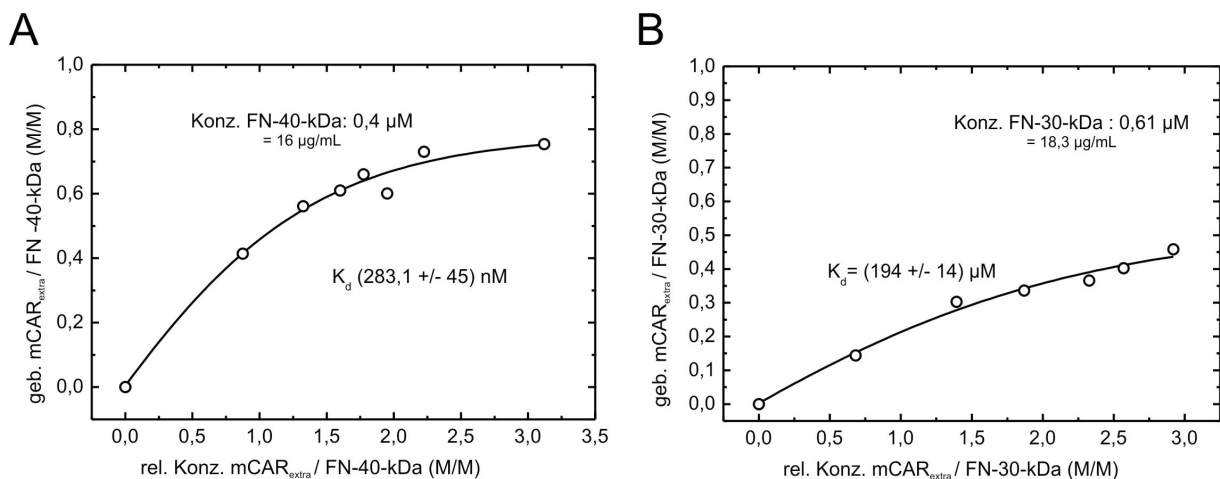
Ergebnisse

Um die FN-Binderegion vom CAR zu lokalisieren wurden die D1-Domäne und die D2-Domäne vom CAR mCAR D1 122 und mCAR D2 verwendet. Erneut mit Hilfe von Sedimentationsgleichgewicht-Analysen konnte gezeigt werden, dass sich mCAR D2 bis zu einer Konzentration von 160 $\mu\text{g/mL}$ im monomeren Zustand befindet (Abb. 4.29 D). In einem zweiten Schritt ist zu sehen, dass es an das intakte FN binden kann, wobei im gesättigten Zustand ein FN-Dimer mehr als ein, aber nicht mehr als zwei mCAR D2 binden kann (Abb. 4.29 E). Die Affinität liegt in der gleichen Größenordnung wie die Bindung von chCAR-Fc an FN.

Um die Kartierung der FN-Bindungsregion zu vervollständigen, konnte gezeigt werden, dass es keine Interaktion zwischen mCAR D1 122 (in einer Konzentration von 37,8 $\mu\text{g/mL}$, überwiegend monomer) und FN gibt (nicht abgebildet). Somit ist ebenfalls für die CAR-Seite gezeigt, dass der extrazelluläre Bereich vom CAR nur eine Bindungsstelle für FN enthält und zwar die D2-Domäne.

mCAR D2 interagiert auch mit dem Fragment FN-40-kDa, das als CAR-bindendes Fragment identifiziert werden konnte (Abb. 4.29 F). Allerdings ist die Affinität um eine Größenordnung schwächer, was damit zusammenhängen kann, dass FN-40-kDa deutlich kleiner ist als das intakte FN und damit auch die Rückdiffusion während der Zentrifugation einen stärkeren Einfluss auf das Gleichgewicht ausübt.

Keine Bindung konnte zwischen Fiber Knob und mCAR D2 beobachtet werden (d.h. keine Komplexbildung bei mindestens vierfachem molarem Überschuss an mCAR D2 (hier nicht abgebildet)). Das bekräftigt die Annahme, dass Ad2 ausschließlich über eine Fiber-Knob-CAR-D1-Wechselwirkung an die Wirtszelle adhärert (Freimuth et al., 1999).



Ergebnisse

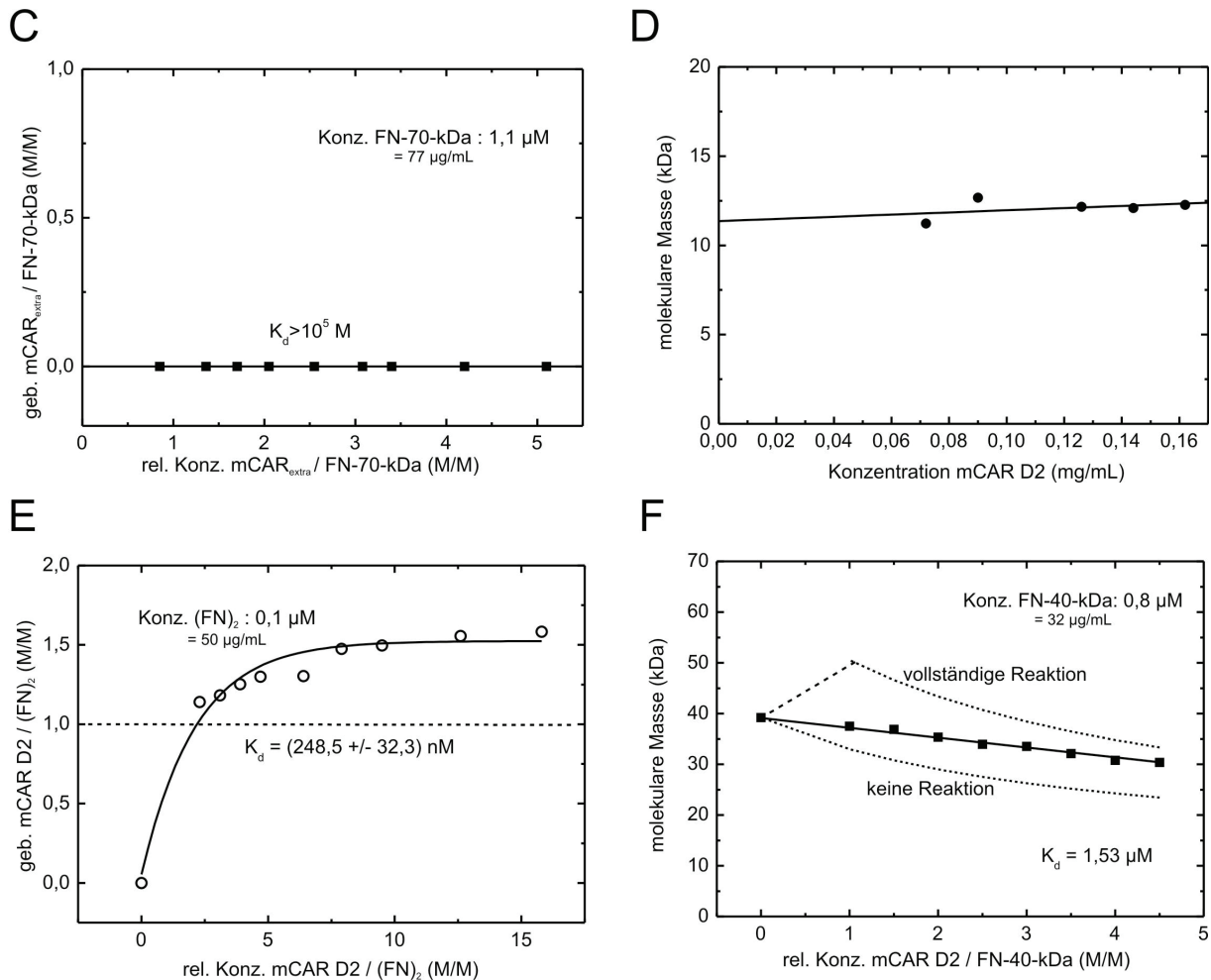


Abb. 4.29 mCAR D2 bindet an FN-40-kDa. Bindungskurven von Sedimentationsgleichgewicht-Analysen (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke). **A** mCAR_{extra} bindet FN-40-kDa. Die Affinität ist analog zum intakten FN, wobei die Bindungskurve entlang der Ordinatenachse den Wert von 1 nicht übersteigt. FN-40-kDa wurde in einer Konzentration von 0,4 µM vorgelegt und mCAR_{extra} in steigenden Mengen hinzugegeben. **B** mCAR_{extra} bindet FN-30-kDa. Die Affinität ist analog zum intakten FN und zu FN-40-kDa, wobei die Bindungskurve entlang der Ordinatenachse nicht über 1 hinausgeht. Das α-chymotryptische Fragment FN-30-kDa wurde in einer Konzentration von 0,61 µM vorgelegt und mCAR_{extra} in steigenden Mengen hinzugegeben. **C** mCAR_{extra} bindet nicht das C-terminale FN-Fragment FN 70kDa. Der berechnete K_d-Wert ist nur ein theoretischer Wert. FN-70-kDa wurde in einer Konzentration von 1,1 µM vorgelegt und mCAR_{extra} in steigenden Mengen hinzugegeben. **D** Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung von mCAR D2 zeigt keinen signifikanten Massenanstieg bis zu einer Konzentration von 160 µg/mL. In diesem Bereich ist mCAR D2 ein Monomer mit einer Masse von etwa 11 kDa. **E** mCAR D2 bindet FN. Die Affinität ist analog zu chCAR-Fc, mCAR_{ohne Fc} und mCAR_{extra}. Die Bindungskurve übersteigt entlang der Ordinaten den Wert von 1, aber sogar bei einem mehr als 15fachen molaren Überschuss an mCAR D2 den Wert von 2 nicht, was bedeutet, dass das FN nur zwei mCAR D2 binden kann. FN wurde in einer Konzentration von 0,1µM vorgelegt und mCAR D2 in steigenden Mengen hinzugegeben. **F** mCAR D2 bindet FN-40-kDa. Die Bindung wurde anhand der Molmassenveränderung durch steigende Zugabe von mCAR D2 an FN-40-kDa mit 0,8 µM ermittelt. Bei steigender mCAR D2-Konzentration müsste die Molmasse absinken (für den Fall, dass keine Interaktion stattfindet), da mCAR D2 eine deutlich ge-

Ergebnisse

ringere Masse als FN-40-kDa hat. Letzteres ist aber nicht zu beobachten, so dass auf das Entstehen von mCAR D2-FN-40-kDa-Komplexen geschlossen werden muss.

K_d	mCAR D1 122	mCAR D2	mCAR _{extra}
FN	keine Bindung	$2,48 \times 10^{-7}$	$1,87 \times 10^{-7}$
FN-70-kDa			keine Bindung
FN-40-kDa			$2,83 \times 10^{-7}$
FN-30-kDa			$1,94 \times 10^{-7}$
FN-120-kDa			keine Bindung

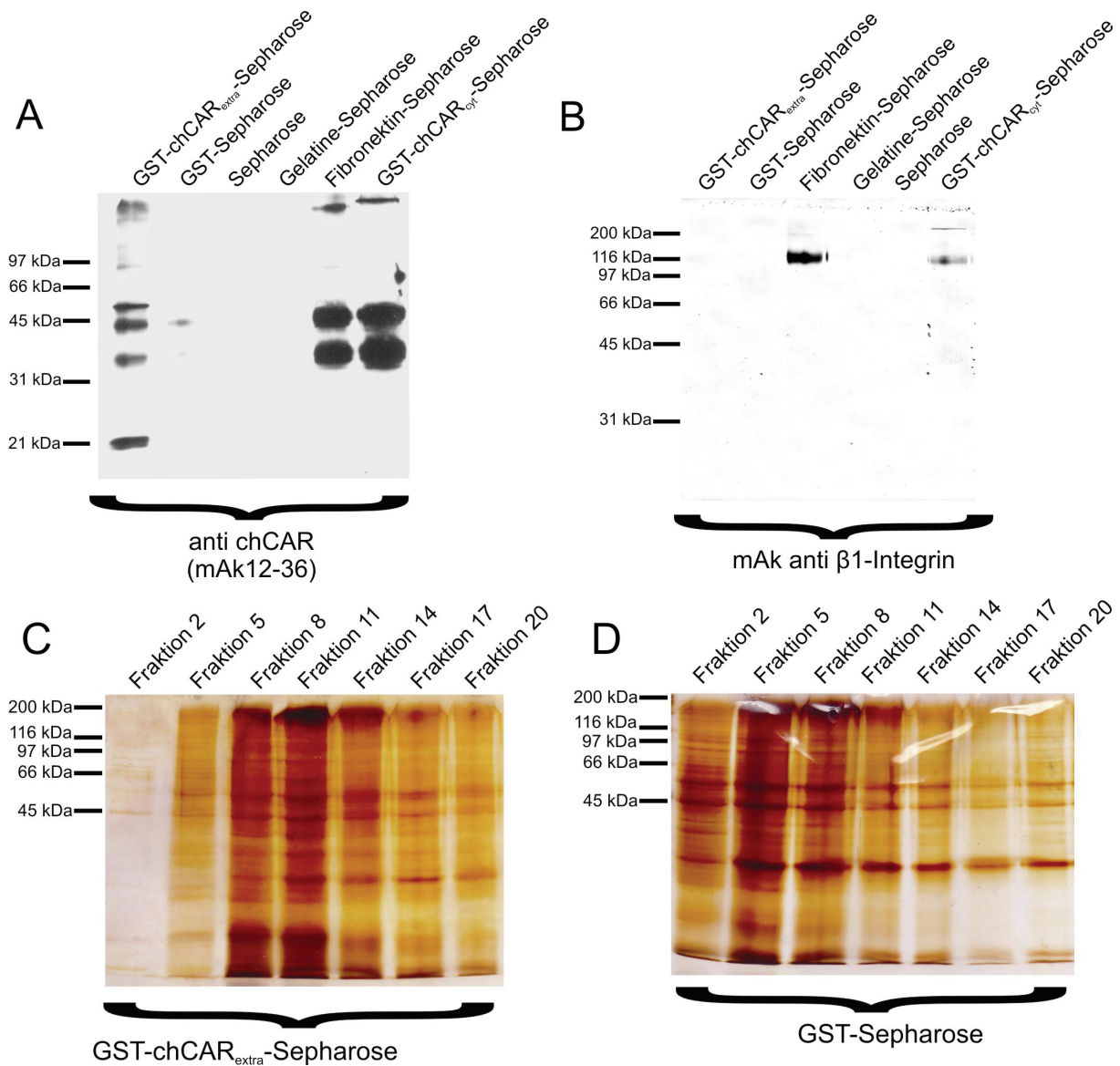
Tab. 4.3 Zusammenfassung der K_d -Werte [M] der heterophilen Bindungen des extrazellulären Segments vom CAR und verschiedenen FN-Fragmenten zur Kartierung der Bindungsstelle aus Sedimentationsgleichgewicht-Analysen.

4.2.2.4 Nativer chCAR kann mit FN-Sepharosesäule angereichert werden

Zur Klärung der Frage, ob nativer chCAR ebenfalls an FN binden kann, wurde FN (aus Plasma gereinigt) immobilisiert (4.1.3.4), um chCAR aus embryonalen ZNS-Homogenaten zu isolieren. Ca. 50mL (etwa 45g) gepackte Plasmamembranen aus Gehirnen von E14/15 Hühnchen wurden in Triton-X-100 solubilisiert und über sechs in Serie geschaltete Säulen laufen gelassen. In der Reihenfolge (Säulenvolumina von etwa 4 mL): Sepharose 4B, GST-Sepharose 4B (ca. 15 mg GST an CNBr-Sepharose 4B gekoppelt), FN-Sepharose 4B (ca. 17 mg bFN an CNBr-Sepharose 4B gekoppelt), GST-chCAR_{extra}-Sepharose 4B (ca. 27 mg GST-chCAR_{extra} (analog zu mCAR_{extra} bakteriell gewonnen) an CNBr-Sepharose 4B gekoppelt), Gelatine-Sepharose 4B (ca. 0,5 g pGelatine an CNBr-Sepharose 4B gekoppelt) und GST-chCAR_{cyt}-Sepharose 4B (ca. 15 mg GST-chCAR_{cyt} an CNBr-Sepharose 4B gekoppelt). Anschließend wurden die Säulen gewaschen und eluiert. Die Eluate wurden in Fraktionen zu je 1 mL getrennt. Jede dritte Fraktion wurde per SDS-PAGE und Silbernitratfärbung untersucht (Abb. 4.30 C-H). Es werden zahlreiche Proteine mit diesen Matrices isoliert. Die daraus als am stärksten konzentrierte Fraktion jedes Eluates wurde per WB-Analyse mit mAk12-36 gegen chCAR analysiert. Dabei zeigte sich, dass auch nativer chCAR durch FN-Sepharose und GST-chCAR_{extra}-Sepharose angereichert werden kann (Abb. 4.30 A), jedoch nicht durch GST-Sepharose und Gelatine-Sepharose. Nativer chCAR bindet also direkt oder indirekt an FN und chCAR_{extra}. Wobei im Eluat der Säule GST-chCAR_{extra}-Sepharose neben dem nativen chCAR vermutlich auch von der Sepharosematrix losgelöstes GST-chCAR_{extra}

Ergebnisse

(und höchstwahrscheinlich eine Abbaubande davon) zu sehen ist, mit einer apparenten Masse von 50 kDa. Gelatine, Sepharose sowie GST zeigen keine chCAR-Banden. Allerdings bindet quantitativ das meiste chCAR an GST-chCAR_{cyt}-Sepharose. Dabei handelt es sich vermutlich um einen indirekten über das Aktin-Zytoskelett vermittelten Kontakt (4.3), denn die Silbernitratfärbung dieses Säuleneluates (Abb. 4.30 F) zeigt eine kräftige Aktin-Bande bei 42 kDa. Zudem ist auch durch WB-Analyse ersichtlich, dass β 1-Integrin in diesem Eluat enthalten ist (Abb. 4.30 B), das wie CAR möglicherweise eine Verbindung von FN zum Aktin-Zytoskelett herstellt. Im Eluat der FN-Sepharose-Säule ist dementsprechend ebenfalls β 1-Integrin vorhanden. β 1-Integrin stellt einen Teil der Integrin-Heterodimere dar, die als Rezeptoren für FN bekannt sind (Boudreau und Jones, 1999).



Ergebnisse

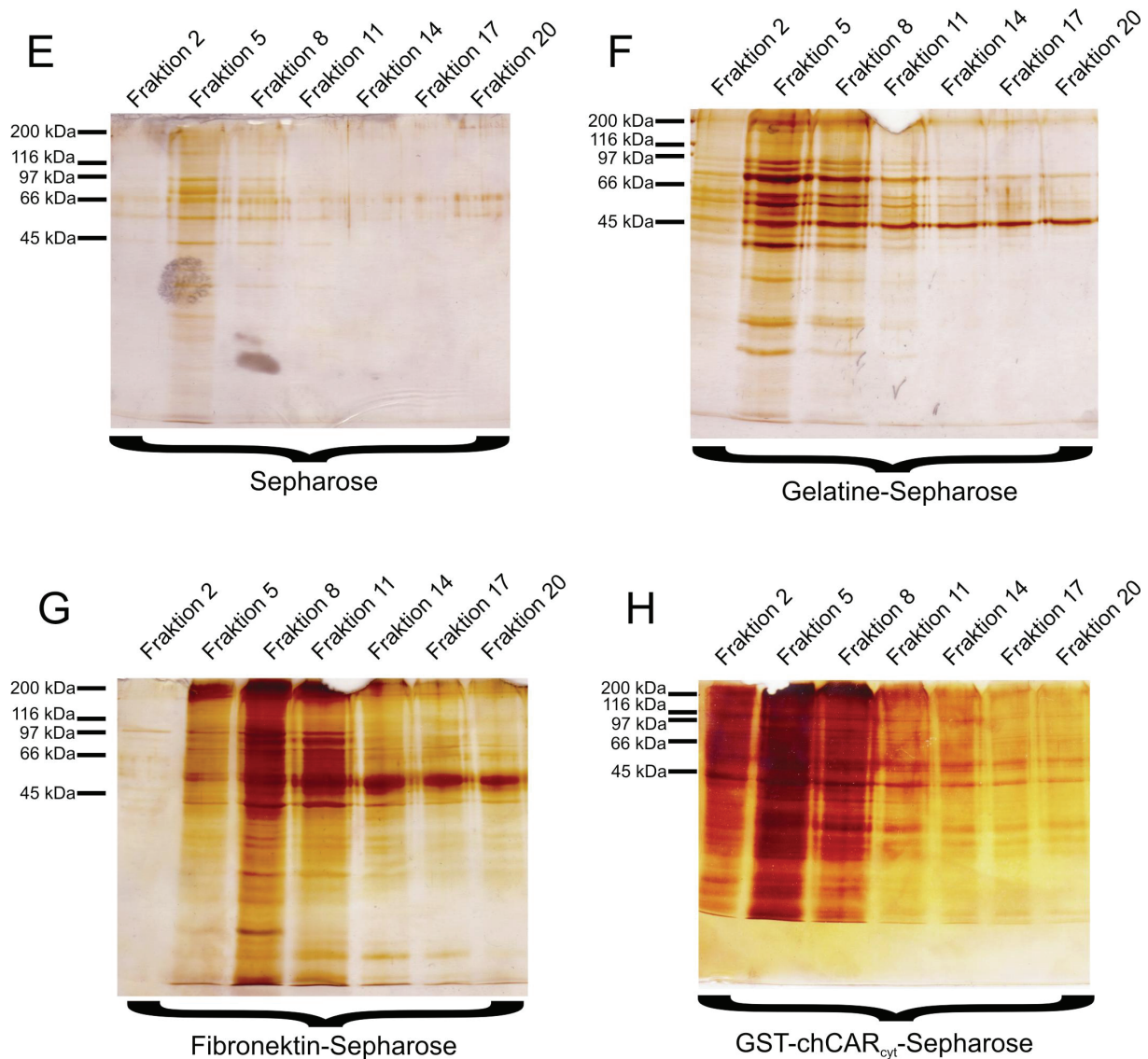


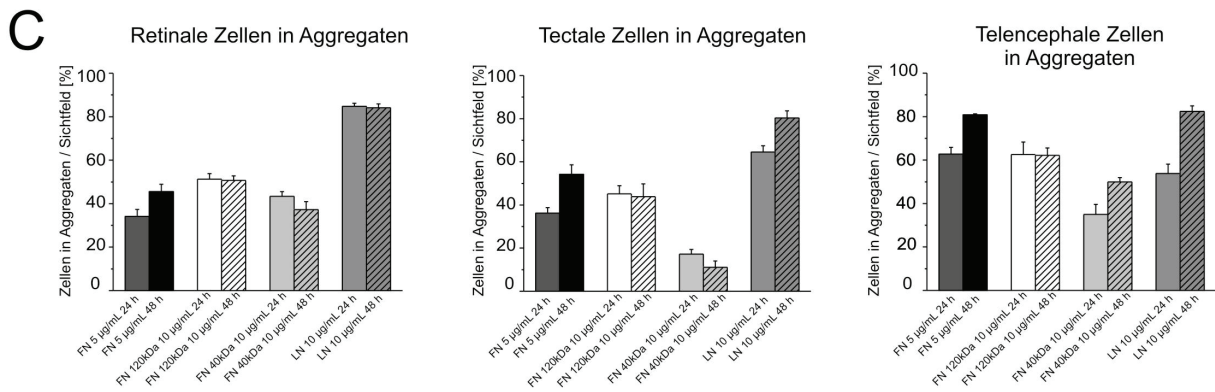
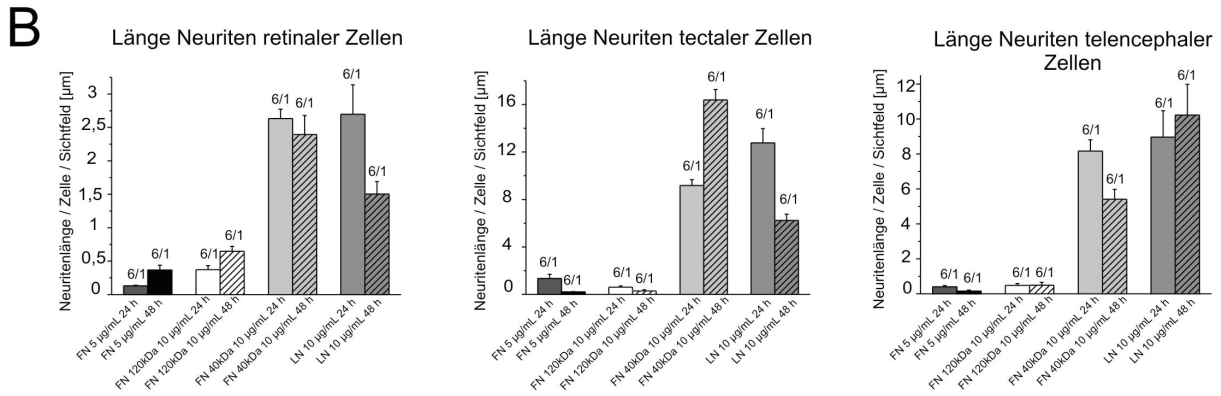
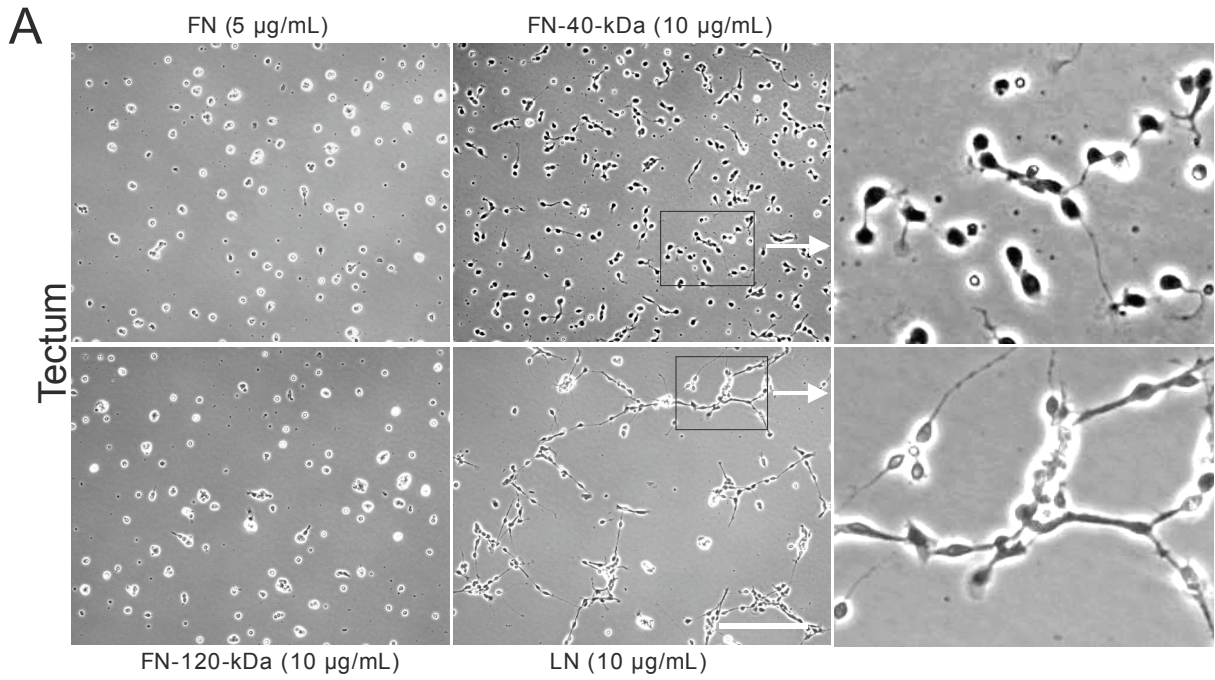
Abb. 4.30 chCAR lässt sich durch FN-Sepharose aus embryonalem Gehirnlisat anreichern. Die oben beschriebenen Säulen wurden mit vier Säulenvolumina gewaschen und mit 0,1 M DEA pH 11,5 / 0,5 % DOC eluiert. Anschließend erfolgte eine Fraktionierung nach Volumen (zu je 1 mL). Einige Fraktionen (jede dritte) wurden mittels SDS-PAGE und Silbernitratfärbung untersucht. Die jeweils am stärksten konzentrierte Fraktion (nach visueller Einschätzung aufgrund der Intensität der Bandenfärbung) wurde durch WB-Analyse auf ihren Gehalt an nativem chCAR oder β 1-Integrin hin untersucht. **A** FN-Sepharose-Eluat, aber nicht Gelatine-Sepharose enthält nativen chCAR. 12 % SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse mit anti-chCAR-Ak (mAk12-36) der Elution der oben beschriebenen Affinitätssäulen. Deutliche chCAR-Banden erkennbar in den Eluaten von FN-Sepharose, GST-chCAR_{extra}-Sepharose und GST-chCAR_{cyt}-Sepharose. Zusätzlich vermutlich GST-chCAR_{extra} in der ersten Spur. Geladen wurden je 30 μ L. **B** 10 % SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit anschließender WB-Analyse mit mAk anti- β 1-Integrin. β 1-Integrin bindet an FN- und GST-chCAR_{cyt}-Sepharose. Die Gelbeladung erfolgte analog zu A. **C bis H** 10 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Silbernitratfärbung der fraktionierten Eluate. Es wurden jeweils 30 μ L geladen.

4.2.2.5 Neuritenwachstum auf FN-40-kDa ist CAR-abhängig

Vor dem Hintergrund, dass FN ein extrazellulärer Ligand vom CAR ist und insbesondere das FN-40-kDa-Fragment die CAR-Bindestelle enthält, sowie dem durch andere erlangten Wissen, dass die 2.Heparinbindedomäne von FN eine Neuriten-Stimulierende Funktion hat (Rogers et al., 1985), sollte an dieser Stelle untersucht werden, inwiefern sich dieses FN-Fragment als Substrat für embryonale Neuronen eignet und ob die dadurch ausgelöste Neuritenbildung CAR-abhängig ist.

Hühnchen-Neuronen aus der Retina (E8), aus dem Tectum (E6) sowie Telencephalon (E6) wurden dissoziiert und auf verschiedenen beschichteten Kulturschalen ausgesät und für 24 oder 48 h inkubiert. Als Substrate wurden verwendet: FN (5 µg/mL, was einer Konzentration entspricht, bei der CAR-positive HEK 293 oder HeLa Zellen vollständig adhären; hier nicht abgebildet), FN-120-kDa (10 µg/mL, auch hier adhären HeLa Zellen vollständig (hier nicht abgebildet)), FN-40-kDa (10 µg/mL) und Laminin-1 (10 µg/mL). Nach Auswertung zeigt sich, dass alle vier Substrate mehr oder weniger gleich gute Eigenschaften besitzen, was die Anzahl der adhären Zellen betrifft (Abb. 4.31 D), ausgenommen Neuronen aus Tectum und Telencephalon, welche FN-40-kDa und Laminin-1 bevorzugen (Abb. 4.31 A). Bezogen auf das Neuritenwachstum haben FN-40-kDa und Laminin-1 die stärksten Effekte auf alle drei Zelltypen, wobei retinale nur kurze, tectale und telencephale Zellen jedoch im Durchschnitt 2-8mal längere Neuriten ausbilden. Insgesamt stimuliert FN-40-kDa am stärksten das Neuritenwachstum von tectalen Zellen (Abb. 4.31 B). Ein großer Unterschied jedoch zwischen Laminin-1 und FN-40-kDa als Matrix besteht darin, dass Laminin-1 eher eine Aggregation, d.h. eine homophile Interaktion der Zellen untereinander bewirkt, FN-40-kDa hingegen dafür sorgt, dass die Neuronen vereinzelt vorliegen (Abb. 4.31 C). Auch hier wird erkennbar, dass die retinalen Neuronen auf Laminin-1 stärker homotypisch assoziieren als Tectum und Telencephalon. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass FN-40-kDa einen ähnlich stark Neuriten-fördernden Effekt auf tectale und telencephale Neuronen hat wie Laminin-1.

Ergebnisse



Ergebnisse

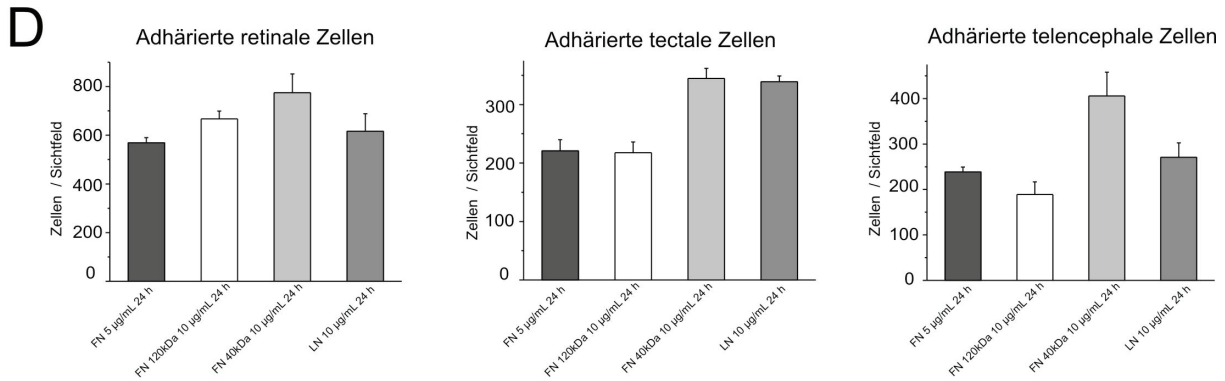
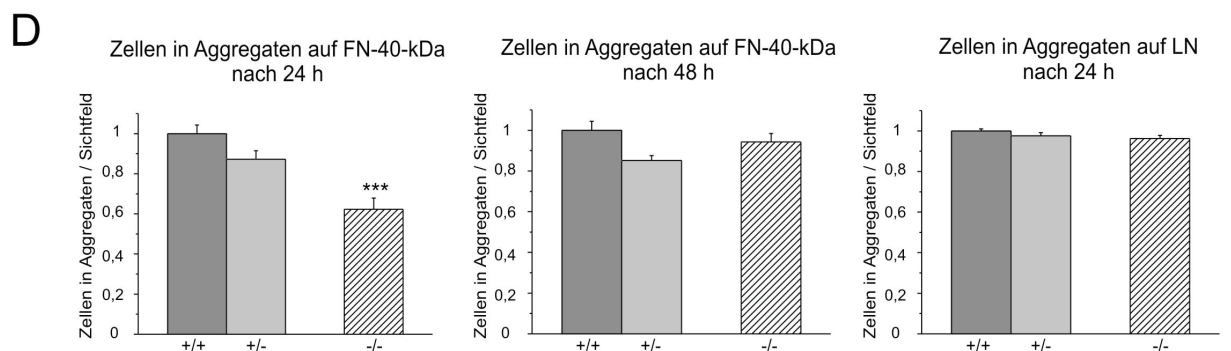
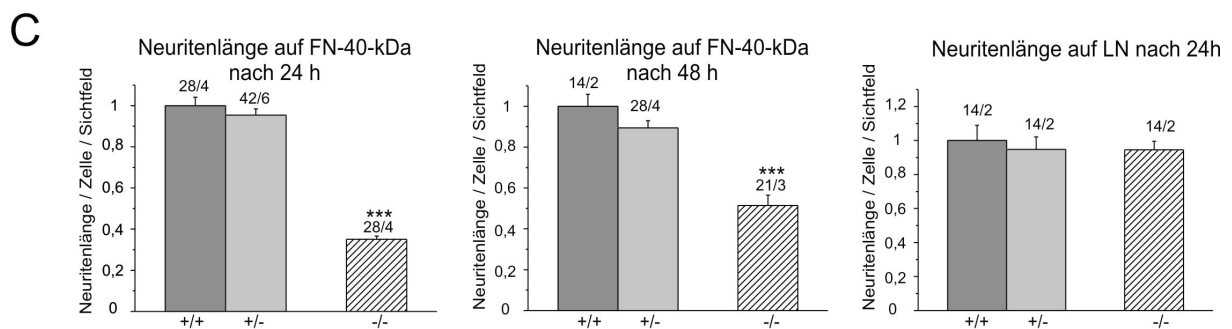
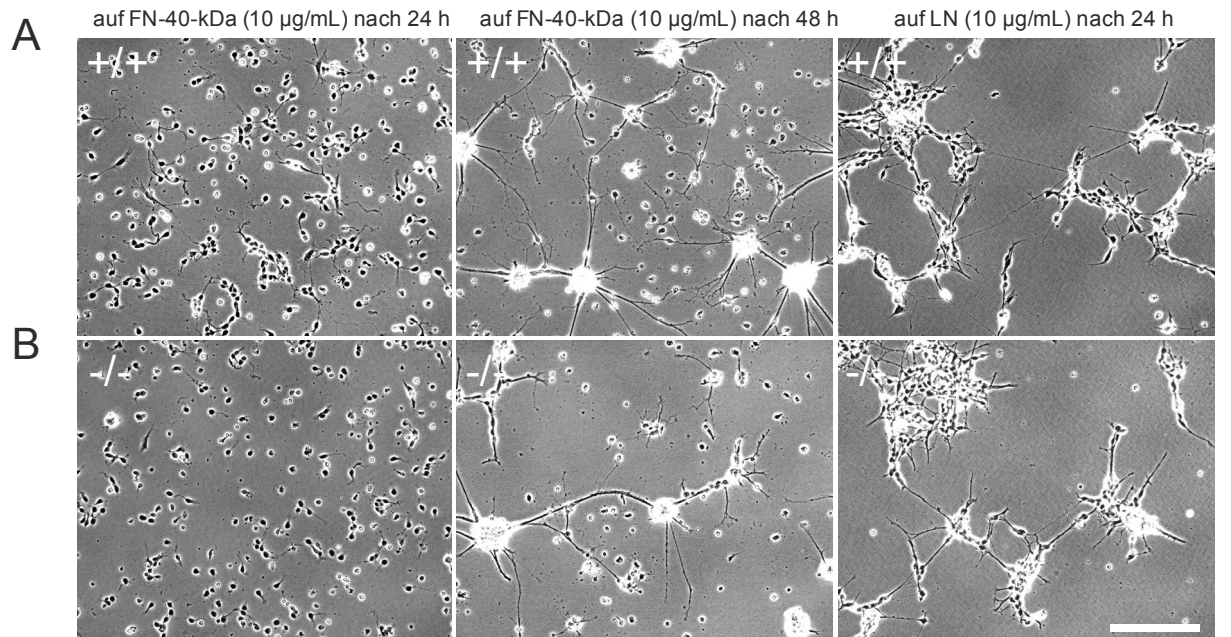


Abb. 4.31 FN-40-kDa als Substrat fördert Neuritenwachstum. Neuronen auf Laminin-1, FN und FN-Fragmenten: Retinale (E8), tectale (E6) oder telencephale (E6) Zellen aus Hühnerembryonen wurden einzeln auf verschiedenen Substraten für 24 oder 48 h kultiviert. **A** Tectale Neuronen nach 24 h bildeten nur Neuriten auf FN-40-kDa und Laminin-1. Auf FN-40-kDa sind viele Wachstumskegel zu beobachten. **B** FN-40-kDa fördert Neuritenwachstum. Gemessene durchschnittliche Neuritenlängen pro Zelle pro Foto. Für alle drei hier aufgeführten Zelltypen bieten FN und FN-120-kDa nicht die Voraussetzungen zum Neuritenwachstum, weder nach 24 noch nach 48 h. FN-40-kDa und Laminin-1 dagegen fördern stark das Neuritenwachstum. Retinale Zellen bilden insgesamt durchschnittlich kürzere Neuriten als tectale oder telencephale Neuronen. **C** Durchschnittlicher Anteil der Zellen pro Foto, die in Aggregaten von mehr als 3 Zellen vorliegen. Die geringste Aggregation zeigen tectale Neuronen auf FN-40-kDa. Laminin-1 fördert Zell-Zell-Adhäsionen, wobei nach 24 h retinale Neuronen auf Laminin-1 eher aggregieren als tectale oder telencephale Zellen. **D** Durchschnittliche auf dem Boden der Kulturschale adhärenzte Anzahl von Zellen pro Foto. Die Zellzahl aller drei Zelltypen ist nach 24 h auf FN-40-kDa und Laminin-1 stets höher als auf FN und FN-120-kDa. Alle hier angegebenen Werte sind absolut und nicht relativ. LN: Laminin-1. Maßbalken: 200 µm

Da sich FN-40-kDa als Substrat für die neurale Zellkultur eignet, konnte hier mit Hilfe von Neuronen aus mCAR-defizienten (aber bei etwa E10,5 lethalen) Mäusen geprüft werden, ob das Vorhandensein vom CAR notwendig ist, das Neuritenwachstum auf FN-40-kDa zu fördern. Das Experiment zeigt bei einer Reihe von Präparationen verschiedener Würfe, dass heterozygote und Wildtyp Zellen auf FN-40-kDa innerhalb von 24 h Neuriten von ca. 10 µm/Zelle ausbilden (hier nicht abgebildet). Die Mehrzahl der mCAR-defizienten Neuronen jedoch hat keine Neuriten (Abb. 4.32 A-C). Daraus kann man schließen, dass mCAR notwendig für das Neuritenwachstum ist. Auch nach 48 h Inkubation ist ein starker Unterschied der durchschnittlichen Neuritenlänge zwischen Wildtyp und heterozygoten Zellen auf einer Seite und mCAR-defizienten Zellen auf der anderen Seite zu sehen, obwohl die Werte sich annähern und mCAR-defiziente Neuronen auf etwa 50 % der Wildtyp Neuritenlänge kommen. Auf Laminin-1 ist keine Differenz weder nach 24 h noch nach 48 h (letzteres ist hier nicht abgebildet) zu messen (Abb. 4.32 A-C).

Ergebnisse

Insgesamt muss man sagen, dass das verringerte Neuritenwachstum und Aggregationsverhalten (Abb. 4.32 D) nicht aufgrund einer unterschiedlichen Anzahl adhärierter Zellen zustande kommt, da auf FN-40-kDa nach 24 h beim Wildtyp im Durchschnitt 493 Zellen, bei den Heterozygoten 404 Zellen und bei den mCAR-defizienten Zellen 461 Zellen pro Bild gezählt wurden (hier nicht abgebildet). Auch nach 48 h gibt es keine statistisch signifikanten Unterschiede.



Ergebnisse

Abb. 4.32 Neuritenwachstum und Zell-Aggregation auf FN-40-kDa sind CAR-abhängig. Mausneuronen auf FN-40-kDa: Dissoziierte Kultur embryonaler Maus-Neuronen aus dem Metencephalon und Mesencephalon von mCAR-defizienten, heterozygoten und Wildtyp Tieren ausgesät auf FN-40-kDa oder Laminin-1 (je 10 µg/mL), kultiviert für 24 h oder 48 h. **A** Wildtyp Neuronen; nach 24 h Kultivierung auf FN-40-kDa liegen die Zellen bis auf wenige Aggregate vereinzelt vor und bilden Neuriten aus. Nach 48 h hat der Großteil der Neuronen sich zu Aggregaten vereinigt und die Neuritenlänge ist weiter gestiegen. Einige Neuriten sind faszikuliert. Nach 24 h Kultivierung auf Laminin-1 sind die meisten Neuronen Teile von Aggregaten. Die Neuritenanzahl ist geringer, aber die Länge der wenigen Neuriten dafür deutlicher. **B** mCAR-defiziente Neuronen; nach 24 h Kultivierung auf FN-40-kDa haben die Neuronen deutlich kürzere Neuriten als Wildtyp Neuronen, auch die vereinzelt Aggregate sind weniger. Auch nach 48 h haben diese Neuronen deutlich kürzere Neuriten als der Wildtyp. Trotzdem liegen die mCAR-defizienten Neuronen nun zum größten Teil in Aggregaten vor. Nach 48 h Kultivierung auf Laminin-1 ist die Situation nahezu unverändert gegenüber den Wildtyp Neuronen. **C** Neuritenwachstum von mCAR-defizienten Neuronen auf FN-40-kDa ist stark eingeschränkt. Gemessene durchschnittliche Neuritenlängen pro Zelle pro Foto zeigen einen stark reduzierten Wert für mCAR-defiziente Neuronen nach 24 und 48 h. Auch der Unterschied zwischen heterozygoten und mCAR-defizienten Neuronen ist statistisch extrem signifikant. Auf Laminin-1 gibt es keinen signifikanten Unterschied. **D** mCAR-defiziente Neuronen aggregieren weniger nach 24 h auf FN-40-kDa. Anteil der Zellen pro Foto, die in Aggregaten von mehr als drei Zellen vorliegen. Wildtyp und heterozygote bilden mehr Aggregate als mCAR-defiziente Neuronen nach 24 h Kultivierung auf FN-40-kDa. Nach 48 h geht der Unterschied verloren. Auf Laminin-1 gibt es ebenfalls keine signifikante Differenz. Angaben über statistische Signifikanz in Form von * beziehen sich auf Wildtypwert und Heterozygotenwert. Alle gemessenen Werte wurden auf den Wildtypwert normalisiert. LN: Laminin-1. Maßbalken: 200 µm

Nachdem sich mittels neuraler Zellkultur mCAR-defizienter Neuronen gezeigt hat, dass Neuritenwachstum und Aggregation auf FN-40-kDa inhibiert sind, sollte die Frage untersucht werden, ob dies auch durch Adhäsions-blockierende Antikörper erreicht werden kann. E6 Hühnchen-Neuronen aus dem Tectum oder Telencephalon sowie E8 Neuronen aus der Retina wurden isoliert und dissoziiert in Kultur genommen. Verschiedene Ansätze wurden in Gegenwart von anti-chCAR-Antikörper inkubiert. Fab-Fragmente verschiedener polykloner Antikörper wurden in einer Konzentration von jeweils 250 µg/mL ins Medium gegeben bzw. der monoklonale anti-chCAR-Antikörper mit 10 µg/mL. Fab Ng-CAM dient neben der unbehandelten Probe als Kontrolle und ist gegen Ng-CAM (Neuron glia cell adhesion molecule) gerichtet. Die Inkubation aller Ansätze erfolgte für 24 h (Abb. 4.33 A und B).

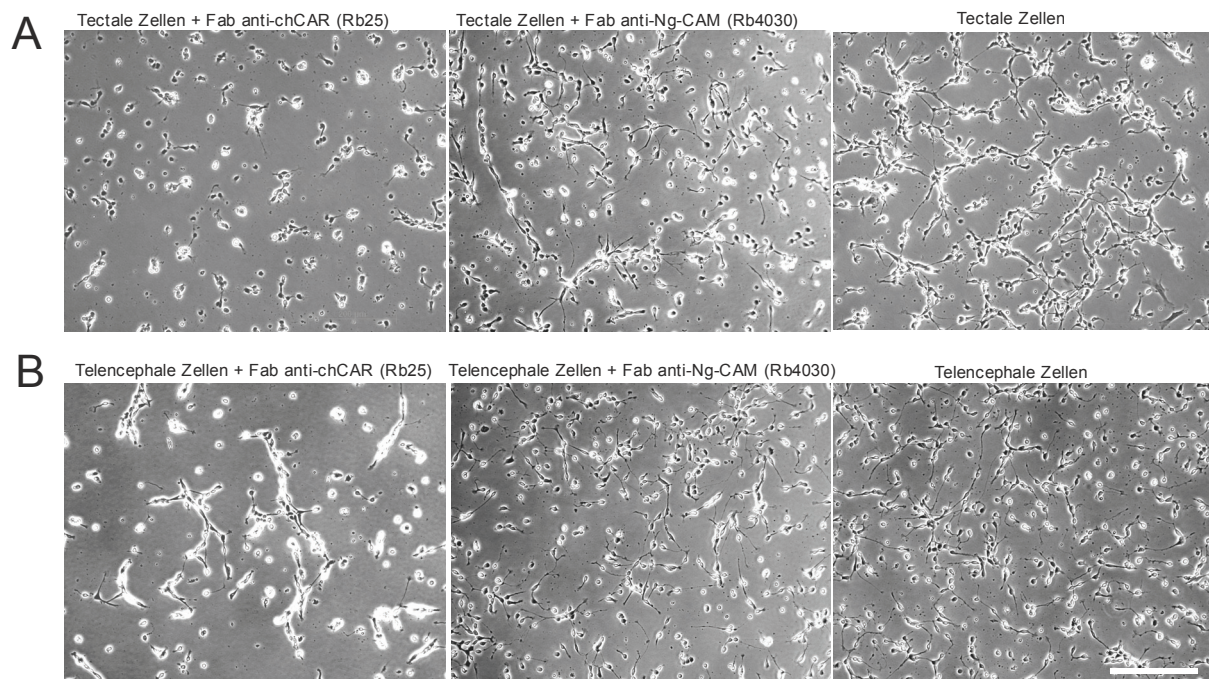
Fab25 reduziert das Neuritenwachstum tectaler Neuronen um ca. 70 % und Fab40 auf etwa 50 % des Kontrollwertes. Der mAk12-36 erwirkt eine Reduktion um etwa 20 %. Fab Ng-CAM hingegen bewirkt keine signifikante Reduktion des Neuritenwachstums (Abb. 4.33 C). Die Anzahl der sich in Aggregaten befindlichen Zellen wird ebenfalls durch alle anti-CAR Antikörper reduziert, aber auch durch den Fab Ng-CAM (Abb. 4.33 D), was nicht verwundert, denn Ng-CAM ist bislang auch als homophiles neurales Zelladhäsionsmolekül be-

Ergebnisse

beschrieben worden (Rathjen und Schachner, 1984). Zellen aus dem Telencephalon zeigen bezüglich des Neuritenwachstums ein ähnliches Ergebnis, allerdings lässt sich deren Aggregationsverhalten durch Fab25, Fab40 und durch mAk12-36 kaum stören. Retinale Zellen zeigen insgesamt im Vergleich zum Tectum einen schwächeren Effekt sowohl im Neuritenwachstum als auch bei der Aggregation, was darauf zurückzuführen ist, dass bereits ohne Zusatz perturbierender Antikörper retinale im Vergleich zu tectalen Zellen nur schwach auf FN-40-kDa-beschichteten Kulturschalen Neuriten ausbilden (Abb. 4.31).

Wenn man die Anzahl der adhärenierten tectalen Zellen bestimmt (hier als normalisierte Werte dargestellt), so wird bei diesem Experiment deutlich, dass die anti-chCAR-Antikörper hier sehr wohl einen Einfluss auf das Anheften der Zellen ausüben, denn die Zahlen sind mit 372 Zellen für Fab25 und 395 Zellen für Fab40 sowie 468 Zellen für mAk12-36 gegenüber 542 Zellen pro Foto reduziert (Abb. 4.33 E). Allerdings sind die Werte einerseits weniger stark reduziert (etwa auf 70-80 % des Kontrollwertes) als dies beim Neuritenwachstum der Fall ist, andererseits ist auch die Adhäsion in Gegenwart von Fab Ng-CAM beeinträchtigt (ca. 80% des Kontrollwertes), was aber keine Wirkung auf das Neuritenwachstum zu haben scheint. Auch die Zellen aus dem Telencephalon und der Retina zeigen eine verminderte Adhäsion auf dem Boden der Kulturschale in Gegenwart der Antikörper gegen CAR sowie Ng-CAM.

Die Wirkung der Antikörper gegen CAR ist auf das Neuritenwachstum stärker als auf die Adhäsion.



Ergebnisse

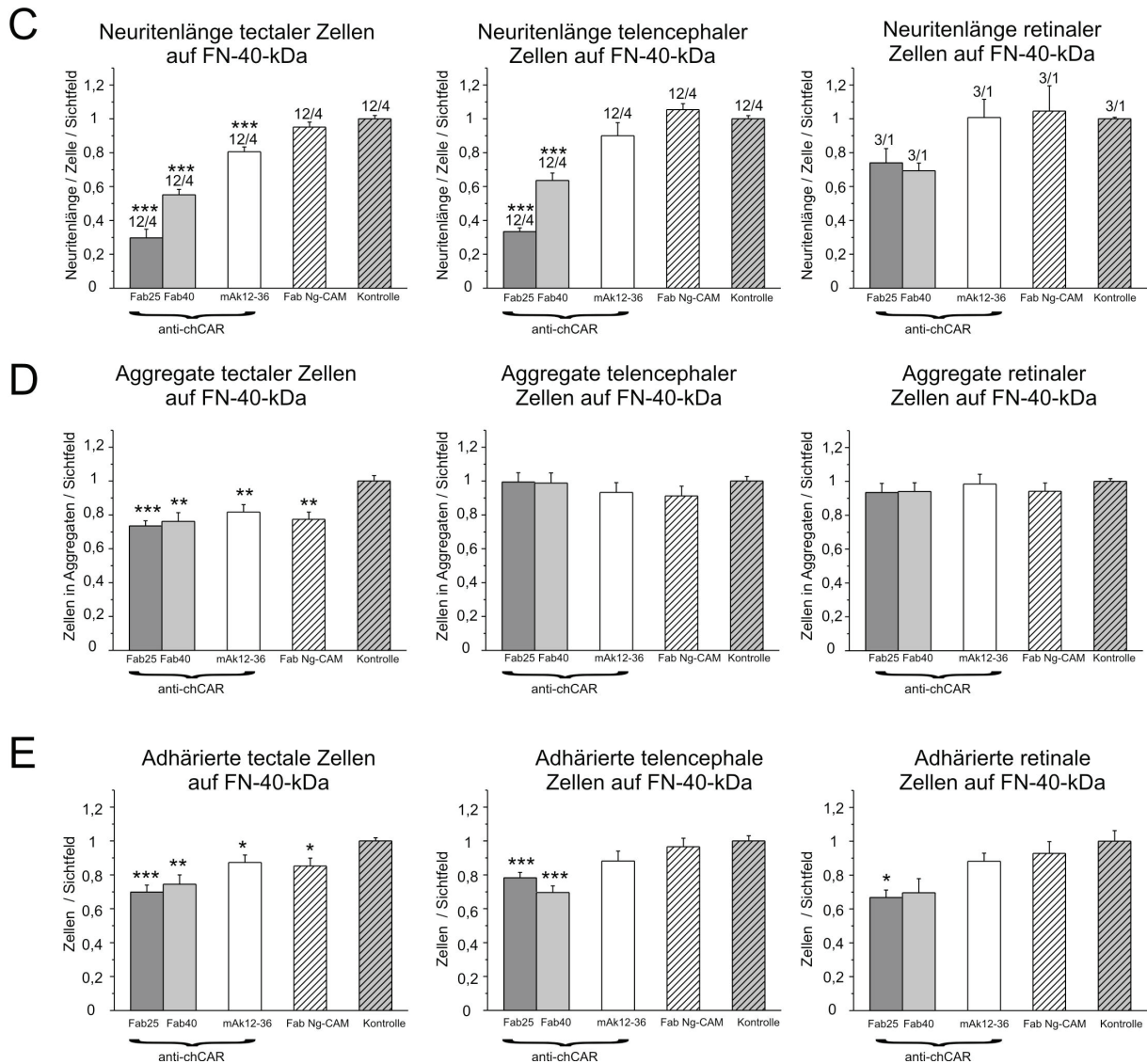


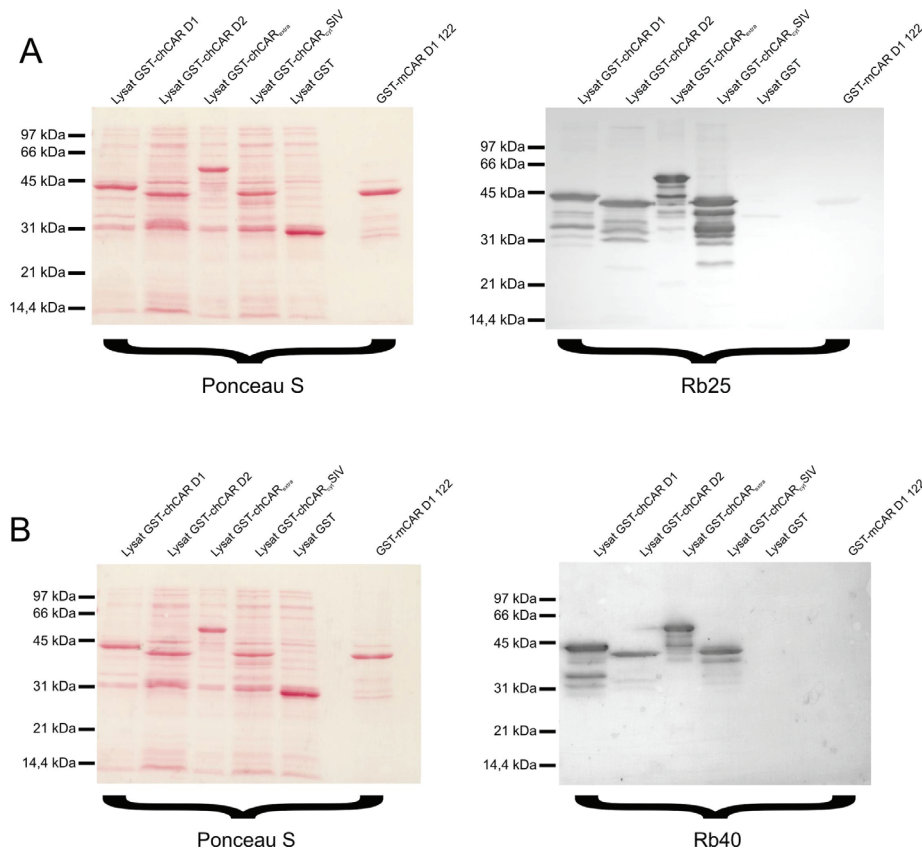
Abb. 4.33 Anti-CAR Fabs blockieren Neuritenwachstum, Aggregation und Adhäsion auf FN-40-kDa: Tectale (E6), telencephale (E6) oder retinale Neuronen (E8) aus Hühnerembryonen wurden dissoziiert und für 24 h in Anwesenheit von Antikörpern gegen chCAR auf FN-40-kDa kultiviert. Als Kontrolle dienten Kulturen ohne Antikörper bzw. Kulturen mit Antikörpern gegen Ng-CAM. Monovalente Fab-Fragmente (polyklonaler Antikörper) wurden in einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und der monoklonale Antikörper gegen chCAR (mAk12-36) in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gegeben. **A** Fab25 inhibiert deutlich Neuritenwachstum tectaler Neuronen, gegenüber Fab Ng-CAM oder Kontrolle. **B** Fab25 inhibiert ebenfalls deutlich das Neuritenwachstum telencephaler Zellen gegenüber Fab Ng-CAM und Kontrolle. **C** Anti-chCAR-Antikörper inhibieren Neuritenwachstum auf FN-40-kDa. Gemessene durchschnittliche Neuritenlängen pro Zelle pro Foto zeigt, dass Fab25 und Fab40 das Neuritenwachstum tectaler Zellen massiv stören, mAk12-36 ist etwas schwächer. Fab Ng-CAM hat so gut wie keinen Einfluss. Auf telencephale Zellen haben die Antikörper insgesamt einen schwächeren Einfluss, obwohl Fab25 immer noch sehr stark das Neuritenwachstum blockiert. Retinale Neuronen zeigen eine noch schwächere Wirkung auf die Antikörper, wobei zu beachten ist, dass das Neuritenwachstum auf FN-40-kDa ohnehin sehr gering ist, was eine zusätzliche Inhibition erschwert. **D** Anti-chCAR-Antikörper stören

Ergebnisse

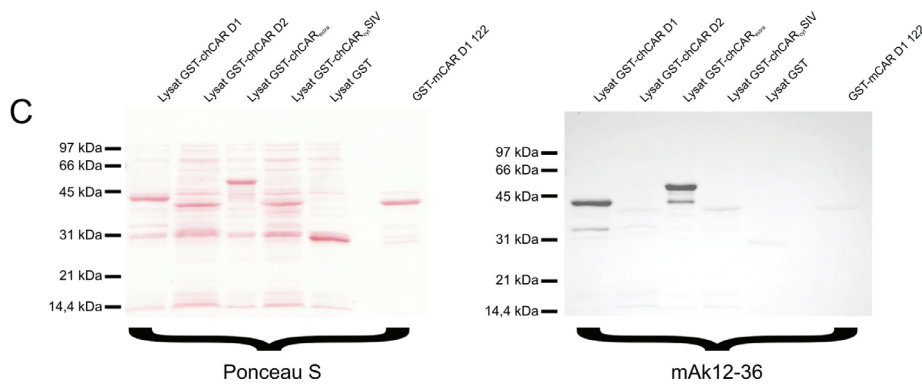
Aggregation auf FN-40-kDa. Anteil der Zellen pro Foto, die in Aggregaten von mehr als drei Zellen vorliegen. Alle Antikörper (auch Fab Ng-CAM) reduzieren die Aggregation tectaler Zellen um 20-30 %. Telencephale und retinale Neuronen aggregieren trotz Antikörper nicht schlechter. E Anti-chCAR-Antikörper und anti-Ng-CAM-Antikörper stören Adhäsion auf FN-40-kDa. Alle hier eingesetzten Ak beeinträchtigen die Adhäsion tectaler Zellen. Alle gemessenen Werte wurden auf den unbehandelten Kontrollwert normalisiert. Maßbalken: 200µm

Zum besseren Verständnis der Perturbationsexperimente mit Antikörpern gegen chCAR, sollten deren Epitope auf bestimmte Domänen vom chCAR mittels WB-Analysen eingegrenzt werden. Für die polyklonalen anti-chCAR-Antikörper ist dies nicht gelungen, da sie die beiden extrazellulären Domänen D1 und D2 sowie den zytoplasmatischen Bereich vom CAR binden, also vermutlich das gesamte CAR erkennen (Abb. 4.34 A und B). Für den mAk12-36 stellt sich die Situation jedoch differenzierter dar: Interessanterweise erkennt dieser nur die D1-Domäne (Abb. 4.34 C), was als Erklärung dafür gelten kann, dass er gegenüber dem polyklonalen Fab-Fragmenten nur einen schwachen inhibitorischen Effekt auf das Neuri-tenwachstum auf FN-40-kDa hat. Denn es ist die D2-Domäne vom CAR, welche mit FN-40-kDa interagiert. Eine weitere Eingrenzung des mAk12-36-Epitops ist nicht gelungen (Abb. 4.34 D).

Alle hier getesteten Antikörper sind insofern Hühnchen-spezifisch, dass sie nicht an die aus mCAR stammende D1-Domäne binden.



Ergebnisse



D

chCAR extrazell.	24	<u>LSITSAE SAFEKAQGER VTLPC</u> TFELS EEDVGTLDIE WVLIPADIQK
mCAR extrazell.		...TP. <u>QRI...KGET AY...K.T.. P..Q.P....</u> .LIS.S.N.I
chCAR extrazell.	71	KEETIILYSG DRIYNHYHPA LAGRLQFTSS DPKSGDGSVD ILNLKSADTG
mCAR extrazell.		VDQV..... .K..DN.Y.D .K..VH...N .V....A.IN <u>VT..QLS.I.</u>
chCAR extrazell.	121	<u>TYQCKVKKAP GVESLKIQLN VLVK</u> PASTKC SIEGSOEIGK DIVLKASQE
mCAR extrazell.	ANK.FL.TSG.R. FVD..E...N .FK...EPK.
chCAR extrazell.	171	GTPLLYDWR RVVTGTQGLP ATSVLNKNTG ELLK <u>IK</u> RD YSGTYS CVAS
mCAR extrazell.		.SLP.QFE.Q KL-SDS.TM. TPWLAEMTSP VISV. <u>...SE</u>TVQ
chCAR extrazell.	221	NRVGTDECSV EL <u>IK</u> PPINT AG
mCAR extrazell.	S.Q.ML R.D.V...S.R ..

Abb. 4.34 Epitopkartierung der anti-chCAR-Antikörper Rb25, Rb40 und mAk12-36: Bakterienlysate verschieden transformierter Kulturen wurden per WB analysiert. Geladen wurden etwa gleiche Mengen an überexprimierten Proteinen, was aus der Ponceau S-Färbung hervorgeht. **A** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen der verschiedenen Lysate bzw. an Glutathion-Sepharose gereinigten GST-mCAR D1 122. Rb25 bindet den kompletten extrazellulären wie auch den intrazellulären Bereich vom chCAR. Der Antikörper bindet aber nicht GST-mCAR D1 122. **B** 12 % SDS-PAGE (Beladung wie A) unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen und WB-Analyse. Rb40 bindet den kompletten extrazellulären wie auch den intrazellulären Bereich vom chCAR. Der Antikörper bindet aber nicht GST-mCAR D1 122. **C** 12 % SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen (Beladung wie A) und WB-Analyse. mAk12-36 bindet nur an GST-chCAR D1. chCAR D2 und den intrazellulären Bereich erkennt er nicht. Der Antikörper bindet aber nicht GST-mCAR D1 122. **D** AS-Sequenzvergleich der extrazellulären Segmente vom chCAR und mCAR. Ein eindeutiges Epitop von mAk12-36, also nur ein Bereich, in dem sich die Sequenzen der beiden Spezies voneinander unterscheiden, lässt sich hier nicht ermitteln. Unterstrichen dargestellt ist jeweils die Sequenz der D1-Domänen. Ein Punkt zeigt an, dass die Sequenzen an dieser Stelle identisch sind. Cysteine sind fett gedruckt. Theoretische N-Glycosylierungsmotive sind für chCAR rot und für mCAR gelb unterlegt.

4.2.2.6 Keine veränderte Zelladhäsion von CAR-defizienten Kardiomyozyten auf FN oder FN-Fragmenten

Obwohl die Interaktion mCAR-defizienter Neuronen mit FN-40.kDa stark eingeschränkt ist, zeigen Kardiomyozyten, welche ebenfalls CAR exprimieren keine veränderte Adhäsion an immobilisiertem FN-40-kDa. Die Beurteilung von mikroskopischen Feldern wies zu keinem Zeitpunkt der Inkubation auf eine veränderte Adhäsion der mCAR-defizienten Zellen hin. Auch andere FN-Fragmente oder das intakte FN (Zuordnung siehe Abb. 4.11 L) dienen den genotypisch unterschiedlichen Kardiomyozyten unter serumfreien Bedingungen als gleich gutes Substrat (Abb. 4.35).

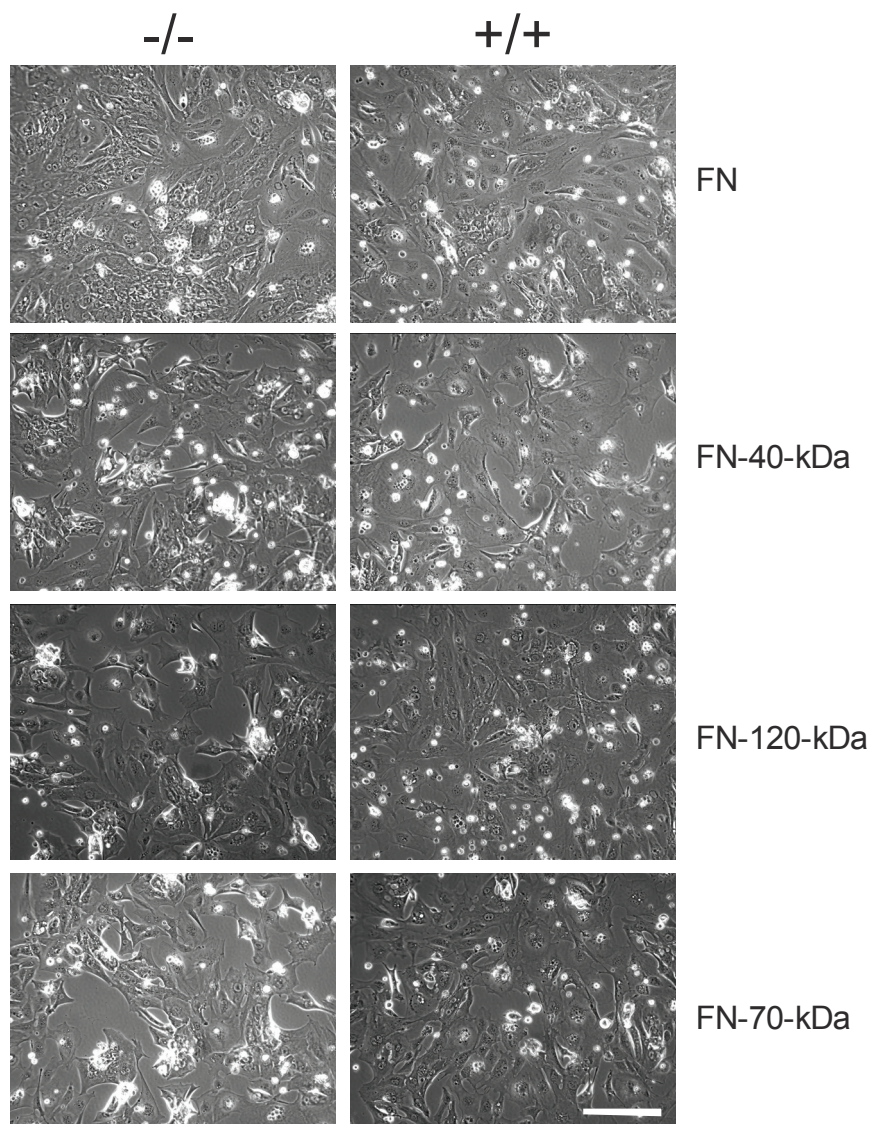


Abb. 4.35 Adhäsion von Kardiomyozyten auf FN und FN-Fragmenten ist nicht CAR-abhängig: E10,5 Kardiomyozyten aus CAR-Wildtyp und CAR-KO Embryonen wurden isoliert und auf mit FN oder FN-Fragmenten

Ergebnisse

beschichteten Kulturschalen unter serumfreien Bedingungen ausgesät. Dabei wurde je ein Herzchen auf die identische Anzahl an Kulturschalen verteilt, um eine annähernd gleiche Zellzahl zu gewährleisten. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Aussaat wurden die Kulturschalen unter dem Mikroskop begutachtet (1 h bis mehrere Tage) und zu keinem Zeitpunkt konnte eine unterschiedliche Adhäsion der verschiedenen Ansätze festgestellt werden. Maßbalken: 100µm.

4.2.3 Die homophile und heterophile Aktivität der extrazellulären Domänen vom CAR schließen vermutlich einander aus

Die Frage, die sich aufdrängt, nachdem gezeigt werden konnte, dass der extrazelluläre Bereich vom CAR sowohl homo- als auch heterophil interagiert, zielt darauf ab, ob diese zwei Prozesse sich einander ausschließen, begünstigen oder parallel ablaufen. Es konnten einige Hinweise gesammelt werden, die dafür sprechen, dass es sich vermutlich um zwei getrennte, einander ausschließende Prozesse handelt.

4.2.3.1 mCAR D122 und mCAR D2 regulieren Neuritenwachstum und Aggregation auf FN-40-kDa

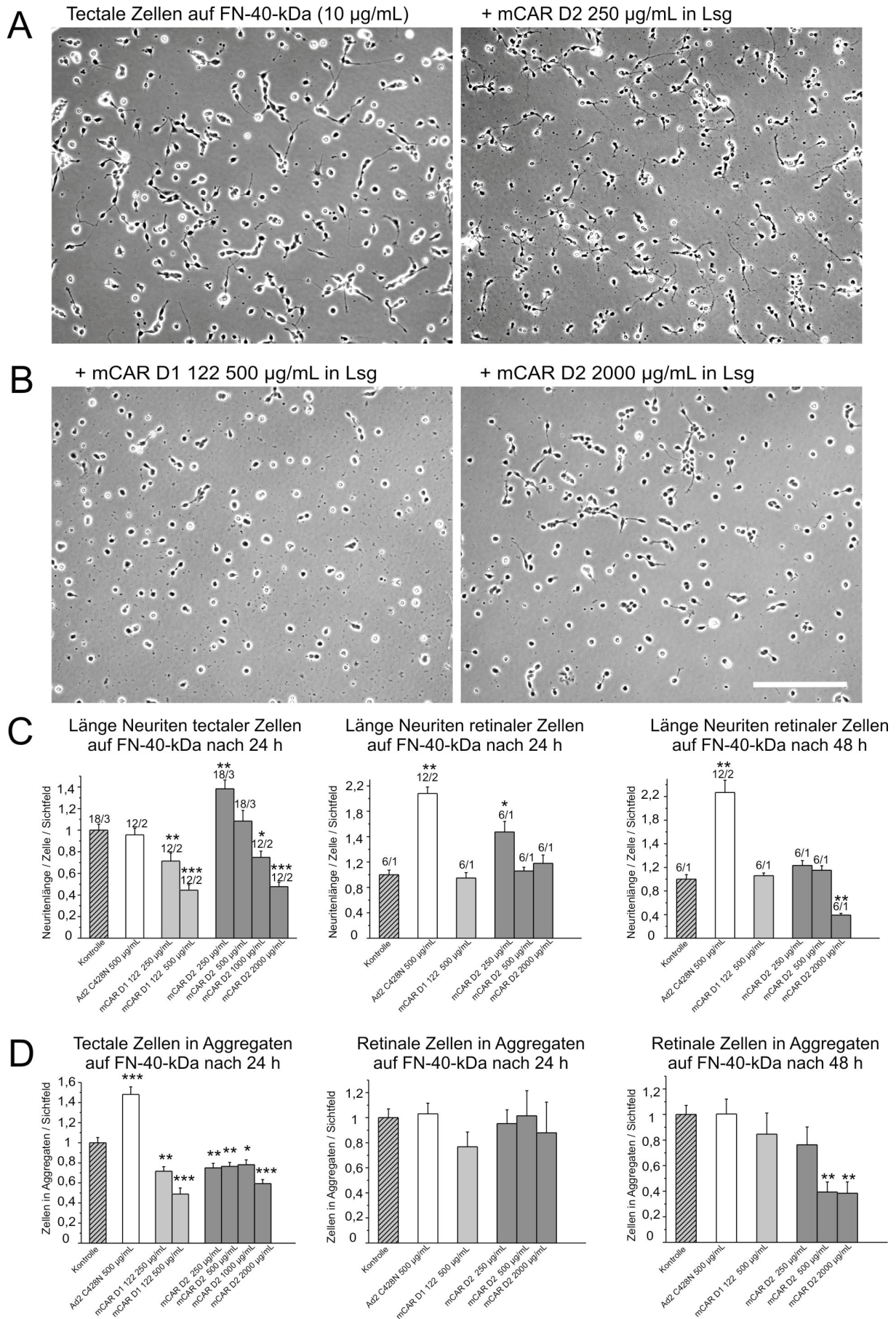
Tectale Hühnchen-Neuronen (E6) wurden dissoziiert und auf mit FN-40-kDa (10 µg/mL) beschichteten Kulturschalen in Gegenwart von gereinigtem löslichen mCAR D1 122, mCAR D2 und Ad2 Fiber Knob C428N für 24 h kultiviert (Abb. 4.36 A und B). Ad2 Fiber Knob C428N hat keinen Einfluss auf die Neuritenlänge, aber mCAR D1 122 und mCAR D2 (Abb. 4.36 C). Und zwar in der Form, dass mCAR D1 122 das Neuritenwachstum inhibiert, was mit steigender Konzentration zunimmt. Die Reduktion des Neuritenwachstums kann auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden, unter anderem auf eine Bindung von mCAR D1 122 an zelluläres D1, so dass keine CAR-Dimere entstehen können, wie sie in der kristallographischen Analyse vorgefunden werden. Dies könnte wiederum bewirken, dass D2 möglicherweise weniger exponiert ist und daher nicht in Wechselwirkung mit FN-40-kDa treten kann. Denkbar ist auch eine Bindung an zelluläres D2. Damit wäre eine Wechselwirkung von D2 an ECM-Glycoproteine unterbunden; wahrscheinlich dadurch, dass zelluläres D2 für beide Liganden (FN-40-kDa und mCAR D1 122) ein und dieselbe Bindungsregion verwendet. Würde die D2 – mCAR D1 122 oder D1 – mCAR D1 122 Wechselwirkung

Ergebnisse

gleichzeitig eine D2 – FN-40-kDa-Interaktion begünstigen, so müsste das Neuritenwachstum durch Zugabe von mCAR D1 122 ansteigen. Auf der Grundlage der gezeigten 20mal affineren Bindung von mCAR D1 122 an mCAR D2 als mCAR D1 122 an mCAR D1 122 (Tab. 4.1) ist letzteres Erklärungsmodell wahrscheinlicher.

mCAR D2 hingegen fördert bei einer Konzentration von 250-500 µg/mL leicht das Neuritenwachstum, sorgt dann aber bei noch höheren Konzentrationen für eine allmähliche Inhibition, die vermutlich auf die Absättigung der Bindungsregionen von immobilisiertem FN-40-kDa durch mCAR D2 zurückzuführen ist (Abb. 4.36 A-C). Für die Förderung des Neuritenwachstums durch mCAR D2 bei niedrigen Konzentrationen gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten: D2 bindet an einen zusätzlichen zellulären nicht identifizierten Rezeptor, welcher eine Zunahme der Neuritenextension bewirkt. Eine weitere Erklärung ist aber auch, dass mCAR D2 an zelluläres D1 bindet und auf diese Weise die homotypische Zellaggregation zugunsten der Zell-Matrix-Interaktion inhibiert. Letzteres hieße, dass die CAR-abhängige Zellaggregation primär durch eine D1-D2- und nicht durch eine D1-D1-Wechselwirkung zustande kommt. Hält man sich noch mal das Ergebnis der mCAR-defizienten Maus-Neuronen vor Augen, nämlich dass das Neuritenwachstum und Aggregationsverhalten von Neuronen auf einer FN-40-kDa-Matrix CAR-abhängig ist, so würde man zunächst erwarten, dass mCAR D2 in Lösung, welches das an FN bindende Fragment ist, einen blockierenden Effekt hat. Genau das ist auch der Fall, denn bei einer Konzentration von 2 mg/mL tritt eine 50 %ige Reduktion des Neuritenwachstums und ein 40 %iger Rückgang der Aggregation auf (Abb. 4.36 D). Bei hohen Konzentrationen von mCAR D2 tritt also dessen negativer Einfluss auf die Zell-Matrix-Interaktion in den Vordergrund, da alle Bindungsstellen von FN-40-kDa auf dem Boden der Kulturschale abgesättigt zu sein scheinen. mCAR D1 122 und mCAR D2 regulieren nicht nur das Neuritenwachstum, sondern auch die Adhäsion insgesamt, denn die Zahl der anhaftenden Zellen nimmt ab (Abb. 4.36 E). Für Retinale Zellen wurden Werte nach 24 h Inkubation (analog zum Versuch mit tectalen Zellen) erhoben, aber auch nach 48 h Inkubation. Auch retinale Zellen lassen sich in ihrer Zell-Matrix-Interaktion durch mCAR D2 bei geringen Konzentrationen fördern, und zumindest nach 48 h Inkubation auch durch 2 mg/mL blockieren (Abb. 4.36 C-E).

Ergebnisse



Ergebnisse

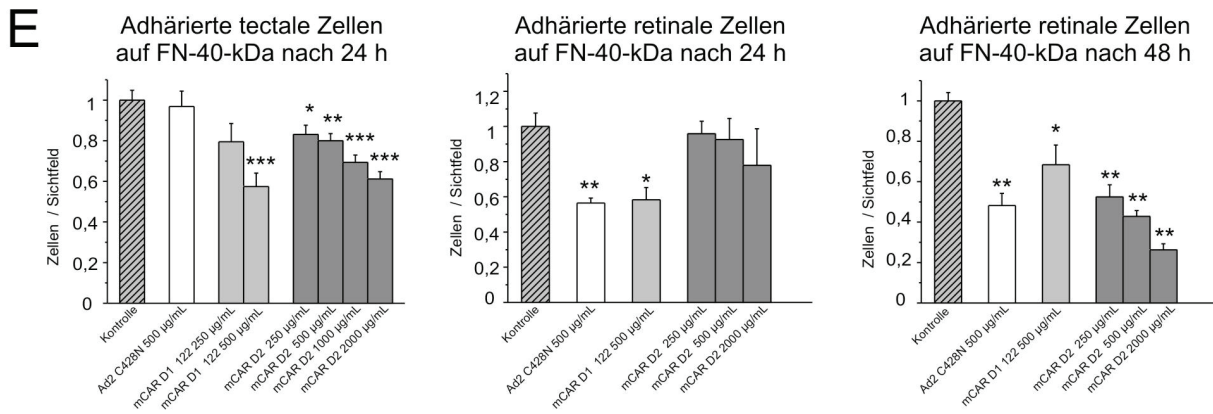


Abb. 4.36 mCAR D1 122 und mCAR D2 regulieren Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktion auf FN-40-kDa: Tectale Hühnchen-Neuronen (E6) wurden dissoziiert auf FN-40-kDa in Anwesenheit von löslichem Ad2 Fiber Knob C428N, mCAR D1 122 oder mCAR D2 für 24 h kultiviert. Das durch die Wechselwirkung vom CAR und FN zustande kommende Neuritenwachstum kann durch die Gabe von mCAR D2 aber auch von mCAR D1 122 in Abhängigkeit der Konzentration gehemmt oder verstärkt werden. **A** Tectale Neuronen bilden Neuriten und eine geringe Anzahl an Aggregaten. Durch Zugabe von 250 µg/mL mCAR D2 wird das Neuritenwachstum aber auch die Desaggregation gefördert. **B** mCAR D1 122 jedoch hemmt bei einer Konzentration von 500 µg/mL das Neuritenwachstum, die Aggregation und das Anhaften an das Substrat. mCAR D2 in einer Konzentration von 2 mg/mL hemmt ebenfalls das Neuritenwachstum und die Aggregation. Auch hier ist die Zahl der Zellen geringer. **C** Gemessene durchschnittliche Neuritenlängen pro Zelle pro Foto. Auf tectale Zellen hat Ad2 Fiber Knob C428N hier keine Neuriten-stimulierende Wirkung. mCAR D1 122 inhibiert Neuritenwachstum und mit zunehmender Konzentration sogar umso stärker. mCAR D2 fördert bei einer Konzentration von 250 µg/mL das Neuritenwachstum, hemmt es jedoch bei Konzentrationen von 1-2 mg/mL. Retinale Zellen zeigen ein analoges Bild, mCAR D1 122 schwächt leicht das Neuritenwachstum und mCAR D2 fördert es zunächst bei 250 µg/mL und dann nicht mehr bei 500 und 2000 µg/mL. Allerdings hat Ad2 Fiber Knob C428N in diesem Fall eine stark Neuriten-stimulierende Wirkung. Nach 48 h nimmt die durchschnittliche Neuritenlänge in Gegenwart von mCAR D2 (2 mg/mL) ab. **D** mCAR D1 122 und mCAR D2 inhibieren die Aggregation tectaler Neuronen nach 24 h und retinaler Neuronen nach 48 h. Ad2 Fiber Knob C428N hat auf tectale Zellen einen Aggregationsfördernden Effekt. **E** Die Zell-Matrix-Adhäsion wird durch mCAR D1 122 und mCAR D2 inhibiert. Alle gemessenen Werte wurden auf den unbehandelten Kontrollwert normalisiert. Lsg: Lösung. Maßbalken: 200µm

4.2.3.2 Die Bindung von FN-40-kDa an mCAR D2 wird durch die Anwesenheit von mCAR D1 122 nicht beeinflusst

Wird versucht, auf die Frage nach der möglichen Gleichzeitigkeit von homophiler und heterophiler Interaktion eine Antwort auf molekularer Ebene zu geben, so muss festgestellt werden, dass es unwahrscheinlich ist, dass beide Prozesse parallel zu einander möglich sind.

Ergebnisse

Bei Sedimentationsgleichgewicht-Analysen wurden das Fragment FN-40-kDa und mCAR D2 in einem bestimmten Verhältnis zusammengegeben, bei dem aufgrund gesonderter Sedimentationsgleichgewicht-Analysen bekannt ist, wie hoch die Konzentrationen an gebundenem mCAR D2-FN-40-kDa, ungebundenem FN-40-kDa und ungebundenem mCAR D2 ist. mCAR D1 122 wurde in steigenden Mengen hinzutitriert. Aus dem Ergebnis kann man entnehmen, dass keine Trimere (in der Form von FN-40-kDa-mCAR D2-mCAR D1 122) gebildet werden, da die Molmasse in dem Maße absinkt, wie es nicht hätte der Fall sein dürfen beim Auftreten von Komplexen aller drei Komponenten (Abb. 4.37). Was aber nicht ausgeschlossen werden kann (was sogar höchstwahrscheinlich ist), ist die zusätzliche Entstehung von mCAR D2-mCAR D1 122 Komplexen. Deren Einfluss auf die mittlere Molmasse der gesamten Probe wäre aber sehr gering, so dass es kaum ins Gewicht fallen würde.

Da keine Komplexbildung aus allen drei Proteinen gemessen werden kann, ist es legitim zu sagen, dass die heterophile Bindung vom CAR an FN-40-kDa und die homophile Bindung vom CAR (mittels D1-D2-Interaktion) sich einander ausschließen.

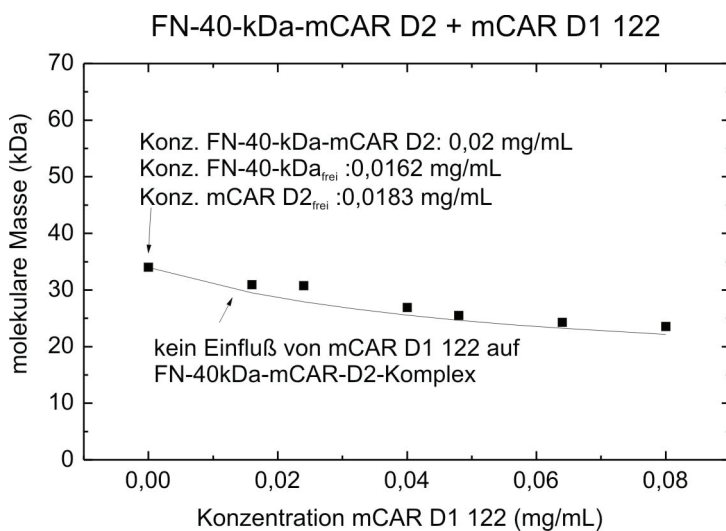


Abb. 4.37 mCAR D 122 bindet nicht an den mCAR D2-FN-40-kDa-Komplex. FN-40-kDa und mCAR D2 sind in einem Mischungsverhältnis vorgelegt, unter welchem die Konzentrationen des Komplexes sowie von freiem mCAR D2 und FN-40-kDa bekannt sind. In steigenden Mengen wurde mCAR D1 122 hinzugefügt. Was beobachtet wird, ist eine Abnahme der mittleren Molmasse der gesamten Probe in einem Maße, welches die Bildung eines Dreierkomplexes FN-40-kDa-mCAR D2-mCAR D1 122 höchst unwahrscheinlich erscheinen lässt (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke).

4.3 Interaktionen des zytoplasmatischen Segmentes vom CAR

Die bis hierhin untersuchte Funktion vom CAR umfasst adhäsive Vorgänge sowie eine wichtige Rolle bei der Bildung von Neuriten und axonalem Wachstum. Da bei diesen Prozessen auch eine Reorganisation des Zytoskeletts nötig ist, sollte hier die Möglichkeit geprüft werden, ob CAR mit zytoskelettalen Komponenten interagiert.

4.3.1 Das zytoplasmatische Segment vom CAR bindet an α -Actinin und Profilin-1

Um Bindungspartner vom CAR auf der zytoplasmatischen Seite zu identifizieren, wurden drei verschiedene CAR-Konstrukte bakteriell hergestellt und gereinigt, welche lediglich die zytoplasmatische Sequenz vom CAR der jeweiligen Spezies oder Isoform enthält (chCAR_{cyt}SIV (bislang einzige Isoform von *Gallus gallus*), mCAR_{cyt}SIV und mCAR_{cyt}TVV (4.1.1.4), und mittels Sedimentationsgleichgewicht-Analysen mit verschiedenen möglichen Interaktionspartnern untersucht.

Dabei zeigte sich zunächst, dass es keine konzentrationsabhängige Änderung der Molmassen bei allen drei Konstrukten gibt (Abb. 4.38 A-C). Für mCAR_{cyt}SIV beispielsweise bleibt die Molmasse bis zu einer Konzentration von 600 $\mu\text{g/mL}$ konstant gleich der Masse des Monomers.

Ebenfalls allen drei Konstrukten gemeinsam ist die Bindung an das Aktin-bindende Protein α -Actinin, mit Affinitäten, die im μM -Bereich liegen (Abb. 4.38 D-F). Obwohl α -Actinin ein Dimer ist, bindet unter den getesteten Bedingungen ein Dimer nicht mehr als ein zytoplasmatisches CAR-Konstrukt, was entweder bedeutet, dass die Konzentrationen nicht den Sättigungsbereich erreicht haben oder es tatsächlich nur eine Bindungsstelle gibt. CAR hat somit ähnliche Bindungspartner wie die Integrine $\alpha_3\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$, welche bislang als α -Actinin-bindende FN-Rezeptoren bekannt sind (Geiger et al., 2001).

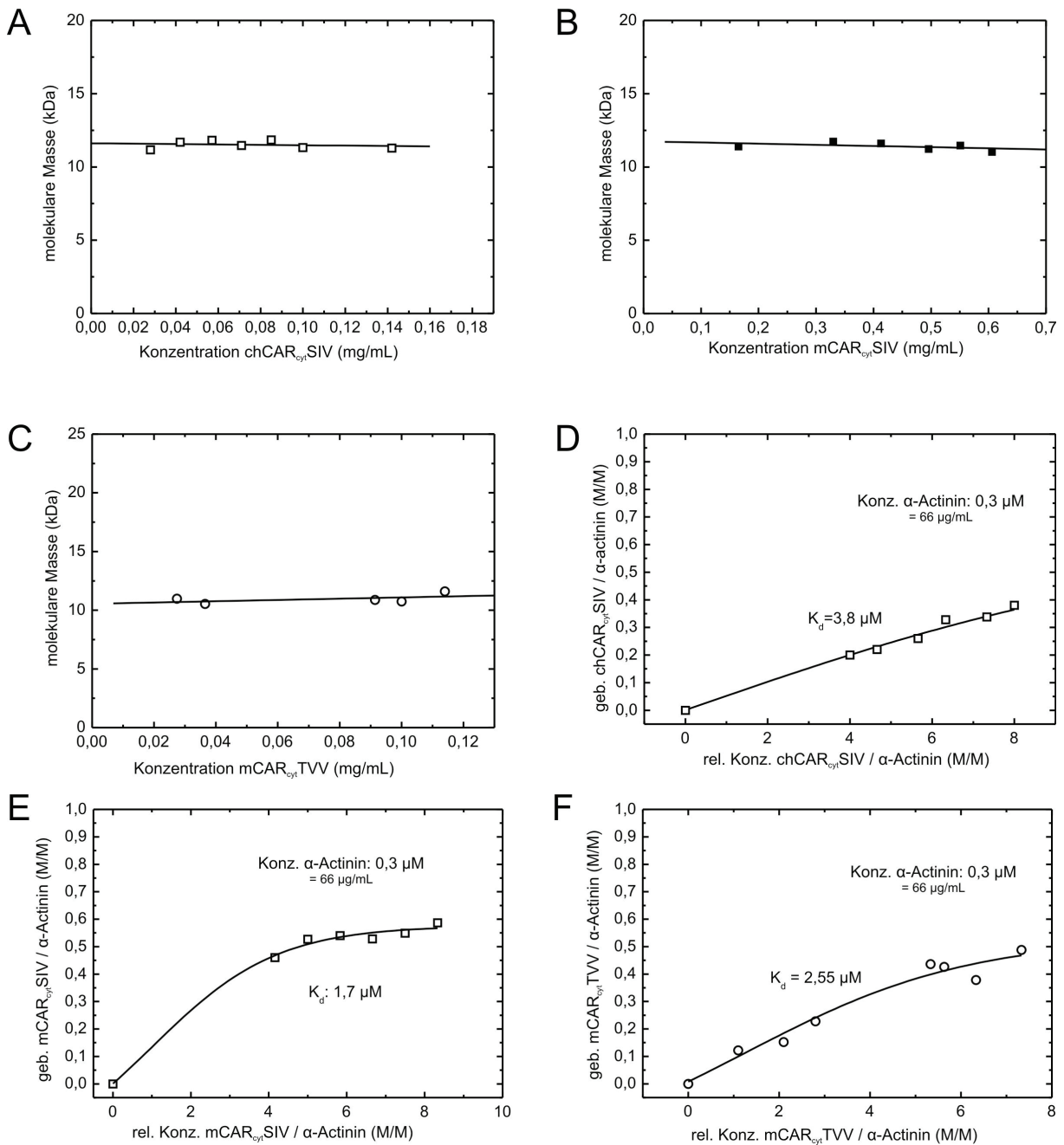
Zusätzlich konnte eine Bindung von mCAR_{cyt}SIV an Profilin-1 nachgewiesen werden, welches auch zu den Aktin-bindenden Proteinen gehört (Abb. 4.38 G).

Bedauerlicherweise konnten die Möglichkeiten von Bindungen direkt an Aktin oder das α - und β -Tubulin-Heterodimer nicht geprüft werden, da diese Proteine in der Präsenz von mCAR_{cyt}SIV zu aggregieren beginnen und im Laufe der Zentrifugation pelletiert werden.

Ergebnisse

Trotzdem könnte diese Tatsache ein Indiz dafür sein, dass CAR an diese Zytoskelettkomponenten bindet und sie veranlasst Aktin-Filamente oder Mikrotubuli zu bilden. Es wurde bereits mit anderen Methoden eine Interaktion vom CAR zu Tubulin oder Aktin beschrieben (Fok et al., 2007; Huang et al., 2007).

Keinerlei Bindung oder Aggregationseffekte konnten gemessen werden bei Sedimentationsgleichgewicht-Analysen von mCAR_{cyt}SIV an BSA, an $\alpha 2$ -Neurexin_{cyt} oder mCAR_{cyt}TVV (Tab. 4.4). Bei allen drei Experimenten konnte trotz mindestens vierfachen molaren Überschusses an mCAR_{cyt}SIV keine Komplexbildung nachgewiesen werden.



Ergebnisse

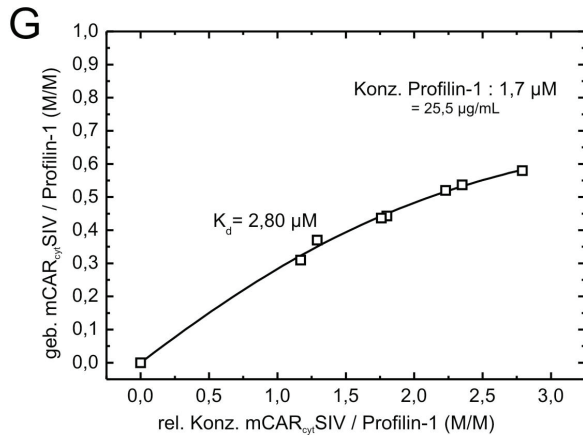


Abb. 4.38 Zytoplasmatischer CAR bindet an Komponenten des Aktin-Zytoskeletts. Bindungskurven von Sedimentationsgleichgewicht-Analysen (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke). **A** Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung von chCAR_{cyt}SIV. Bis zu 140 µg/mL ist kein Zuwachs der Molmasse zu verzeichnen. **B** Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung von mCAR_{cyt}SIV. Bis zu 600 µg/mL findet kein Zuwachs der Molmasse statt. **C** Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung von mCAR_{cyt}TVV. Bis zu 115 µg/mL ist kein Zuwachs der Molmasse zu messen. **D** chCAR_{cyt}SIV bindet das α -Actinin-Dimer. Ein Dimer bindet nicht mehr als ein chCAR_{cyt}SIV. ch α -Actinin wurde einer Konzentration von 0,3 µM vorgelegt und chCAR_{cyt}SIV in steigenden Mengen hinzugegeben. **E** mCAR_{cyt}SIV bindet das α -Actinin-Dimer. Ein Dimer bindet nicht mehr als ein mCAR_{cyt}SIV. ch α -Actinin wurde mit 0,3 µM vorgelegt und mCAR_{cyt}SIV in steigenden Mengen hinzugegeben. **F** mCAR_{cyt}TVV bindet das α -Actinin-Dimer. Ein Dimer bindet nicht mehr als ein mCAR_{cyt}TVV. ch α -Actinin wurde einer Konzentration von 0,3 µM vorgelegt und mCAR_{cyt}TVV in steigenden hinzugegeben. **G** mCAR_{cyt}SIV bindet Profilin-1. Profilin-1 wurde in einer Konzentration von 1,7 µM vorgelegt und mCAR_{cyt}SIV in steigenden Mengen hinzutitriert.

K_d	mCAR _{cyt} SIV	mCAR _{cyt} TVV
mCAR _{cyt} SIV	keine Sa.	
mCAR _{cyt} TVV	keine Sa.	
ch α -Actinin	$1,7 \times 10^{-6}$	$2,55 \times 10^{-6}$
bProfilin-1	$2,8 \times 10^{-6}$	
BSA	keine Bngd.	keine Bngd.
$\alpha 2$ -Neurexin cyt.	keine Bngd.	keine Bngd.
b $\alpha + \beta$ Tubulin	aggregiert	
bActin	aggregiert	

Tab. 4.4 Zusammenfassung der K_d -Werte [M] der Interaktionen des zytoplasmatischen Segments vom CAR aus Sedimentationsgleichgewicht-Analysen. Keine Bindung konnte gemessen werden, zwischen mCAR_{cyt}SIV und mCAR_{cyt}TVV, zwischen mCAR_{cyt}SIV und $\alpha 2$ -Neurexin_{cyt} sowie zwischen mCAR_{cyt}SIV und BSA. Trotz eines mindestens vierfachen molaren Überschusses an mCAR_{cyt}SIV konnte eine Komplexbildung nicht erwiesen werden. Die Untersuchung einer eventuellen Bindung von mCAR_{cyt}SIV an bAktin oder b $\alpha + \beta$ -Tubulin konnte nicht erfolgen, da diese Proteine in der Gegenwart von mCAR_{cyt}SIV zu präzipitieren beginnen, obwohl sie vorher in den Einzelläufen jeweils eine konstante Molmasse gezeigt haben. Sa.= Selbstassoziation; Bngd.= Bindung.

4.3.2 Gelfiltration zeigt eine Bindung vom zytoplasmatischen CAR und α -Actinin

Die Bindung von mCAR_{cyt}SIV an ch α -Actinin wurde per Gelfiltration auf der Säule Superose 6 PC 3.2/30 untersucht. Dazu wurden die Proteine erst einzeln und dann in einem Mischlauf auf die Säule injiziert (Injektionsvolumen: 20 μ L). Die Konzentrationen waren 2 mg/mL für mCAR_{cyt}SIV und 600 μ g/mL für ch α -Actinin. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen per SDS-PAGE untersucht (Abb. 4.39). Man sieht eine schwache Wechselwirkung der Moleküle. Das Absorptionsmaximum von mCAR_{cyt}SIV verschiebt sich in Anwesenheit von ch α -Actinin um etwa eine Fraktion nach vorne (Fraktionsgröße 50 μ L bei 2,4 mL Säulenvolumen): von Fraktion 25 auf Fraktion 24. Eine ko-Elution der beiden Proteine ist nicht zu sehen, was dafür spricht, dass die Kinetik der Wechselwirkung einen stabilen Komplex bis zum Ende des Gelfiltrationslaufes nicht zulässt.

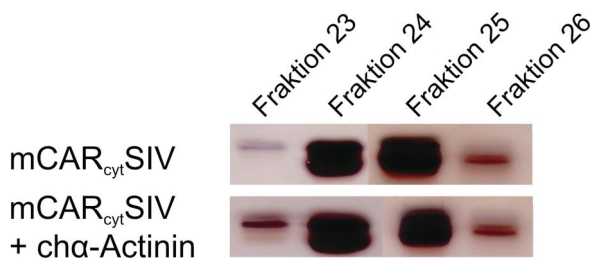


Abb. 4.39 Schwache Interaktion von mCAR_{cyt}SIV mit ch α -Actinin mittels Gelfiltration (mit Superose 6 PC 3.2/30). 15 % SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Silbernitratfärbung. Fraktionsgröße: 50 μ L Säulenvolumen: 2,4 mL. In Anwesenheit von α -Actinin verschiebt sich das Absorptionsmaximum von mCAR_{cyt}SIV von Fraktion 25 auf Fraktion 24. Auch die Bande in Fraktion 23 wird kräftiger.

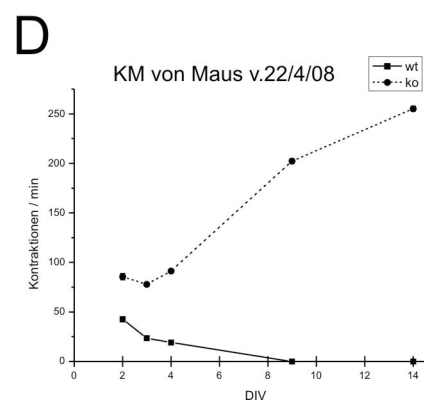
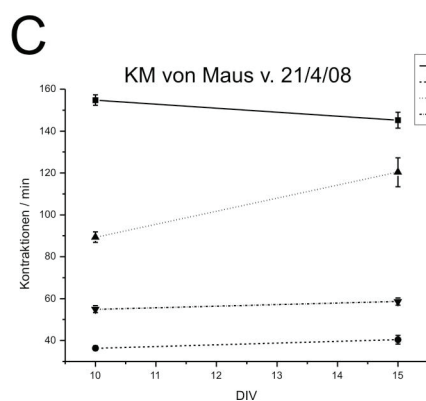
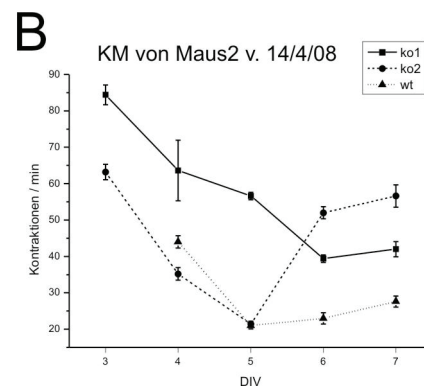
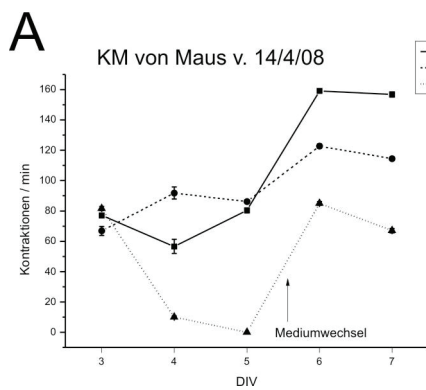
4.4 Das Fehlen vom mCAR führt zu Erhöhung der Kontraktilität in embryonalen Kardiomyozyten

Während der Kultivierung von embryonalen Maus-Kardiomyozyten konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden: die Kontraktionsfrequenz *in vitro* mCAR-defizienter Kardiomyozyten ist gegenüber dem Wildtyp und heterozygoten Zellen erhöht. Nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer wurde die Anzahl der Kontraktionen/min gezählt. Dies geschah in einem so genannten live-imaging Mikroskop (37° C und 5 % CO₂). Es wurden die Kontraktionen der sich im Verbund befindlichen sowie auch einzelner Kardiomyozyten ge-

Ergebnisse

zählt. Allerdings ist die Messung einzeln vorliegender Zellen nur eingeschränkt möglich, da die Zellen häufig den Kontakt untereinander benötigen, um zu kontrahieren. Bei nahezu allen hier dargestellten Messungen zeigte sich eine deutlich stärkere Kontraktilität der mCAR-defizienten Kardiomyozyten (Abb. 4.40). Die Schlagfrequenz nimmt durch das Fehlen vom mCAR zu. Auch die einzeln vorliegenden Kardiomyozyten, die auswertbar waren, bestätigen diesen Unterschied, was höchstwahrscheinlich eine veränderte Kopplung der Zellen durch „gap junctions“ ausschließt. Auch die Möglichkeit eines veränderten Metabolismus wurde durch Mediumwechsel geprüft, was dazu führt, dass die Schlagfrequenz der Zellen sich erhöht, allerdings unabhängig vom Genotyp.

Worauf diese erhöhte Schlagfrequenz bei Abwesenheit vom CAR zurückgeführt werden kann, ist gegenwärtig nicht zu beantworten. Denkbar ist, dass eine verminderte homophile oder heterophile Adhäsion / Bindung der Kardiomyozyten zur Störung der Schlagfrequenz führt.



Ergebnisse

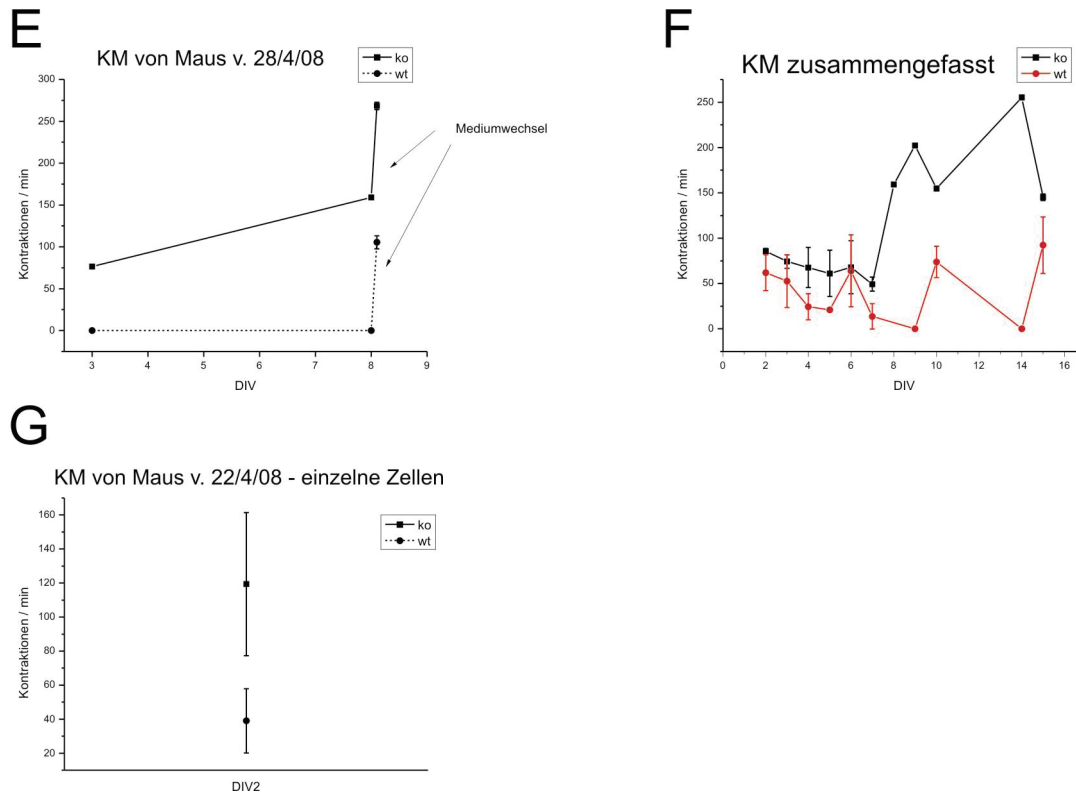


Abb. 4.40 Embryonale mCAR-defiziente Kardiomyozyten kontrahieren häufiger als Wildtyp oder heterozygote Kardiomyozyten. Dissoziierte Kardiomyozytenkulturen verschiedener Embryonen (E10,5) aus mehreren trächtigen Weibchen wurden auf FN beschichteten Kulturschalen in DMEM / 10 % FCS kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die deutlich sichtbaren Kontraktionen der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ gezählt. Jeder hier aufgetragene Wert entspricht dem Mittelwert aus fünf aufeinander folgenden Messungen. Da jedes Herzchen auf die identische Anzahl an Kulturschalen ausgesät wurde, ist eine unterschiedliche Zellzahl unwahrscheinlich, da die Größe der entnommenen Herzchen (visuell betrachtet) nicht unterschiedlich war. **A** bis **E** Kardiomyozyten von Embryonen von fünf trächtigen Weibchen wurden an verschiedenen Tagen ausgewertet. Bei **A** und **E** wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Zellkulturmedien erneuert, was zu einem generellen vom Genotyp unabhängigen Anstieg der Kontraktionsfrequenz führt. **F** Die Kontraktionsfrequenzen aus **A** bis **E** sind hier zusammengefasst. Die mCAR-defizienten Kardiomyozyten schlagen schneller. **G** Je fünf einzeln vorliegende und trotzdem kontrahierende Kardiomyozyten aus zwei Kulturen wurden gezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Die Schwankungen sind groß, aber trotzdem schlagen auch hier die mCAR-defizienten Kardiomyozyten schneller. DIV: Tage *in vitro*

5 Diskussion

5.1 CAR ist ein homophiles Zelladhäsionsmolekül

Unter anderem konnte in dieser Arbeit dargelegt werden, dass CAR ein selbstassoziierendes Molekül ist. Jedenfalls sprechen einige Indizien dafür: CAR-negative CHO und NIH 3T3 Zellen verklumpen, wenn sie mit CAR transfiziert werden. CAR-defiziente Neuronen aggregieren weniger stark als Wildtyp Neuronen auf einer FN-40-kDa-Matrix. Antikörper-Perturbationen gegen CAR blockieren ebenfalls die Aggregation von Neuronen auf einer FN40-kDa-Matrix. Aber auch andere Adhäsionsversuche mit löslichen CAR-Domänen oder Ad2 Fiber Knob deuten auf eine homophile Aktivität vom CAR hin. Tectale Neuronen sind in der Lage an immobilisiertes mCAR D1 122 zu adhären bzw. HeLa Zellen an chCAR-Fc. Chemisch vernetztes embryonales Gehirn-Homogenat bzw. embryonale Retinae zeigen, dass CAR überwiegend mit CAR vernetzt ist. Bindungsversuche mittels analytischer Ultrazentrifugation und Gelfiltration haben ergeben, dass rekombinantes extrazelluläres CAR in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vorliegt. Kristallographische Studien haben ergeben, dass mCAR_{extra} als Dimer vorliegt. Zudem belegen auch von anderen veröffentlichte Studien zu CAR-verwandten Proteinen, dass es sich z.B. bei CLMP (Raschperger et al., 2004), BT-IgSF (Harada et al., 2005) und Proteinen aus der JAM-Familie um homophile Zelladhäsionsmoleküle handelt (Mandell und Parkos, 2005; Mirza et al., 2006). Auch die klassischen IgSF-Mitglieder NCAM und L1 wurden als trans-homophil beschrieben (Johnson et al., 2004; Grumet und Edelman, 1988).

Untersucht man die hier gezeigten Ergebnisse im Detail, so ist es auch möglich Gegenargumente zu dieser Interpretation anzuführen; nämlich, dass CAR-transfizierte CHO und NIH 3T3 Zellen nicht über eine direkte CAR-CAR-Interaktion aggregieren, sondern CAR an einen anderen Zellrezeptor bindet bzw. dimere ECM-Glycoproteine als Brücke verwendet. Wenn man die Aggregationsversuche von anderen (Honda et al., 2000; Raschperger et al., 2004) in Betracht zieht, dann kann letzteres zumindest nicht ausgeschlossen werden, da diese Versuche (ebenfalls an CAR-transfizierten CHO Zellen durchgeführt) immer in Anwesenheit von Serum vorgenommen wurden, das dem Medium zugesetzt wurde. Serum enthält nun diese CAR-bindenden ECM-Glycoproteine wie dimeres Fibulin-1 und dimeres FN (Vuento und Vaheri, 1979; Timpl et al., 2003), von denen hier gezeigt wurde, dass sie mehr als einen CAR binden können (4.2.2.2). Allerdings sind die in dieser Arbeit

Diskussion

gezeigten Aggregationsversuche immer in Abwesenheit von Serum vorgenommen worden, wobei durch Ablösen der Zellen mit PBS / EDTA (1mM) und mehrere Waschschrte sichergestellt wurde, dass keine Serumproteine mehr vorhanden sind. Trotzdem aggregieren die Zellen. Außerdem haben Western Blot Analysen sowie Immunfluoreszenzfärbungen kein FN in oder an CHO Zellen nachweisen können (Patzke, unpublizierte Beobachtung). Allerdings muss erwähnt werden, dass dies für die fibroblastenartigen NIH 3T3 Zellen nicht zutrifft. Diese exprimieren FN. Es ist aber trotzdem legitim, davon auszugehen, dass die verstärkte Aggregation nicht auf eine CAR-FN-Wechselwirkung zurückzuführen ist, da andersherum betrachtet, es sich bisher in keinem Versuch gezeigt hat, dass die Expression vom CAR Bedingung für die Adhäsion an FN ist. Weder adhären CAR-defiziente Neuronen zahlenmäßig schlechter an FN-40-kDa als Wildtyp Neuronen (4.2.2.5), noch ist es der Fall, dass CAR-transfizierte CHO und NIH 3T3 Zellen besser oder schneller an einer FN-Matrix anhaften (hier nicht dokumentierte Beobachtung). Ganz im Gegenteil ist es eher so, dass CAR-positive Zellen (wie HeLa Zellen) an rekombinantes chCAR-Fc zu adhären eher in der Lage sind, wenn sich keine dimeren ECM-Proteine (wie Fibulin-1) in Lösung befinden (Abb. 4.25). Des Weiteren adhären tectale Neuronen auf einer mCAR D1 122-Matrix, obwohl FN nicht an D1 binden kann. Nach der aktuellen Datenlage besteht also eine Berechtigung anzunehmen, dass die durch CAR-vermittelte homophile Zelladhäsion nicht durch Brücken von ECM-Glycoproteinen bewerkstelligt wird, sondern einer direkten Interaktion geschuldet ist.

Allerdings bleibt die Möglichkeit, dass ein zusätzlicher Rezeptor auf den CHO, NIH 3T3 Zellen und Neuronen die homotypische Aggregation bzw. die Adhäsion von HeLa Zellen auf chCAR-Fc vermittelt. Die Frage, ob CAR an einen anderen Rezeptor als FN bindet, kann nicht abschließend beantwortet werden. Obwohl es möglich ist, mehrere CAR-Moleküle im neuronalen Gewebe chemisch direkt miteinander zu vernetzen, kann das Vorhandensein eines anderen Rezeptors nicht ausgeschlossen werden. Die Aussage der chemischen Vernetzung ist zum einen durch die Spacer-Armlänge limitiert und zum anderen ist es ungewiß, ob die Vernetzung CAR zwischen Membranen oder in der gleichen Plasmamembran erfolgt. Außerdem muss erwähnt werden, dass nicht auszuschließen ist, dass die Transmembrandomäne ebenfalls eine homodimerisierende Funktion hat, wie es vermutlich bei den Syndecanen der Fall ist (Reizes et al., 2008).

Dass diese physikalische Interaktion möglich ist und welche Voraussetzungen erfüllt sein müssen, damit sie stattfindet, ist aus den hier dargestellten Bindungsversuchen zu entnehmen (4.2.1.6-4.2.1.9). Obwohl auch diese Versuche kritisiert werden können: Die Ver-

wendung „nackter“ aus ihrem zellulären Kontext herausgelöster Moleküle könnte auch neue Eigenschaften generieren.

CAR ist mit hoher Wahrscheinlichkeit selbstassoziierend. Ob jedoch CAR-Interaktionen mit hier nicht-identifizierten Rezeptoren die homotypische Zell-Aggregation ermöglicht, kann nicht ausgeschlossen werden.

5.2 CAR ist aufgrund seiner N-Glycosylierung(en) vermutlich trans-homophil oder D1 bindet an D2

Die Art der Selbstassoziation vom CAR ist ein sehr komplexes Thema und bedarf einer detaillierten Betrachtung: Wie bereits erwähnt, belegen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente auf verschiedenen Ebenen, dass CAR mit seinen extrazellulären Domänen an sich selbst binden kann. Auf zellulärer Ebene jedoch ist die Selbstassoziation aufgrund der Möglichkeit weiterer CAR-Rezeptoren schwierig zu betrachten. Es erhebt sich die Frage, ob diese Selbstassoziation in der Plasmamembran der gleichen Zelle erfolgt oder ob sie zwischen Zellen (zwischen zwei Plasmamembranen) stattfindet und damit zur homotypischen Aggregation der Zellen beiträgt. Diese Frage kann hier nicht abschließend geklärt werden. Es sprechen jedoch einige Indizien für letzteres:

Wie gezeigt werden konnte, ist rekombinant exprimierter extrazellulärer CAR nur dann in der Lage an sich selbst zu binden, wenn er N-glycosyliert ist. Die N-Glycosylierung begünstigt vermutlich eine Konformation im CAR-Polypeptid, die eine Selbstassoziation erlaubt oder fördert. (Nur nebenbei erwähnt: Dass die N-Glycosylierung selbst zur Selbstassoziation beiträgt (CAR als Lektin) ist unwahrscheinlich, da auch bakteriell hergestelltes mCAR D2 an mCAR D1 122 binden kann.) Auch andere Autoren konnten einen Zusammenhang zwischen N-Glycosylierung der extrazellulären Domänen und der Selbstassoziation herstellen (Excoffon et al., 2007). Diese Autoren beobachteten eine weniger starke Aggregation von CAR-transfizierten CHO Zellen, wenn Punktmutationen im CAR eine N-Glycosylierung verhindern.

Auf Proteinebene muss diese Aussage jedoch relativiert werden. Bei hohen Konzentrationen zeigen die extrazellulären Domänen vom CAR auch im unglycosylierten Zustand Dimere. Es ist nämlich genau darauf zu achten, welche Proteinkonzentrationen eingesetzt werden, um die CAR-Selbstassoziation zu belegen. Bei niedriger Konzentration (bis 220 µg/mL also etwa 10 µM) ist mCAR_{extra} und chCAR_{ohne Fc degl} im monomeren Zustand.

Diskussion

mCAR_{ohne Fc} und chCAR_{ohne Fc} hingegen liegen in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor. Erhöht man jedoch die Konzentration, wie es bei der Gelfiltration der Fall war (Abb. 4.22 B) auf 1,2 mg/mL (also etwa 50 μ M) oder in einem noch höheren Maße, wie es bei der Kristallisation der Fall ist, dann bilden sich auch hier im unglycosylierten Zustand Dimere, die über eine D1-D1-Wechselwirkung mit einander verbunden sind. Mögliche Erklärungen könnten lauten: Die D1-D1-Wechselwirkung wird durch die N-Glycosylierung in D2 (zumindest bei chCAR: dieser verfügt im Gegensatz zum Säuger-CAR nicht über ein Glycosylierungs-Motiv in der D1-Domäne) begünstigt, oder die Selbstassoziation von glycosyliertem und unglycosyliertem extrazellulärem CAR unterscheiden sich grundlegend von einander; z. B. so, dass glycosyliertes CAR über D1-D2-Wechselwirkungen selbstassoziiert.

Für letzteres gibt es wiederum Hinweise: Betrachtet man das hydrodynamische Verhalten von mCAR D1 122 und mCAR D2, so sind auf den ersten Blick drei Eigenarten zu erkennen: obwohl mCAR D1 122 unglycosyliert ist, ist es selbstassoziiierend, mCAR D1 122 und mCAR D2 binden aneinander, obwohl beide Proteine unglycosyliert sind, und mCAR D1 213 ist sogar ein stabiles Dimer.

Zum ersten Punkt kann man sagen, dass es sich hierbei wie bei mCAR_{extra} um einen Konzentrationseffekt handelt. Denn bei niedrigen Konzentrationen (bis ca. 130 μ g/mL also etwa 10 μ M) ist auch hier keine Dimerisierung zu sehen (Beobachtung von Joachim Behlke). Erst bei hohen Konzentrationen bis 1,3 mg/mL (also etwa 100 μ M) wird ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht erkennbar. Auch van Raaij et al. (2000) verwenden Konzentrationen bis 1 mg/mL für ihre Sedimentationsgleichgewicht-Analysen der rekombinaten D1-Domäne. Der Schluss liegt also nahe, dass auch die Dimerisierung von mCAR_{extra} nichts anderes ist als diese mCAR D1 122-Selbstassoziation, die nur unter hohen Konzentrationen stattfindet. Hingegen ist die Selbstassoziation von mCAR_{ohne Fc} oder chCAR_{ohne Fc} auch etwas, das bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen stattfindet.

Daraus ergibt sich gleich die Erklärung des zweiten Punktes: die viel wahrscheinlichere Variante einer CAR-Selbstassoziation ist die Bindung von D1 an D2. Genauer gesagt: D1 eines mCAR_{ohne Fc} bindet an das D2 eines anderen mCAR_{ohne Fc} und das ganze sogar doppelt, da beide Domänen in einem Dimer doppelt vorhanden sind. Diese Vermutung wird durch das Ergebnis, dass mCAR D1 122 an mCAR D2 bindet untermauert, denn die Affinität dieser Bindung ist etwa 20mal höher als die Affinität der mCAR D1 122-Selbstassoziation und läuft auch bei niedrigen Konzentrationen ab (bei 2,8 μ M mCAR D1 122 und 6 μ M mCAR D2 sind ca. 50 % der mCAR D1 122-Bindungsstellen besetzt). Dieses Ergebnis ist auch bei anderen Proteinen der IgSF gezeigt worden: z.B. bei N-CAM und JAML. Die D1-Domäne vom CAR

Diskussion

bindet an die D2-Domäne von JAML. Im Falle von NCAM konnte gezeigt werden, dass auch eine antiparallele Selbstassoziation vermittelt über die 1. und 2. Ig-Domäne stattfinden kann (Zen et al., 2005; Johnson et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung des dritten Punktes kann also lauten: die vier zusätzlichen Aminosäuren von mCAR D1 213, die laut Röntgen-Kristallstrukturaufklärung schon zu D2 gehören, bewirken eine Stabilisierung des mCAR D1 213-Dimers, da sie eventuell einen Teil der D1-Bindungsstelle von D2 enthalten. Außerdem wurde hierbei eine andere Eigenschaft deutlich, nämlich dass das mCAR D1 213-Dimer kein mCAR D2 binden kann, dass also D1-Dimerisierung und D1-D2-Bindung sich gegenseitig auszuschließen scheinen. Obwohl auch hierbei höchste Vorsicht geboten ist, denn welcher Natur die Dimerisierung des mCAR D1 213 ist, konnte bislang nicht gezeigt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich auch hierbei um eine Art D1-D2-Interaktion handelt.

Um nun die Frage zu klären, welchen Einfluss die Glycosylierung auf die Fähigkeit vom CAR zur Selbstassoziation hat, kann man antworten: Die Glycosylierung der extrazellulären Domänen vom CAR macht höchstwahrscheinlich eine Dimerisierung von D1 an D2 erst möglich. Oder anders formuliert: wenn intaktes extrazelluläres CAR betrachtet wird, dann ist D2 nur dann homophil aktiv, wenn es N-glycosyliert ist. Es ist also davon auszugehen, dass die Selbstassoziation von mCAR_{extra} und mCAR_{ohne Fc} (oder chCAR_{ohne Fc}) sich grundlegend darin unterscheiden, dass erstere nur eine D1-D1-Wechselwirkung zeigt und letztere auf zwei D1-D2-Wechselwirkungen beruht. Anders kann die Bindung von mCAR D1 122 an mCAR D2 nur unzureichend erklärt werden.

Die eigentliche Frage lautet nun also: In welchem Zustand liegt der native CAR im Nervensystem vor? Da gezeigt werden konnte, dass affinitätsgereinigter nativer chCAR N-glycosyliert bzw. höchstwahrscheinlich Glycosylierungen trägt, die ausnahmslos durch PNGaseF abspaltbar sind, kann angenommen werden, dass CAR im Gewebe vorzugsweise über eine D1-D2 Bindung dimerisiert, wenn er dimerisiert. D1-D2-Interaktionen wiederum sprechen sehr deutlich für eine Selbstassoziation vom CAR zwischen Zellen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es auch im Gewebe zu D1-D1 Interaktionen kommt.

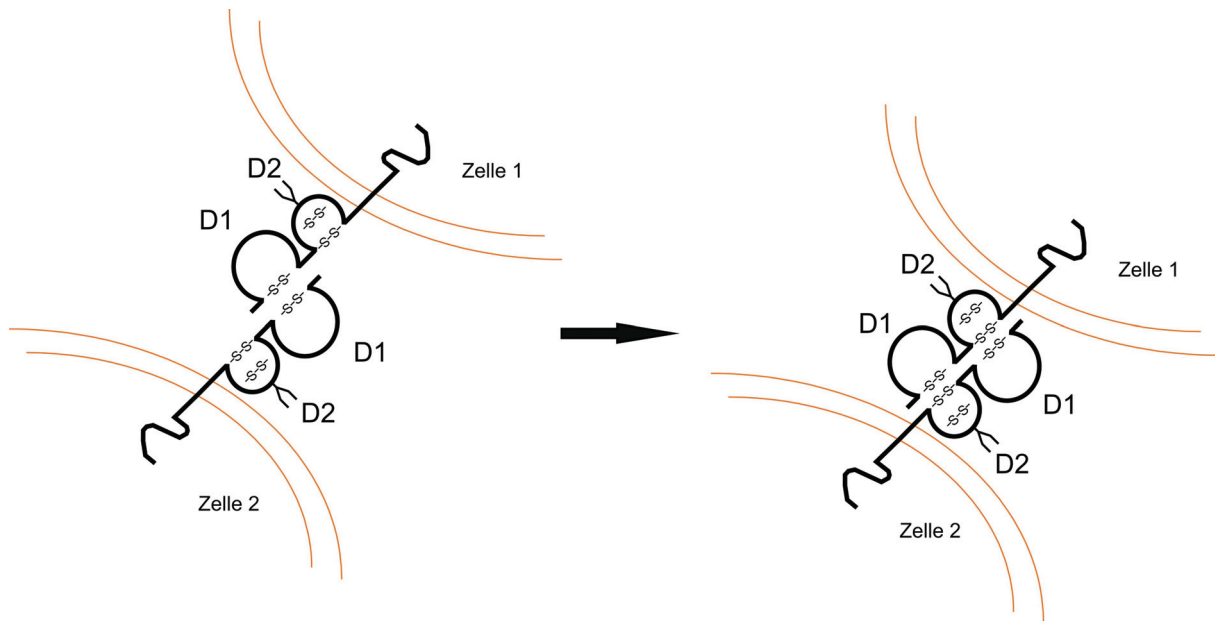


Abb. 5.1 Schematische Darstellung einer möglichen trans-homophilen Interaktion vom CAR zweier benachbarter Zellen. Aufgrund der Bindungsdaten dieser Arbeit ist eine D1-D2 vermittelte Assoziation wahrscheinlicher als eine D1-D1 vermittelte trans-Bindung.

5.3 CAR ist ein heterophiles Zelladhäsionsmolekül

Verschiedene in dieser Arbeit durchgeführte Versuche haben gezeigt, dass der extrazelluläre Anteil vom CAR mit dem ECM-Glycoprotein FN interagieren kann. Höchstwahrscheinlich ist dafür die D2-Domäne vom CAR ausreichend. Des Weiteren wurde auch die CAR-Bindungsregion von FN auf ein 283 AS großes Fragment eingegrenzt, das die sogenannte zweite Heparinbindungsdomäne enthält. Dieses, die FN III-Domänen 12-14 umfassende, Segment besitzt eine hoch affine Heparinbindungsstelle (Benecky et al., 1988; Ingham et al., 1990) und ist beschrieben worden für seine Neuriten-fördernde Funktion (Rogers et al., 1985) die zum Teil verloren geht, sobald CAR auf der Zelloberfläche embryonaler Neuronen fehlt oder durch Antikörper blockiert wird (4.2.2.5). CAR und FN stellen somit ein neues Rezeptor-Liganden-System dar, das im sich entwickelnden Nervensystem für das Wachstum von Axonen und Neuriten mitverantwortlich zu sein scheint.

FN ist ein Glycoprotein, welches bis auf einige Spleißvarianten als Dimer auftritt, bestehend aus etwa zwei gleich großen ca. 250-kDa-Untereinheiten, die nahe bei ihren C-Termini über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Sakisaka und Takai, 2005; Leiss et al., 2008; White et al., 2008; Pankov und Yamada, 2002). FN-defiziente Mäuse sterben etwa am E8,5 aufgrund von Entwicklungsdefekten im Mesoderm, Neuralrohr und der Blutge-

Diskussion

fäße. Sie besitzen eine verkürzte anterior-posterior Achse, entwickeln keine Mesoderm-abgeleiteten Strukturen wie Notochord und Somiten, bilden ein abnormes Herz sowie Blutgefäße, was alles mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ein Defizit in der mesodermalen Schicht zurückzuführen ist. Das Neuralrohr ist geknickt. Primitive Erythrozyten entwickeln sich, wohingegen Blutgefäße dies nicht tun, was ein Hinweis darauf ist, dass FN keine Funktion bei der Hämatopoiese hat, aber zur Bildung von Blutgefäßen beiträgt (George et al., 1993). FN kommt im Plasma (300 µg/mL) und anderen Körperflüssigkeiten vor. Gemessen an seiner Löslichkeit wird es in zwei Formen unterteilt: lösliches Plasma-FN (pFN) und weniger lösliches zelluläres FN (cFN) (White et al., 2008; Pankov und Yamada, 2002; Leiss et al., 2008). Alle in dieser Arbeit unternommenen Bindungsexperimente wurden ausschließlich mit pFN oder pFN-Fragmenten durchgeführt. pFN wird hauptsächlich in der Leber von Hepatozyten gebildet. Die alternativen Spleiß-Domänen EDA und EDB kommen darin nicht vor. cFN kommt in Abhängigkeit des Zelltyps in sehr viel mehr Spleiß-Varianten vor (Pankov und Yamada, 2002; White et al., 2008; Leiss et al., 2008). Eine gezielte genetische Inaktivierung des pFN zeigt, dass es für die Heilung von Hautwunden nicht erforderlich ist, da dessen Funktion durch cFN kompensiert zu werden scheint. Im Nervensystem aber verhindert pFN die Apoptose von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen, nach Gehirnverletzungen durch fokale Ischämien (Sakai et al., 2001). Außerhalb des Plasmas wird ein Teil der extrazellulären Matrix durch Fibrillogenese gebildet. Durch Bindung von FN an zelluläre Rezeptoren wird das Molekül unter dem Einfluss von Spannkraft gedehnt bzw. in seiner Konformation verändert, so dass verborgene Oligomerisationsmotive innerhalb einiger FN III-Domänen entstehen, die aus löslichem FN unlösliche Fibrillen-Netzwerke werden lassen (Geiger et al., 2001). Im Nervensystem kommt FN überwiegend in der Cerebrospinalflüssigkeit sowie in basalen Laminae z.B. am vitreoretinalen Übergang (Hiscott et al., 1992) vor. Außerdem wird es von Gliazellen exprimiert (Kavinsky und Garber, 1979; Yoshida und Takeuchi, 1991; Tom et al., 2004), wie z.B. der Radialglia (Stettler und Galileo, 2004). Es ist also denkbar, dass eine CAR-FN-Interaktion an diesen Loci durch adhäsive Prozesse zum Wachstum von Axonen und Neuriten sowie neuronaler Migration beiträgt.

Zu den bisher bekannten zellulären FN-Rezeptoren gehören vor allem eine Reihe von Integrinen, denen verschiedene Bindungsmotive aus der Sequenz von FN zugeordnet werden konnten: PHSRN in FN III₉ für $\alpha 5\beta 1$, RGD in FN III₁₀ für $\alpha 5\beta 1$, LDV in der V-Region für $\alpha 4\beta 1$ oder $\alpha 4\beta 7$, REDV in der V-Region für $\alpha 4\beta 1$ oder $\alpha 4\beta 7$, KLDAPT in FN III₅ für $\alpha 4\beta 1$, IDAPS in FN III₁₄ für $\alpha 4\beta 1$ und EDGIHEL in EDA für $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 9\beta 1$ (Pankov und Yamada, 2002). Außerdem wurden auch den Peptiden WQPPRARI eine „focal-adhesion“-fördernde

Diskussion

(Woods et al., 1993) und KNNQKSEPLIGRKKKT eine Neuriten-fördernde Funktion zugeschrieben (Drake et al., 1993). Die in dieser Arbeit identifizierte FN-Sequenz, welche die CAR-Bindungsstelle enthält, umfasst von diesen Integrin-Motiven IDAPS sowie die zwei zuletzt genannten Peptide.

Neben CAR und dem Integrin $\alpha 4\beta 1$ ist die zweite Heparinbindungsdomäne von FN auch in der Lage an einen weiteren zellulären Rezeptor zu binden, nämlich an das Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG) Syndecan-4 (dessen Parallelen zu CAR weiter unten erörtert werden) (Peterson et al., 2005; Saoncella et al., 1999; Sharma et al., 1999). Heparin kommt im tierischen Gewebe vor allem in Form von HSPG vor, die mit solchen Heparinbindungsdomänen interagieren können. Auch Agrin gehört zu den HSPG, so dass es nicht erstaunlich ist, dass FN an Agrin binden kann (4.1.3.3.1). Möglicherweise überlappen die CAR- und die Agrinbindungsstelle von FN. Heparin- oder Glycoaminoglycanbindungsstellen gibt es auch in zahlreichen anderen Proteinen wie z.B. Antithrombin III (Mourey et al., 1993), Vitronektin (Schvartz et al., 1999), Lipoprotein Lipase (Hata et al., 1993) und „Fibroblast growth factor“ (FGF) (Faham et al., 1996), deren Fähigkeit mit CAR zu interagieren ebenfalls geprüft werden sollte.

Ein weiterer Interaktionspartner vom CAR ist Laminin-1. Laminine sind heterotrimere Glycoproteine bestehend aus einer α -, einer β - und einer γ -Kette (Colognato und Yurchenco, 2000). Bislang sind in Vertebraten jeweils fünf Gene für die α -, vier für die β - und drei für die γ -Kette beschrieben worden, so dass insgesamt mindestens 15 verschiedene Heterotrimere gebildet werden können (Burgeson et al., 1994; Koch et al., 1999; Libby et al., 2000; Miner et al., 1997; Parsons et al., 2002). Für einige Laminine konnte gezeigt werden, dass sie selbstassoziiieren und polymere Netzwerke bilden, welche mit zellulären Rezeptoren interagieren (Cheng et al., 1997; Colognato et al., 1999). Diese Netzwerke rekrutieren andere Matrix-Proteine, die entweder mit Lamininen oder sich selbst interagieren. Daraus entstehen die unlöslichen, stark vernetzten basalen Laminae (Miner, 2008). Die verschiedenen Rezeptoren für Laminine werden in die Gruppen Integrine und nicht-Integrine unterteilt. Für mehrere Integrin-Heterodimere konnte eine Bindung an gereinigte Laminine nachgewiesen werden: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ (Colognato und Yurchenco, 2000; Delwel und Sonnenberg, 1996; Sasaki und Timpl, 2001). Auf Seiten der nicht-Integrine gibt es drei Rezeptoren für Laminine, von denen zwei HSPG sind: zum einen das heterodimere Dystroglycan, dessen α -Kette eine hohe Affinität zur $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette von Lamininen hat (Henry und Campbell, 1999; Winder, 2001; Wizemann et al., 2003). Zum anderen konnte auch eine Bindung der Syndecane-1, -2 und -4 an die Laminin α -Kette gezeigt werden (Hoffmann et al.,

Diskussion

1998; Okamoto et al., 2003; Okazaki et al., 2002). Der dritte nicht-Integrin Rezeptor für Laminine ist „Lutheran blood group glycoprotein“ oder „basal cell adhesion molecule“ (Lu/B-CAM), ein IgSF-Mitglied nahe verwandt mit dem Säugetier „melanoma cell adhesion molecule“ (Muc18/Mcam), „activated leukocyte cell adhesion molecule“ (ALCAM/BEN) und Gicerin. Lu bindet an Laminin-10 und -11, aber nicht an andere Laminine (Parsons et al., 2001; Moulson et al., 2001).

Durch *in vitro* Studien konnte belegt werden, dass Laminin-1 Wachstum und Neuri-tenbildung von kultivierten Neuronen fördert (Denda und Reichardt, 2007). Auch im Nervensystem kommen Laminine als Bestandteil der basalen Laminae vor, die mit Blutgefäßen und dem Choroid Plexus assoziiert sind. Auch die pia/meningeale basale Lamina, welche das ZNS umgibt, enthält Laminine (Miner, 2008). Außerdem organisieren Schwann Zellen in peripheren Nerven eine Basalmembran auf der Oberfläche jedes einzelnen Axons (Endoneurium). Zusätzlich bilden auch perineurale Zellen, welche große Nerven umgeben, eine basale Lamina (Patton, 2000).

CAR ist nicht nur auf das ZNS beschränkt und kommt z. B. auch auf Neuronen des PNS und Muskelzellen vor (Shaw et al., 2004; Fritz G. Rathjen und Stephan Kröger, unpubliziert). Auf letzteren ko-lokalisiert es mit den Untereinheit des ACh-Rezeptors (Fritz G. Rathjen und Stephan Kröger, unpubliziert). Die Zugabe von löslichem Agrin bewirkt eine für die Ausbildung der neuromuskulären Synapse erforderliche Aggregation der ACh-Rezeptoruntereinheit, welche durch Fab-Fragmente gegen CAR blockiert werden kann (Fritz G. Rathjen und Stephan Kröger, unpubliziert). Die die Muskelzellen umgebende basale Lamina hat einen erheblichen Anteil an der Ausbildung der neuromuskulären Synapse (Bezakova und Ruegg, 2003). Die Fähigkeit vom CAR an Agrin und Laminin-1 zu binden, spielt also bei diesem Prozess eine Rolle.

Die heterophile Assoziation vom CAR hat also auch eine Funktion im frühen Stadium der Synaptogenese.

Da mCAR-defiziente Mäuse durchschnittlich am E10.5 aufgrund von Missbildungen im Herzen absterben (Dorner et al., 2005; Asher et al., 2005), ist es zurzeit nicht möglich, Synapsenbildung bei Abwesenheit vom CAR *in vivo* zu betrachten.

Als weitere extrazelluläre Interaktionspartner vom CAR konnten Tenascin-R und Fibulin-1 identifiziert werden, die ebenso wie FN, Laminin-1 und Agrin auch Bestandteil basaler Laminae sind. Basale Laminae sind dünne Schichten spezieller extrazellulärer Matrix, welche Epithelien, Endothelien, Muskelzellen, Fettzellen, Schwann Zellen, periphere Nerven sowie das gesamte ZNS umgeben. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Beibehaltung der

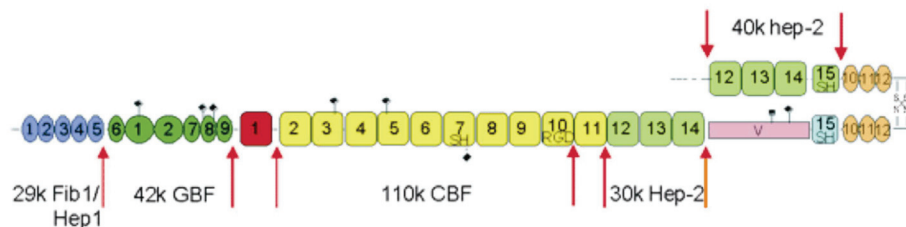
Diskussion

Gewebeintegrität und Kompartimentierung, bei der Filtration und bei diversen Entwicklungsprozessen. Zusätzlich enthalten alle basalen Laminae Kollagen Typ IV, Nidogen und sulfatierte Proteoglycane (Timpl, 1989; Timpl, 1996).

Jeder Skelettmuskel ist von einer basalen Lamina eingehüllt. Das Hauptlaminin dieser basalen Lamina ist Laminin-2 (Patton, 2000), obwohl auch Laminin-4 zu einem kleineren Anteil darin vorkommt (Sasaki et al., 2002). In der synaptischen Spalte an der neuromuskulären Synapse, welche weniger als 0,1% der Muskelfaseroberfläche einnimmt, sind spezielle Laminin-Trimere lokalisiert: überwiegend Laminin-4, -9, und -11, welche alle die β 2-Kette enthalten (Patton, 2000). Laminin- β 2-defiziente Mäuse zeigen gravierende Defekte an der neuromuskulären Synapse und sterben im Alter von etwa 3 Wochen (Noakes et al., 1995).

Wie zu Beginn in dieser Arbeit berichtet wurde, hat eine Reihe von früheren unpublizierten Experimenten eine Interaktion vom CAR mit ECM-Glycoproteinen nahe gelegt. Adhäsion und axonales Wachstum retinaler Zellen auf Basallamina-Präparationen sowie einzelner ECM-Glycoproteine kann durch Fab-Fragmente gegen CAR unterbunden werden (Patzke, Schmidt, Kröger und Rathjen, unpubliziert). Die hier als CAR-Bindungspartner präsentierten ECM-Glycoproteine sind vermutlich alle Bestandteil basaler Laminae, deren adhäsive und Neuriten-stimulierende Wirkung mit hoher Wahrscheinlichkeit auch durch die CAR-ECM-Wechselwirkung verursacht ist.

Fibronektin

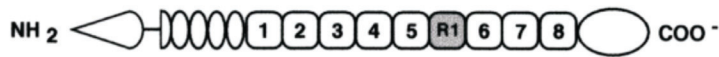


Fibulin-1

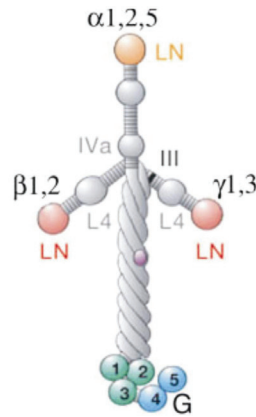


Diskussion

Tenascin-R



Laminin



Cruciform
Laminins-1,2,3,4,10,11,12,15

Agrin

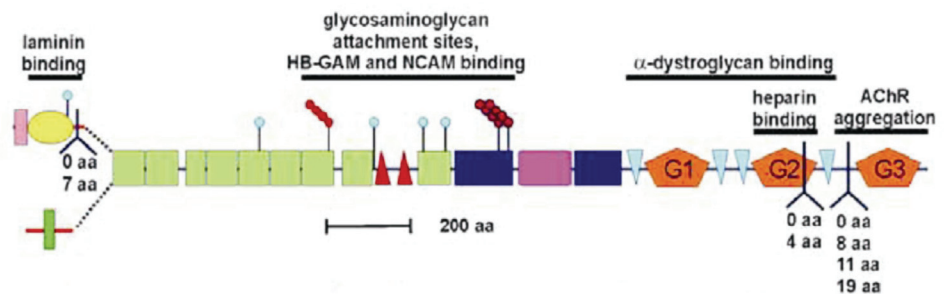


Abb. 5.2 Schematische Darstellung einiger extrazelluläre Bindungspartner vom CAR. **FN und FN-Fragmente:** Ovale: FN I-Domänen; Kreise: FN II-Domänen; Quadrate: FN III-Domänen; violettfarbenes lang gezogenes Rechteck: variable Domäne; blau: Fibrinogen- und Heparinbindungsfragment mit erster Heparinbindungsdomäne; grün: Gelatine-bindendes Fragment; rot: FN III₁-Domäne; gelb: Zell-bindendes Fragment; hellgrün: Heparin-, Fibulin-1- und CAR-bindendes Fragment; türkisfarben: an variabler Region anliegende FN III₁₅-Domäne; orange: C-terminales Fragment (Ingham et al., 1990). **Fibulin-1:** Isoformen A und B wurden bislang nur in der menschlichen Plazenta gefunden. rotes Rechteck: Signalsequenz; gelber Kreis: Anaphylatoxin-Domäne; türkisfarbenes Quadrat: EGF-ähnliche Domäne; grünes Sechseck: EGF-angrenzende Domäne; rotes lang gezogenes Sechseck: Fibulin-typisches Modul (Argraves et al., 2003). **Tenascin-R:** spitz zulaufender Kegel: N-terminale Cystein-reiche Sequenz; schmales Oval EGF-Domäne; breites Oval: Fibrinogen-ähnliche Domäne; weiß gefülltes Quadrat: konstitutiv exprimierte FN III-Domäne; grau gefülltes alternativ gespleißte FN III-Domäne (Joester und Faissner, 2001). **Laminin:** Die Kreuzform-Struktur ist repräsentativ für die meisten Laminin-Trimere. Diese Trimere besitzen drei Laminin-N-terminale-Domänen VI (LN). N- und C-Terminus der α -Kette enthalten die Bindungsstellen für Zelloberflächen-Rezeptoren (Miner, 2008). **Agrin:** violettfarbenes Rechteck: Signalsequenz; gelbes Oval: N-terminale (NtA) Domäne; grünes Quadrat: Follistatin-ähnliche Domäne; kleine rote Kreise an schwarzem Stab: konservierte Sequenz für Anbindung von GAG-Kette; rotes Fünfeck: Laminin G-ähnliche Domäne; gedrehtes Y: Spleiß-Positionen mit Anzahl inserierter Aminosäuren; rotes Dreieck: Laminin EGF-

Diskussion

ähnliche Domäne; blaues Rechteck: Serin/Threonin reiche Region; türkisfarbenes Dreieck: EGF-ähnliche Domäne; kleiner türkisfarbener Kreis an schwarzem Stab: potentielle N-Glycosylierungsstelle; schmales grünes Quadrat: Transmembran-Domäne; violettfarbenes breites Rechteck: SEA- (Seeigel-Sperma-Protein, Enterokinasase, Agrin) Domäne (verändert nach (Bezakova und Ruegg, 2003)).

5.4 CAR: homophil oder heterophil?

Werden die bisherigen Ergebnisse zusammengetragen, dann wird ersichtlich, dass CAR sowohl homophil als auch heterophil binden kann. Auf zellulärer Ebene betrachtet, handelt es sich höchstwahrscheinlich um zwei getrennte Prozesse. Wird durch lösliche Proteine (Ad2 Fiber Knob oder mCAR D2) selektiv die D1-Domäne blockiert, dann wird zwar die homophile Bindung der Zellen beeinträchtigt, aber nicht ihre Fähigkeit Neuriten auszubilden. Dies zeigt, dass dieses Neuritenwachstum durch eine heterophile Bindung vom CAR an ECM-Glycoproteine gefördert wird. Es gibt also Hinweise darauf, dass die homophile und die heterophile Assoziation vom CAR sich gegenseitig ausschließen, was so zu verstehen ist, dass CAR der Zelle erlaubt, entweder an CAR benachbarter Zellen oder an ECM-Glycoproteine zu binden. Diese kommen entweder in basalen Laminae, in zellgebundener Form oder in beiden Varianten vor, wie beispielsweise Agrin, das im ZNS überwiegend als transmembran-Isoform (TM-Agrin) vorliegt, z.B. auf den retinalen Ganglienzellen, wo es Neuritenwachstum reguliert (Annie et al., 2006).

Möglicherweise ist die Funktion vom CAR abhängig von der Lokalisation. In frühen Stadien der retinalen Entwicklung beispielsweise (E4 Hühnchenembryo (Rathjen, unpubliziert)) ist CAR homogen verteilt, aber besonders in der an das Pigmentepithel grenzenden Zone und an der vitrealen Grenze angereichert. Zwischen Pigmentepithel und Retina gibt es keine basale Lamina (Rathjen, persönliche Mitteilung) und damit auch weniger ECM-Glycoproteine, so dass CAR hier möglicherweise eher homophil fungiert. Auf der vitrealen Seite hingegen umgibt eine basale Lamina die retinale Ganglienzellschicht, so dass CAR hier vermutlich auch heterophil fungiert.

Ein weiterer Punkt ist, dass hier durch Bindungsversuche gezeigt werden konnte, dass rekombinanter extrazellulärer CAR selbstassoziiierend ist, obwohl von den Affinitäten her betrachtet die Bindung zu ECM-Glycoproteinen stärker ist. Allerdings spielen hierbei noch zwei andere Faktoren eine zusätzliche Rolle: die Kinetik der chCAR_{ohne Fc}-Dimerisierung ist zumindest so langsam, dass die Bindung einen kompletten Lauf über die Gelfiltrationssäule übersteht, wobei das bei der heterophilen Bindung zu FN nicht der Fall ist (Patzke, unpubli-

zierte Beobachtung). Andererseits ist die Avidität für die CAR-CAR-Interaktion so gegeben, dass viele CAR-Moleküle an der homophilen Bindung zweier Zellen beteiligt sind, so dass die Selbstassoziation rein rechnerisch betrachtet zwar weniger affin ist als die Assoziation zu ECM-Glycoproteinen, aber dafür eventuell auf zellulärer Ebene in der Summe doch stärker ist, bzw. möglicherweise durch weitere Komponenten stabilisiert wird. Denn bei Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigt sich, dass Neuronen auf ihrer gesamten Oberfläche CAR exprimieren und besonders Zell-Zell-Kontaktstellen reich an CAR sind (Rathjen, unpubliziert).

5.5 CAR ist mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert

CAR kann auf seiner zytoplasmatischen Seite mit Aktin-bindenden Proteinen interagieren (4.3). Auch andere Autoren haben eine direkte Verbindung vom CAR zum Aktin-Zytoskelett beschrieben (Huang et al., 2007). Der CAR-Bindungspartner α -Actinin ist ein etwa 220 kDa großes antiparalleles Homodimer mit jeweils einer N-terminalen Aktinbindungsdomäne (bestehend aus zwei Calponin-homologen Domänen) vier zentralen Spectrin-ähnliche Domänen und einer C-terminalen Calcium-bindenden Calmodulin-ähnliche Domäne. Jedes Dimer kann also zwei Aktinfilamente miteinander quervernetzen. α -Actinin wurde ursprünglich als Aktin-Quervernetzer in Skelettmuskeln beschrieben, wobei mittlerweile bekannt ist, dass es ubiquitär exprimiert wird. α -Actinin wurde vor allem in sogenannten fokalen Kontakten entlang von Aktin-Stressfasern von migrierenden Zellen gefunden. Man schreibt α -Actinin somit verschiedene zentrale biologische Funktionen zu: 1. Es ist der Hauptquervernetzer von Aktinfilamenten in muskulären Z-Scheiben, wo es zwei aneinander liegende Sarkomere zusammenhält. 2. In nicht-Muskelzellen ist es ein Hauptbestandteil der Stressfasern. Es ist nahe der Plasmamembran lokalisiert, wo es die β 1-Untereinheit der Integrine und andere Transmembranproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet (Broderick und Winder, 2005), wodurch die Bildung von Stressfasern und „focal adhesions“ kontrolliert wird (Geiger et al., 2001). Das sind Punkte der Zelle, wo ECM-Glycoproteine über Transmembranproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind. Eine entscheidende Rolle kommt dabei auch dem Fragment FN-40-kDa zu, welches die Ausbildung von Stressfasern beschleunigt. Eine Funktion, die dem zentralen Fragment FN-120-kDa nicht zugeschrieben wird (Bloom et al., 1999; Pierschbacher et al., 1982). Es gibt bislang eine ganze Reihe von Transmembranproteinen, deren Bindung an α -Actinin beschrieben wurde, zu denen auch das HSPG Syndecan-4 gehört (Greene et al., 2003). Typischerweise sind diese Bindungen durch die Spectrin-ähnlichen

Diskussion

Domänen vermittelt, die an kationische Residien von Transmembranproteinen binden (Otey und Carpen, 2004). Für β 1-Integrin konnte die α -Actinin-Bindungsstelle auf ein Peptid eingegrenzt werden, das aus einer Abfolge von stark geladenen Aminosäuren besteht (FAKFEKEKMN) (Otey et al., 1993). CAR besitzt auch eine Abfolge von geladenen AS im zytoplasmatischen Segment, die direkt nach dem Ende der Transmembrandomäne folgt (AS 261-271: HRKRREEKYEK, siehe Abb.4.5 F)) und möglicherweise die Bindungsstelle für α -Actinin enthält.

Der zytoplasmatische CAR-interaktionspartner Profilin bindet typischerweise G-Aktin. Eine wichtige Funktion von Profilin scheint die Fähigkeit zu sein, den Austausch von ADP zu ATP am Aktin-Monomer zu fördern, um so die Möglichkeit des Wachstums am +Ende des Aktinfilaments zu gewährleisten. Außerdem führt Profilin das gebundene Aktin-Monomer zum +Ende und setzt es dort frei. In Mäusen und Menschen gibt es vier Profilin-Gene. Profilin-1 wird bis auf Skelettmuskeln ubiquitär exprimiert. Profilin-2 kommt ausschließlich im sich entwickelndem Nervensystem vor. Profilin-3 und -4 kommen überwiegend in den Testes vor. Profilin-1-defiziente Mäuse sterben zwischen dem 2- und 8-Zellstadium. Profilin-2 defiziente Mäuse erleiden schwere neurologische Probleme, was auf eine gestörte Neurotransmitter-Homöostase zurückzuführen ist, obwohl in Neuronen auch Profilin-1 exprimiert wird, was dafür spricht, dass beide nicht die gleiche Funktion haben (Birbach, 2008; Lambrechts et al., 2006; Witke, 2004).

Profilin-1 hat eine primäre Funktion in der Regulierung des Zytoskeletts. Es kann durch seine Bindung an die Plasmamembran gewissermaßen an den Orten gespeichert werden, wo Aktin-Polymerisation stattfindet (Birbach, 2008; Witke, 2004). Profilin-2 hingegen ist wichtig für den Membrantransport. In Neuronen interagieren Profilin-1 und -2 mit Gerüstproteinen wie Gephyrin, Drebrin, Aczonin und Delphinin. Drebrin beispielsweise spielt eine wichtige Rolle in der Morphologie von dendritischen Dornen.

In Neuronen sind VASP und Mena Profilin-Liganden, die selbst auch Gephyrin binden. (Witke, 2004)

Während Profilin-1 von Hefen und Pflanzen bis hin zu Säugern in allen Organismen vorkommt, ist das Nervensystem-spezifische Profilin-2 nur in Vertebraten zu finden. Profilin interagiert mit einer ganzen Reihe an Proteinen und gehört zu den promiskuitivsten Proteinen im Nervensystem. Mikroinjektion von Profilin in Nierenzellen der Ratte inhibiert die Ausbildung von Lamellipodien. Überexpression in CHO Zellen stabilisiert dynamische Aktin-Strukturen. Überexpression verringert die Motilität invasiver Brustkrebs-Zellen und verstärkt die Adhäsion einiger endothelialer Zellen auf bestimmten Matrices. Profilin-1 hat eine Tu-

Diskussion

mor-suprimierende Wirkung. Während der neuronalen Differenzierung ist Profilin-2 ein Regulator des zellcorticalen Aktins: Überexpression verhindert Neuritenwachstum, während Suppression dieses fördert. Die stabilisierende Rolle von Profilin wird durch RhoA über die Aktivierung der Rho Kinase (ROCK) vermittelt (da Silva et al., 2003; Birbach, 2008). In PC12 Zellen ist das Neuritenwachstum abhängig von Profilin-1 (Lambrechts et al., 2006). Profilin hat vermutlich wie CAR eine Funktion bei der Neuritogenese.

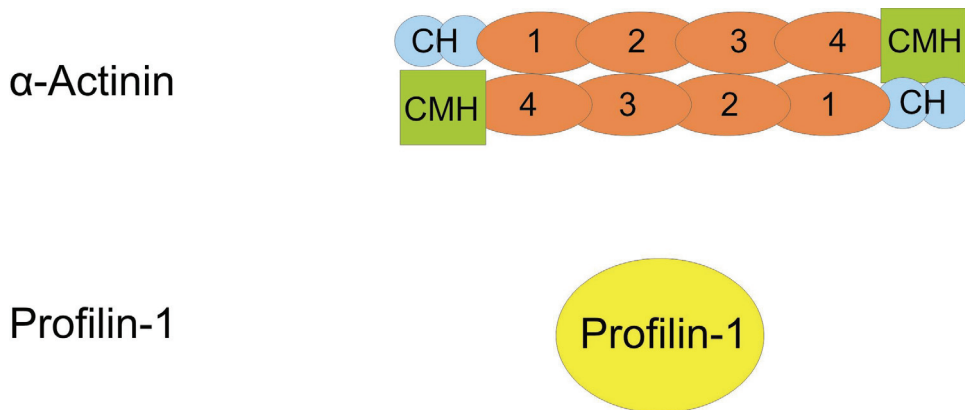


Abb 5.3 Schematische Darstellungen der in dieser Arbeit identifizierten intrazellulären Interaktionspartner vom CAR. **α -Actinin**: Antiparalleles Dimer, das N-terminal die Aktinbindungsdomänen (je aus zwei blau dargestellten Calponin-homologen (CH) Domänen bestehend), C-terminal je eine Calmodulin-ähnliche Domäne (CMH) und zentral je vier Spectrin-ähnliche Domänen enthält. **Profilin-1** besteht nicht aus zu anderen Proteinen homologen Domänen.

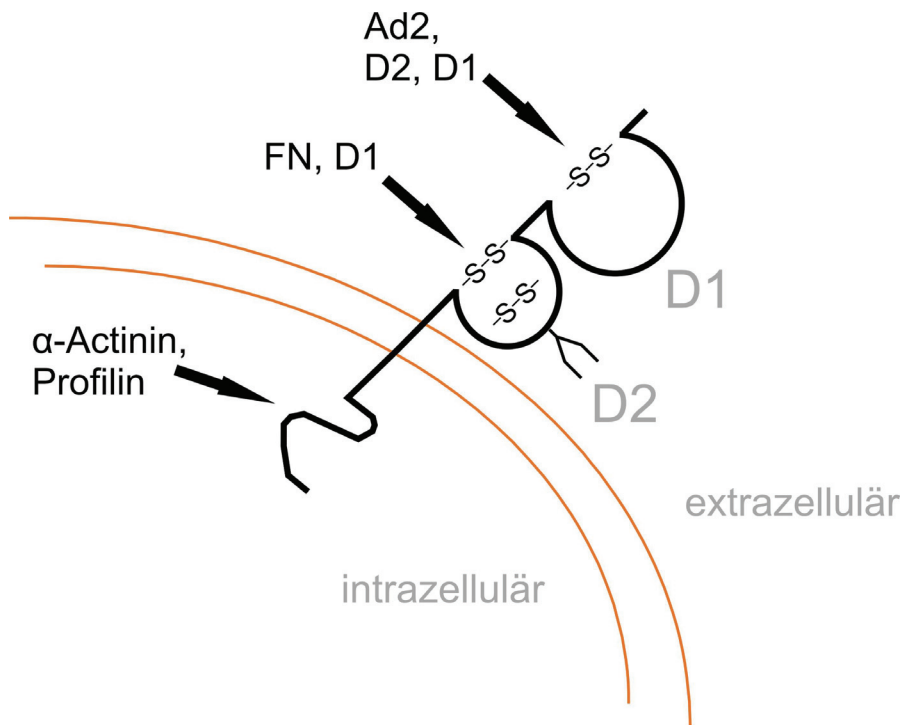


Abb. 5.4 Schematische Darstellung vom CAR mit seinen in dieser Arbeit identifizierten Interaktionspartnern. Zumindest beim chCAR ist D1 nicht N-glycosyliert. Die Ig-Domänen sind als geöffnete Kreise dargestellt. Mögliche Glycosylierungen sind durch Y-förmige Strukturen angedeutet.

5.6 Parallelen und mögliche Kooperation vom CAR mit Integrinen

Wie beim CAR hat sich auch bei den Integrinen gezeigt, dass sie ECM-Glycoproteine wie FN und Laminin-1 sowie Aktin-assoziierte Proteine binden können. Im Gegensatz zu CAR ist jedoch deren Bindung abhängig von zweiwertigen Ionen. Nachdem Integrine ihre extrazellulären Interaktionspartner gebunden haben, gruppieren sie sich in Kontaktpunkten, welche zu „focal adhesions“ reifen. „Focal adhesions“ sind spezialisierte Multiproteinanker, welche die Zellmembran und die damit extrazellulär verbundenen Moleküle oder Nachbarzellen an Aktin Stressfasern binden. „Focal adhesions“ enthalten einen Komplex an interagierenden Proteinen, wie Talin, α -Actinin, Vinculin und Paxillin. Der zytoplasmatische Bereich der β 1-Integrin Untereinheit interagiert mit „Focal adhesion kinase“ (FAK) und aktiviert diese nach extrazellulärer Ligandenbindung (Schwartz, 2001; Aplin et al., 1998; Giancotti und Ruslahti, 1999; Juliano, 2002). Dabei wird ein Signalweiterleitungs-Komplex aus FAK, SRC, GRB2, p130CAS, SHC, „integrin-linked kinase“, Paxillin, Calreticulin, Calveolin-1 und anderen noch unbekanntem Elementen zusammengesetzt. Integrine können den MAP-Kinase-Signalweg aktivieren und auf diese Weise den intrazellulären pH-Wert und die Calcium-

Diskussion

Konzentration erhöhen. Dieses komplexe Geflecht aus intrazellulären Signalweiterleitungsergebnissen initiiert durch die Integrin-Rezeptoren, involviert auch die kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc42, welche wichtige Regulatoren der Aktinpolymerisationsdynamik während der Bewegung von Filopodien und Lamellipodien sind (Geiger et al., 2001). Es ist bekannt, dass Integrine in der Zellmembran mit anderen Rezeptoren assoziieren können (Woods und Couchman, 2000). Diese binden ihre Liganden und vermitteln eine Signalweiterleitung über die Integrine. Dazu gehören z.B.: Tetraspandan-Rezeptoren wie CD9, welche Myoblastenfusion und Neuritenwachstum fördern können (Banerjee et al., 1997; Tachibana und Hemler, 1999), und „integrin associated protein“ (IAP), ein Thrombospondin/P84 Rezeptor, welcher möglicherweise eine Funktion bei Prozessen wie Lernen und Gedächtnis hat (Brown und Frazier, 2001).

Neuroblasten des sich entwickelnden Organismus bewegen sich von der Proliferationszone bis zum Zielort mittels verschiedener Arten der Migration: In der Retina ist ein Teil der stattfindenden Migrationsprozesse die somale Translokation über relativ kurze Distanzen (Prada et al., 1981). Migration von Neuroblasten entlang von Radialglia im Gehirn und die tangentielle Migration in Ketten von Zellen von der subventrikulären Zone ausgehend stellen Migrationen über größere Distanzen dar (Rakic, 1990; Lois et al., 1996). Die Wanderung der Neuralleistenzellen entspricht der Migration über die größte Distanz (Groves und Bronner-Fraser, 1999). Integrine sind an allen Typen von Neuroblastenmigration beteiligt. Beispielsweise konnte für die $\beta 1$ -Untereinheit gezeigt werden, dass blockierende Antikörper im Hühnchenembryo die radiale Bewegung der neu entstandenen retinalen Ganglienzellen von der an das Pigmentepithel grezenden Zone bis zur vitrealen Grenze inhibieren (Cann et al., 1996). Die Expression von anti-sense mRNA stört die tangentielle Migration von Retinoblasten (Skeith et al., 1999). Außerdem kann die Migration einer Population tectaler Zellen aus dem Hühnchenembryo von der ventrikulären Zone bis hin zur tectalen Platte durch Expression von $\alpha 6$ -anti-sense mRNA blockiert werden (Zhang und Galileo, 1998). Des weiteren konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Antikörper gegen $\alpha 3$ die Migration corticaler Neuronen entlang von Radialglia verlangsamen, aber keine Ablösung von der Glia bewirken. Alternativ dazu verursacht die Blockade der hauptsächlich in Glia gefundenen αV -Untereinheit nicht nur eine Verlangsamung der Migrationsgeschwindigkeit, sondern auch ein Ablösen der Neuronen (Anton et al., 1999). In einem anderen Experiment wurde dargelegt, dass in cerebellaren Schnittkulturen Antikörper gegen das Zelladhäsionsmolekül L1 und $\beta 1$ -Integrin zusammen die Migration granulärer Zellen inhibieren. Werden die Antikörper getrennt eingesetzt, so entsteht dieser Effekt nicht (Thelen et al., 2002). Dies ist ein Hinweis darauf, dass es eine

Diskussion

funktionelle Kooperation der $\beta 1$ -Untereinheit und L1 gibt. Die Wanderung der Neuralleistenzellen ist durch mehrere Integrine vermittelt, die einander zu kompensieren in der Lage sind. Erst die Kombination der Antikörper gegen $\alpha 4\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ und $\alpha 8\beta 1$ inhibiert vollständig die Migration (Testaz et al., 1999). Wie CAR wird auch $\alpha 4\beta 1$ in embryonalen retinalen Ganglienzellen exprimiert und bindet ebenfalls wie CAR an die zweite Heparinbindungsdomäne von FN (Clegg et al., 2003; Peterson et al., 2005).

Die Funktion einer Reihe von Integrinen beim Auswachsen von Axonen und Dendriten durch ihre Interaktion mit ECM-Proteinen wurde detailliert *in vitro* untersucht (Bradshaw et al., 1995; DeFreitas et al., 1995; McKerracher et al., 1996; Weaver et al., 1995). Trotz der $\alpha 1\beta 1$ zugewiesenen Rolle als wichtiger Laminin-Rezeptor das Neuritenwachstum sensorischer Neuronen zu vermitteln, sind bislang keine Auswachsungsdefekte in $\alpha 1$ -defizienten Mäusen entdeckt worden (Gardner et al., 1996). Auch Wegfindungsfehler in der Retina konnten im Gegensatz zu früheren *in vitro* Versuchen in $\alpha 6\beta 1$ knockout Mäusen nicht identifiziert werden (Georges-Labouesse et al., 1998; de, I und Reichardt, 1993). Die Verfügbarkeit multipler Weg-Ziel-Findungssysteme, welche fehlende Integrine kompensieren, ist eine Erklärung für das Fehlen der erwarteten Phänotypen in den knockout Mäusen (Bixby und Harris, 1991).

Andere Studien belegen auch, dass Integrine an der Entwicklung von Synapsen beteiligt sind. Die wahrscheinlich am besten untersuchte Synapse ist die neuromuskuläre Synapse, an deren Ausbildung $\alpha 7\beta 1$ mitzuwirken scheint. Die $\alpha 7$ -Untereinheit wird vom Muskel synthetisiert und die Isoformen $\alpha 7A$ und $\alpha 7B$ sind in synaptischen Regionen lokalisiert, während eine weitere Isoform $\alpha 7C$ auf der gesamten Muskeloberfläche zu finden ist (Martin et al., 1996). Ein Schlüsselereignis bei der Entstehung der neuromuskulären Synapse ist die Gruppierung der AChR auf der Muskeloberfläche. Es wird bislang davon ausgegangen, dass die Laminine in der synaptischen basalen Lamina mit $\alpha 7\beta 1$ -Integrin interagieren und somit die Agrin induzierte AChR-Gruppierung erst möglich machen (Burkin et al., 2000). $\alpha 7$ -blockierende Antikörper verhindern diesen Prozess (Burkin et al., 1998). Andere Integrine sind möglicherweise auch Akteure an der neuromuskulären Synapse: $\alpha 3$, $\alpha 9$ und αV konnten in der postsynaptischen Membran detektiert werden. Für $\alpha V\beta 1$ wurde sogar nachgewiesen, dass es eine Agrin-bindende Aktivität besitzt (Martin et al., 1996; Martin und Sanes, 1997; Cohen et al., 2000). Antikörper gegen αV oder $\beta 1$ blockieren die AChR-Gruppierung (Martin und Sanes, 1997).

Im ZNS können eine ganze Reihe von Integrinen nicht nur während der Entwicklung detektiert werden. Dazu gehören die Untereinheiten: $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 8$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ und $\beta 8$

Diskussion

(Galileo et al., 1992; Murase und Hayashi, 1996; Kramar et al., 2002; Jones, 1996; Bi et al., 2001; Einheber et al., 2001). Während der Entwicklung steigt die Expression von $\alpha 8\beta 1$ zu Zeiten der Synaptogenese an, was eine Funktion bei der Synapsenbildung suggeriert. Es ist postsynaptisch lokalisiert und interagiert mit einem unbekanntem Rezeptor der Präsynapse (Niquet et al., 1995). $\alpha 8$ defiziente Mäuse sind perinatal lethal aufgrund einer Fehlbildung der Nieren. Ob diese Tiere defekte Synapsen besitzen, konnte bislang nicht nachgewiesen werden (Muller et al., 1997). In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass Interaktionen von Astroglia mit Neuronen vermittelt durch das Glia-Integrin $\alpha V\beta 3$ eine Aktivierung von PKC in einzelnen Neuronen hervorruft, welche die exzitatorische Synaptogenese fördert. Der Rezeptor ist bislang unbekannt (Hama et al., 2004). $\alpha V\beta 3$ ist auch eines der zwei Integrine, welche als Korezeptoren für Ad2 dienen und somit womöglich in räumlicher Nähe von oder mit CAR assoziiert in der Zellmembran vorliegt (Bergelson, 1999). Wie CAR ist auch $\alpha V\beta 3$ in der Lage FN zu binden (obwohl es als wichtiger Vitronektin-Rezeptor gilt) (Denda und Reichardt, 2007). Wie bereits erwähnt, wird FN im ZNS von Astroglia exprimiert (Tom et al., 2004). Es bleibt also die Frage zu klären, ob CAR und $\alpha V\beta 3$ im ZNS möglicherweise eine funktionelle Einheit bilden.

5.7 Parallelen zwischen CAR und Syndecan-4

Auch zwischen CAR und den Syndecanen gibt es funktionelle Parallelen: Syndecan-4 beispielsweise stellt wie CAR eine Verbindung zwischen der zweiten Heparinbindungsdomäne von FN und α -Actinin her. Eine mögliche weitere Verbindung von Syndecan-4 zu CAR ist, dass die Infektivität von Ad2 und Ad5 auf CAR-positive HeLa und A549 Zellen durch Zugabe von Heparin oder vorherige Behandlung mit den Heparin-Lyase I, II und III gehemmt wird. Was dafür spricht, dass HSPG ko-Rezeptoren für die Zellbindung sind (Dechechchi et al., 2000; Dechechchi et al., 2001). Auch in Bezug auf den Coxsackievirus B3 PD (eine Mutante) hat sich herausgestellt, dass zellmembranständige Heparansulfate zur Bindung des Virus beitragen (Zautner et al., 2003). Daraus kann entnommen werden, dass CAR und HSPG (möglicherweise Syndecan-4) in einem Komplex in Zellmembranen vorliegen.

Syndecan-4 gehört zu der vier Mitglieder umfassenden Familie der Syndecane, Transmembranproteine, deren Ectodomäne Consensus-Sequenzen für Glucosamoglycan-Anheftung enthält. Nahe der Transmembrandomäne existiert extrazellulär eine proteolytische Spaltstelle (Reizes et al., 2008). Das intrazelluläre Segment besteht aus einer hochkonservier-

Diskussion

ten 29-34 AS langen C-terminalen Sequenz. Während die Expressionsmuster von Syndecan-1 und -3 typisch für epitheliale und neuronale Zellen sind, kommt Syndecan-2 in mesenchymalen und parenchymalen Zellen sowie Neuriten vor. Die Expression von Syndecan-1 ist auf Neuroepithelzellen begrenzt und geht zurück, wenn diese sich zu Neuronen differenzieren (Ford-Perriss et al., 2003) Syndecan-3 hingegen wird in neu-differenzierten Neuronen stark exprimiert. *In vitro* geht die Expression zurück, sobald die Axone mit ihren Zielen Synapsen ausbilden. Ebenfalls wurde eine ko-Lokalisation mit N-CAM auf migrierenden Zellen während der Entwicklung der olfaktorischen Plakode aufgezeigt. Syndecan-4 wird ubiquitär exprimiert. Syndecan-4 ist in diskreten Punkten auf der Zelloberfläche von Neuroepithelzellen lokalisiert. Dieses Erscheinungsmuster ist typisch für Moleküle, die in „lipid rafts“ vorkommen. Auch in Bezug auf CAR wird davon ausgegangen, dass es in „lipid rafts“ vorkommt (Ashbourne Excoffon et al., 2003). Außerdem zeigt es ebenfalls eine solche gruppierte Anordnung auf der Zelloberfläche (von fixierten Neuronen) in Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 2.2 A). Diese Mikrodomänen dienen als Plattform für Signalverarbeitung und für eine Reihe von Molekülen, die mit „lipid rafts“ assoziiert sind. Syndecane kommen meistens als Dimere (auch SDS-resistent) oder Oligomere höherer Ordnung vor, was vor allem durch Selbstassoziation der transmembran-Domäne bewirkt wird. Für Syndecan-4 gilt auch, dass der zytoplasmatische Teil in rekombinanter Form ebenfalls als Homodimer auftritt. Syndecan-4 ko-lokalisiert mit Integrin $\beta 1$ in Zellen auf FN und $\beta 3$ auf Vitronektin, wo es zur Ausbildung von „focal adhesions“ beiträgt. Überexpression sorgt für eine flache fibroblastenartige Morphologie von CHO Zellen mit erhöhter Anzahl an „focal adhesions“ und verminderter Zellmotilität, was dafür spricht, dass Syndecan-4 die Zell-ECM-Interaktion stärkt. Auf der anderen Seite führt die Überexpression von Syndecan-2 zu langen filopodienartigen Strukturen in Fibroblasten und erhöht die Zellmotilität, obwohl es auch mit FN interagiert. Syndecane enthalten in ihrem zytoplasmatischen Bereich wie CAR jeweils ein PDZ-Bindungsmotiv, an welches Synthenin, Cortactin oder die Serin-Proteinkinase CASK binden können. Syndecan-2 bindet Ezrin und Syndecan-4 α -Actinin. Syndecan-4 beeinflusst die Aktin-Zytoskelettorganisation durch Regulierung der Aktivität der kleinen GTPase RhoA. Auf der anderen Seite ist cdc42 notwendig für die durch Syndecan-2 induzierte Ausbildung von Filopodien. An die Heparansulfat-Kette von Syndecan-4 binden verschiedene FGFs, welche dem FGF-Rezeptor auf der gleichen Zellen präsentiert werden (Alberts et al., 2002). Lösung der Syndecan-4-FN Verbindung durch Tenascin-C führt zum Stillstand des Zellzyklus' und Inaktivierung von Cdk1. Überexpression von Syndecan-4 in Kardiomyozyten transgener Mäuse sorgt für einen Anstieg der NO-Freisetzung (Oh und Couchman, 2004). Syndecan-1 und -4-

defiziente Mäuse leiden an einer verzögerten Wundheilung und Angiogenese im Granulationsgewebe, Prozesse bei denen normalerweise beide Syndecane hochreguliert werden (Woods und Couchman, 2001). Syndecan-3-Defizienz führt zu einer gestörten neuronalen Migration im Riechkolben der Maus (Hienola et al., 2006).

5.8 Beeinflusst CAR die elektrischen Eigenschaften der Zelle?

Als ein Ergebnis dessen Interpretation möglicherweise weniger als alle anderen in dieser Arbeit dargelegte Experimente zu einer adhäsiven Funktion vom CAR führt, kann die erhöhte Kontraktionsfrequenz isolierter, mCAR-defizienter, embryonaler Kardiomyozyten betrachtet werden (4.4). Trotzdem kann auch dieses Resultat so gedeutet werden, dass einerseits die zytoskelettale Stabilität der Zellen durch das Fehlen vom CAR beeinträchtigt ist, so dass eine Reduktion von CAR-vermittelten Aktin-Verankerungen an der Plasmamembran eine weniger starre Zellarchitektur zur Folge hat. Auch das Fehlen der CAR-abhängigen Interaktion zu FN, welches den Kardiomyozyten hier als Substrat dient, kann eine schwächere Anhaftung der Zellen auf dem Boden der Kulturschale und somit einen geringeren mechanischen Widerstand bewirken, den es während der Kontraktion zu überwinden gilt. Möglicherweise ist auch die FN-Fibrillogenese gehemmt, so dass ein weniger stark ausgeprägtes Exoskelett ebenfalls einen geringeren mechanischen Widerstand bewirkt. Andererseits könnte dieses Ergebnis auch auf eine weitere Funktion vom CAR hindeuten, nämlich die Fähigkeit die Aktivität oder Zusammensetzung zusätzlicher Membran-assoziiierter Proteine und somit eventuell auch die elektrischen Eigenschaften der Zelle insgesamt zu beeinflussen. Arbeiten von Lisewski et al. und Lim et al. haben einen Defekt in der elektrischen Kopplung in mCAR-defizienten Herzen, vermutlich durch Connexin 45 vermittelt, nachgewiesen (Lisewski et al., 2008; Lim et al., 2008). Die Ausbreitung der elektrischen Impulse im Herzen ist durch allmählichen Rückgang der CAR-Expression in adulten Mäusen oder in Kardiomyozyten-spezifisch embryonal CAR-deletierten Tieren gestört, da die Funktionalität von Connexinen aufgrund veränderter Expression und Lokalisation in Mitleidenschaft gezogen wird (Lisewski et al., 2008). Werden die Pulsraten mCAR-defizienter Embryonen *in utero* leicht anästhesierter Mäuse gemessen, so ergibt sich jedoch kein Unterschied zum Wildtyp (Lim et al., 2008), was entweder für die adhäsive Funktion vom CAR spricht, die erst durch den Kontakt der Cardiomyocyten zur FN-beschichteten Kulturschale sichtbar wird oder durch einen unterschiedlichen experimentellen

Diskussion

Aufbau zu erklären ist. Allerdings zeigen auch die adulten Kardiomyozyten-spezifischen CAR-defizienten Mäuse in der Studie von Lisewski et al. eine erhöhte Pulsrate *in vivo*.

Denkbar wäre eine zusätzliche elektrische Funktion vom CAR, die durch eine mögliche Regulation der Ca^{2+} -Homöostase aufgrund modulatorischer Einflüsse auf $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ Austauscher oder $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPasen zustande kommt, wie es z.B. bei Phospholemman, einem sarkolemmanalen Protein, der Fall ist. Isolierte Kardiomyozyten Phospholemman-defizienter Mäuse zeigen ebenfalls eine veränderte Kontraktilität (Tucker et al., 2006). Trotzdem kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur darüber spekuliert werden, ob CAR neben seiner wahrscheinlich adhäsiven Funktion auch eine elektrische Funktion hat, die indirekt über andere Proteine zum Tragen kommt.

5.9 Ausblick

Die wohl interessanteste Frage in Bezug auf CAR, nämlich nach seiner Funktion im embryonalen Nervensystem, konnte bislang durch k.o.-Studien nicht beantwortet werden. Wie aus dieser Arbeit hervorgeht, reguliert CAR möglicherweise aufgrund seiner heterophil- aber auch homophil-adhäsiven Funktion zelluläre Prozesse wie Neuritenwachstum. Möglicherweise sind auch Prozesse wie neuronale Migration betroffen. Ob tatsächlich die D2-Domäne für ECM-Interaktionen und Neuritenwachstum verantwortlich ist, könnte in weiterführenden Studien geklärt werden, in denen z.B. CAR-defiziente Neuronen mit einem CAR-Konstrukt transfiziert werden, dem die D1-Domäne fehlt. Aber auch die Frage nach der homophilen Aktivität (ob cis oder trans, ob D1-D1-Interaktion oder D1-D2-Interaktion) muss beantwortet werden, z.B. durch zusätzliche kristallographische Untersuchungen an mCAR D1 213, mCAR D1 122 oder mCAR D2. Ein interessanter Weg wäre auch den Einfluss der Glycosylierung auf die Struktur des extrazellulären Segments vom CAR zu analysieren.

6 Abkürzungen

AChR	Acetylcholin-Rezeptor
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheit („absorption unit“)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
b	bovin
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
CAR	Coxsackievirus- und Adenovirus-Rezeptor
CAS	Crk-assoziiertes Protein
CASK	Kalzium/Calmodulin abhängige Serin-Proteinkinase
ch	aus dem Huhn stammend (<i>Gallus gallus</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
CTX	„cortical thymocyte marker in <i>Xenopus laevis</i> “
cyt	cytoplasmic („zytoplasmatisch“)
D1	erste Membran-distale Ig-Domäne vom CAR
D2	zweite Membran-proximale Ig-Domäne vom CAR
Da	Dalton
degl	deglycosyliert
DL	Durchlauf
DMEM	„Dulbecco’s modified eagle medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“)
et al.	et alii, und andere
extra	extrazellulär
FCS	Fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
FN	Fibronektin
FN I	Fibronektin Typ-I Domäne
FN II	Fibronektin Typ-II Domäne

FN III	Fibronektin Typ-III Domäne
g	Erdbeschleunigung (m/s^2)
GαM	Ziege-anti-Maus („goat-anti-mouse“)
Gl	Glutathion
GRB2	„growth factor receptors bound protein 2“
h	human oder Stunde
ICAM-1	„intercellular adhesion molecule-1“
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LN	Laminin-1
LNS	„Laminin, Neurexin, Sex-hormone-binding protein domain“
M	Mol pro Liter
m	milli oder murin
μ	mikro
mak	monoklonaler Antikörper
MAP	„mitogen activated protein“
mCAR SIV	Isoform 1 vom mCAR; auf AS SIV endend
mCAR TVV	Isoform 2 vom mCAR; auf AS TVV endend
MHC	„major histocompatibility complex“
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	nano
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NHS-Ester	N-hydroxysuccimid-Ester
N-Terminus	Aminoterminus
ohne Fc	Fc-Anteil proteolytisch abgespalten
p	porcin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaktion“)
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
ProtA	Protein A

Abkürzungen

Pr.-Pr.	Prescission-Protease
Rb	Kaninchen („rabbit“)
RNA	Ribunukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium –(„sodium“)-dodecylsulfat
Seph	Sepharose
SHC	„shc homologous and collagen-like protein“
SRC	v-srv-Homolog von <i>Rous Sarcoma Virus</i>
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
UV	ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
ZNS	Zentralnervensystem

7 Anhang

7.1 Molmassenbestimmung mittels Sedimentationsgleichgewicht-Analyse von FN-30-kDa, α -Actinin, Profilin-1, β 1-Neurexin-LNS und BSA

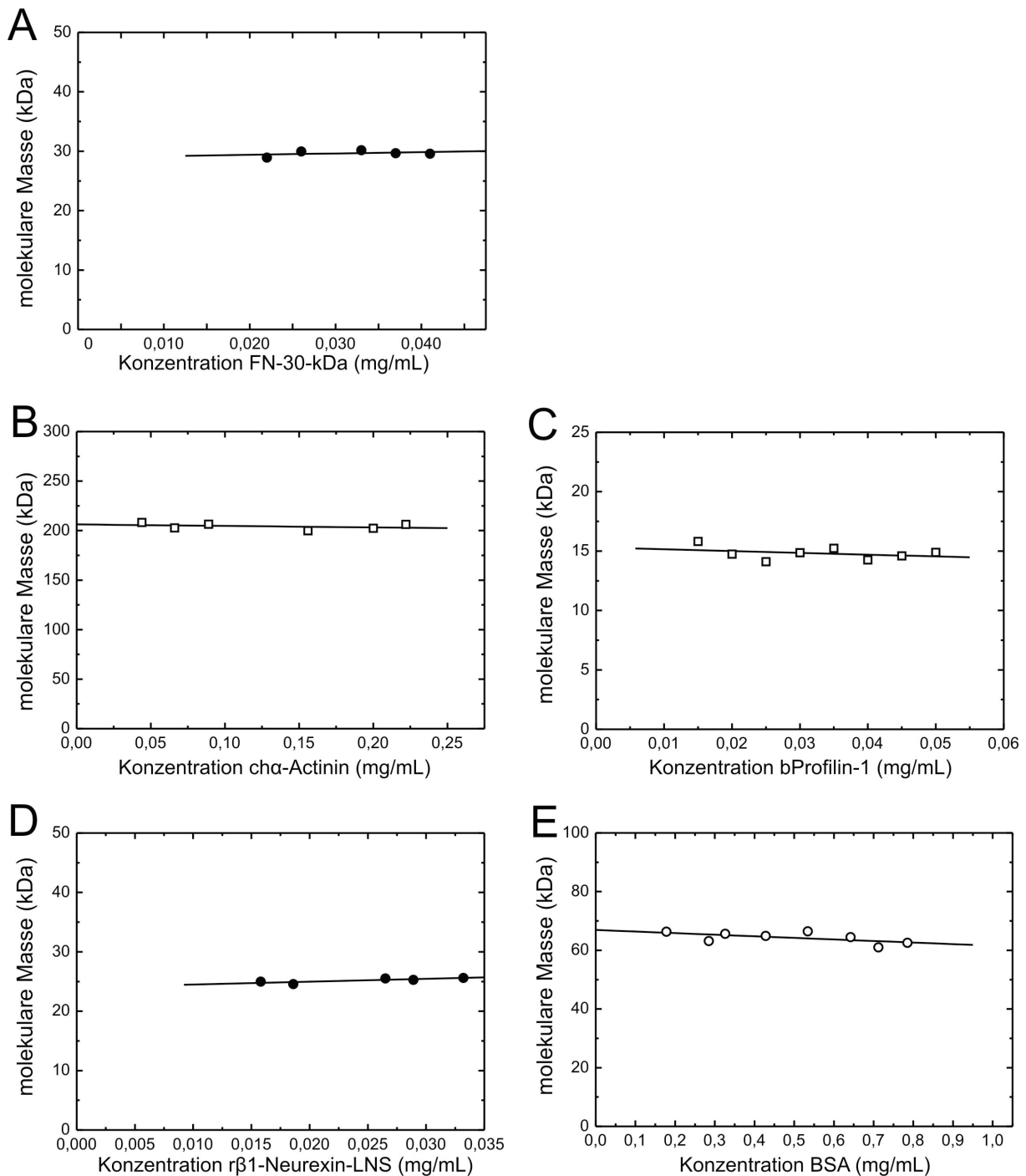


Abb. 7.1 Konzentrationsabhängige Molmassenbestimmung einiger CAR-Bindungspartner oder Kontrollproteine Bindungskurven aus Sedimentationsgleichgewicht-Analysen (in Zusammenarbeit mit Joachim Behlke).

Anhang

A+C-E Die erhaltenen Molmassen sind nicht abhängig von der eingesetzten Konzentration. Es handelt sich um Monomere. **B** α -Actinin ist ein stabiles Dimer.

8 Literaturverzeichnis

Alberts,B., Johnson,A., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., und Walter,P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. (New York: Garland Science).

Andersson,B., Tomko,R.P., Edwards,K., und et al. (2000). Putative regulatory domains in the human und mouse CVADR genes. *Gene Func Dis* 11-15.

Annie,M., Bittcher,G., Ramseger,R., Loschinger,J., Woll,S., Porten,E., Abraham,C., Rugg,M.A., und Kroger,S. (2006). Clustering transmembrane-agrin induces filopodia-like processes on axons und dendrites. *Mol. Cell Neurosci.* 31, 515-524.

Anton,E.S., Kreidberg,J.A., und Rakic,P. (1999). Distinct functions of alpha3 und alpha(v) integrin receptors in neuronal migration und laminar organization of the cerebral cortex. *Neuron* 22, 277-289.

Aplin,A.E., Howe,A., Alahari,S.K., und Juliano,R.L. (1998). Signal transduction und signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, und selectins. *Pharmacol. Rev.* 50, 197-263.

Argraves,W.S., Greene,L.M., Cooley,M.A., und Gallagher,W.M. (2003). Fibulins: physiological und disease perspectives. *EMBO Rep.* 4, 1127-1131.

Armin A.Dorner (2001). Analyse der in vivo Funktion eines neuronalen Mitgliedes der Immunoglobulinsuperfamilie durch Generierung defizienter und transgener überexprimierender Mäuse. Dissertation.

Ashbourne Excoffon,K.J., Moninger,T., und Zabner,J. (2003). The coxsackie B virus und adenovirus receptor resides in a distinct membrane microdomain. *J. Virol.* 77, 2559-2567.

Asher,D.R., Cerny,A.M., Weiler,S.R., Horner,J.W., Keeler,M.L., Neptune,M.A., Jones,S.N., Bronson,R.T., Depinho,R.A., und Finberg,R.W. (2005). Coxsackievirus und adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis.* 42, 77-85.

Banerjee,S.A., Hadjiargyrou,M., und Patterson,P.H. (1997). An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially alpha3beta1 integrin-dependent manner. *J. Neurosci.* 17, 2756-2765.

Behlke,J. und Ristau,O. (1997). Analysis of interacting biopolymer systems by analytical ultracentrifugation. *Eur. Biophys. J.* 25, 325-332.

Benecky,M.J., Kolvenbach,C.G., Amrani,D.L., und Mosesson,M.W. (1988). Evidence that binding to the carboxyl-terminal heparin-binding domain (Hep II) dominates the interaction between plasma fibronectin und heparin. *Biochemistry* 27, 7565-7571.

Benson,D.L. und Tanaka,H. (1998). N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 18, 6892-6904.

Bergelson,J.M. (1999). Receptors mediating adenovirus attachment und internalization. *Biochem. Pharmacol.* 57, 975-979.

Literaturverzeichnis

- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., und Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses und adenoviruses 2 und 5. *Science* 275, 1320-1323.
- Bergelson, J.M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M.S., Wickham, T., Crowell, R.L., und Finberg, R.W. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses und adenoviruses. *J. Virol.* 72, 415-419.
- Bernal, R.M., Sharma, S., Gardner, B.K., Douglas, J.T., Bergelson, J.M., Dubinett, S.M., und Batra, R.K. (2002). Soluble coxsackievirus adenovirus receptor is a putative inhibitor of adenoviral gene transfer in the tumor milieu. *Clin. Cancer Res.* 8, 1915-1923.
- Bewley, M.C., Springer, K., Zhang, Y.B., Freimuth, P., und Flanagan, J.M. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* 286, 1579-1583.
- Bezakova, G. und Ruegg, M.A. (2003). New insights into the roles of agrin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 295-308.
- Bi, X., Lynch, G., Zhou, J., und Gall, C.M. (2001). Polarized distribution of alpha5 integrin in dendrites of hippocampal und cortical neurons. *J. Comp Neurol.* 435, 184-193.
- Biederer, T., Sara, Y., Mozhayeva, M., Atasoy, D., Liu, X., Kavalali, E.T., und Sudhof, T.C. (2002). SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* 297, 1525-1531.
- Birbach, A. (2008). Profilin, a multi-modal regulator of neuronal plasticity. *BioEssays* 30 994-1002.
- Bixby, J.L. und Harris, W.A. (1991). Molecular mechanisms of axon growth und guidance. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 117-159.
- Bloom, L., Ingham, K.C., und Hynes, R.O. (1999). Fibronectin regulates assembly of actin filaments und focal contacts in cultured cells via the heparin-binding site in repeat III13. *Mol. Biol. Cell* 10, 1521-1536.
- Boudreau, N.J. und Jones, P.L. (1999). Extracellular matrix und integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem. J.* 339 (Pt 3), 481-488.
- Bowe, M.A. und Fallon, J.R. (1995). The role of agrin in synapse formation. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 443-462.
- Bowles, K.R., Gibson, J., Wu, J., Shaffer, L.G., Towbin, J.A., und Bowles, N.E. (1999). Genomic organization und chromosomal localization of the human Coxsackievirus B-adenovirus receptor gene. *Hum. Genet.* 105, 354-359.
- Bradshaw, A.D., McNagny, K.M., Gervin, D.B., Cann, G.M., Graf, T., und Clegg, D.O. (1995). Integrin alpha 2 beta 1 mediates interactions between developing embryonic retinal cells und collagen. *Development* 121, 3593-3602.
- Broderick, M.J. und Winder, S.J. (2005). Spectrin, alpha-actinin, und dystrophin. *Adv. Protein Chem.* 70, 203-246.

Literaturverzeichnis

- Brown, E.J. und Frazier, W.A. (2001). Integrin-associated protein (CD47) und its ligands. *Trends Cell Biol.* *11*, 130-135.
- Brümmendorf, T. und Rathjen, F.G. (1995). Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile.* *2*, 963-1108.
- Bruning, A., Stickeler, E., Diederich, D., Walz, L., Rohleder, H., Friese, K., und Runnebaum, I.B. (2005). Coxsackie und adenovirus receptor promotes adenocarcinoma cell survival und is expressionally activated after transition from preneoplastic precursor lesions to invasive adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* *11*, 4316-4320.
- Burden, S.J. (2002). Building the vertebrate neuromuscular synapse. *J. Neurobiol.* *53*, 501-511.
- Burden, S.J., Sargent, P.B., und McMahan, U.J. (1979). Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. *J. Cell Biol.* *82*, 412-425.
- Burgeson, R.E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G.R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J., und . (1994). A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol.* *14*, 209-211.
- Burkin, D.J., Gu, M., Hodges, B.L., Campanelli, J.T., und Kaufman, S.J. (1998). A functional role for specific spliced variants of the alpha7beta1 integrin in acetylcholine receptor clustering. *J. Cell Biol.* *143*, 1067-1075.
- Burkin, D.J., Kim, J.E., Gu, M., und Kaufman, S.J. (2000). Laminin und alpha7beta1 integrin regulate agrin-induced clustering of acetylcholine receptors. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 16)*, 2877-2886.
- Cann, G.M., Bradshaw, A.D., Gervin, D.B., Hunter, A.W., und Clegg, D.O. (1996). Widespread expression of beta1 integrins in the developing chick retina: evidence for a role in migration of retinal ganglion cells. *Dev. Biol.* *180*, 82-96.
- Carson, S.D. (2000). Limited proteolysis of the coxsackievirus und adenovirus receptor (CAR) on HeLa cells exposed to trypsin. *FEBS Lett.* *484*, 149-152.
- Carson, S.D. (2004). Coxsackievirus und adenovirus receptor (CAR) is modified und shed in membrane vesicles. *Biochemistry* *43*, 8136-8142.
- Carson, S.D. und Chapman, N.M. (2001). Coxsackievirus und adenovirus receptor (CAR) binds immunoglobulins. *Biochemistry* *40*, 14324-14329.
- Carson, S.D., Chapman, N.N., und Tracy, S.M. (1997). Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *233*, 325-328.
- Chen, J.W., Ghosh, R., Finberg, R.W., und Bergelson, J.M. (2003). Structure und chromosomal localization of the murine coxsackievirus und adenovirus receptor gene. *DNA Cell Biol.* *22*, 253-259.
- Chen, J.W., Zhou, B., Yu, Q.C., Shin, S.J., Jiao, K., Schneider, M.D., Baldwin, H.S., und Bergelson, J.M. (2006). Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus und adenovirus recep-

Literaturverzeichnis

tor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle und abnormalities of sinuatrial valves. *Circ. Res.* 98, 923-930.

Cheng, Y.S., Champlaud, M.F., Burgeson, R.E., Marinkovich, M.P., und Yurchenco, P.D. (1997). Self-assembly of laminin isoforms. *J. Biol. Chem.* 272, 31525-31532.

Chretien, I., Marcuz, A., Courtet, M., Katevuo, K., Vainio, O., Heath, J.K., White, S.J., und Du, P.L. (1998). CTX, a *Xenopus* thymocyte receptor, defines a molecular family conserved throughout vertebrates. *Eur. J. Immunol.* 28, 4094-4104.

Clegg, D.O., Wingerd, K.L., Hikita, S.T., und Tolhurst, E.C. (2003). Integrins in the development, function und dysfunction of the nervous system. *Front Biosci.* 8, d723-d750.

Cohen, C.J., Gaetz, J., Ohman, T., und Bergelson, J.M. (2001a). Multiple regions within the coxsackievirus und adenovirus receptor cytoplasmic domain are required for basolateral sorting. *J. Biol. Chem.* 276, 25392-25398.

Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T., und Bergelson, J.M. (2001b). The coxsackievirus und adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15191-15196.

Cohen, M.W., Hoffstrom, B.G., und DeSimone, D.W. (2000). Active zones on motor nerve terminals contain alpha 3beta 1 integrin. *J. Neurosci.* 20, 4912-4921.

Colognato, H., Winkelmann, D.A., und Yurchenco, P.D. (1999). Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J. Cell Biol.* 145, 619-631.

Colognato, H. und Yurchenco, P.D. (2000). Form und function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218, 213-234.

Comoletti, D., Grishaev, A., Whitten, A.E., Tsigelny, I., Taylor, P., und Trehwella, J. (2007). Synaptic arrangement of the neuroligin/beta-neurexin complex revealed by X-ray und neutron scattering. *Structure.* 15, 693-705.

Coyne, C.B. und Bergelson, J.M. (2005). CAR: a virus receptor within the tight junction. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 869-882.

Coyne, C.B., Voelker, T., Pichla, S.L., und Bergelson, J.M. (2004). The coxsackievirus und adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J. Biol. Chem.* 279, 48079-48084.

da Silva, J.S., Medina, M., Zuliani, C., Di Nardo, A., Witke, W., und Dotti, C.G. (2003). RhoA/ROCK regulation of neuritegenesis via profilin IIa-mediated control of actin stability. *J. Cell Biol.* 162, 1267-1279.

Dalldorff, G. und Sickles, G.M. (1948). An Unidentified, Filtrable Agent Isolated From the Feces of Children With Paralysis. *Science* 108, 61-62.

Dalva, M.B., Takasu, M.A., Lin, M.Z., Shamah, S.M., Hu, L., Gale, N.W., und Greenberg, M.E. (2000). EphB receptors interact with NMDA receptors und regulate excitatory synapse formation. *Cell* 103, 945-956.

Literaturverzeichnis

- de, C., I und Reichardt, L.F. (1993). Function und spatial distribution in developing chick retina of the laminin receptor alpha 6 beta 1 und its isoforms. *Development* 118, 377-388.
- Dechecchi, M.C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M., und Cabrini, G. (2001). Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 und 5. *Journal of Virology* 75, 8772-8780.
- Dechecchi, M.C., Tamanini, A., Bonizzato, A., und Cabrini, G. (2000). Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 und 2-host cell interactions. *Virology* 268, 382-390.
- DeChiara, T.M., Bowen, D.C., Valenzuela, D.M., Simmons, M.V., Poueymirou, W.T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D.L., Rojas, E., Park, J.S., Smith, C., DiStefano, P.S., Glass, D.J., Burden, S.J., und Yancopoulos, G.D. (1996). The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell* 85, 501-512.
- DeFreitas, M.F., Yoshida, C.K., Frazier, W.A., Mendrick, D.L., Kypta, R.M., und Reichardt, L.F. (1995). Identification of integrin alpha 3 beta 1 as a neuronal thrombospondin receptor mediating neurite outgrowth. *Neuron* 15, 333-343.
- Delwel, G.O. und Sonnenberg, A. (1996). Laminin isoforms und their integrin receptors. In *Adhesion receptors as therapeutic targets*, M.A.Horton, ed. (Boca Raton: CRC Press), pp. 9-36.
- Denda, S. und Reichardt, L.F. (2007). Studies on integrins in the nervous system. *Methods Enzymol.* 426, 203-221.
- Dityatev, A. und Schachner, M. (2006). The extracellular matrix und synapses. *Cell Tissue Res.* 326, 647-654.
- Dorner, A., Xiong, D.D., Couch, K., Yajima, T., und Knowlton, K.U. (2004). Alternatively spliced soluble coxsackie-adenovirus receptors inhibit coxsackievirus infection. *Journal of Biological Chemistry* 279, 18497-18503.
- Dorner, A.A., Wegmann, F., Butz, S., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Mack, A., Nasdala, I., August, B., Westermann, J., Rathjen, F.G., und Vestweber, D. (2005). Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J. Cell Sci.* 118, 3509-3521.
- Drake, S.L., Varnum, J., Mayo, K.H., Letourneau, P.C., Furcht, L.T., und McCarthy, J.B. (1993). Structural features of fibronectin synthetic peptide FN-C/H II, responsible for cell adhesion, neurite extension, und heparan sulfate binding. *J. Biol. Chem.* 268, 15859-15867.
- Du, P.L., Courtet, M., und Chretien, I. (1999). Duplication und MHC linkage of the CTX family of genes in *Xenopus* und in mammals. *Eur. J. Immunol.* 29, 1729-1739.
- Einheber, S., Pierce, J.P., Chow, D., Znamensky, V., Schnapp, L.M., und Milner, T.A. (2001). Dentate hilar mossy cells und somatostatin-containing neurons are immunoreactive for the alpha8 integrin subunit: characterization in normal und kainic acid-treated rats. *Neuroscience* 105, 619-638.
- Ethell, I.M., Irie, F., Kalo, M.S., Couchman, J.R., Pasquale, E.B., und Yamaguchi, Y. (2001). EphB/syndecan-2 signaling in dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 31, 1001-1013.

Literaturverzeichnis

- Ethell, I.M. und Yamaguchi, Y. (1999). Cell surface heparan sulfate proteoglycan syndecan-2 induces the maturation of dendritic spines in rat hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* *144*, 575-586.
- Excoffon, K.J., Gansemer, N., Traver, G., und Zabner, J. (2007). Functional effects of coxsackievirus und adenovirus receptor glycosylation on homophilic adhesion und adenoviral infection. *J. Virol.* *81*, 5573-5578.
- Excoffon, K.J., Hruska-Hageman, A., Klotz, M., Traver, G.L., und Zabner, J. (2004). A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus und adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion und growth. *J. Cell Sci.* *117*, 4401-4409.
- Excoffon, K.J., Traver, G.L., und Zabner, J. (2005). The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus und adenovirus receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *32*, 498-503.
- Faham, S., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Linhardt, R.J., und Rees, D.C. (1996). Heparin structure und interactions with basic fibroblast growth factor. *Science* *271*, 1116-1120.
- Fechner, H., Haack, A., Wang, H., Wang, X., Eizema, K., Pauschinger, M., Schoemaker, R., Veghel, R., Houtsmuller, A., Schultheiss, H.P., Lamers, J., und Poller, W. (1999). Expression of coxsackie adenovirus receptor und alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther.* *6*, 1520-1535.
- Flanagan, M.L., Arias, R.S., Hu, P., Khawli, L.A., und Epstein, A.L. (2007). Soluble Fc fusion proteins for biomedical research. *Methods Mol. Biol.* *378*, 33-52.
- Fok, P.T., Huang, K.C., Holland, P.C., und Nalbantoglu, J. (2007). The Coxsackie und adenovirus receptor binds microtubules und plays a role in cell migration. *J. Biol. Chem.* *282*, 7512-7521.
- Ford-Perriss, M., Turner, K., Guimond, S., Apedaile, A., Haubeck, H.D., Turnbull, J., und Murphy, M. (2003). Localisation of specific heparan sulfate proteoglycans during the proliferative phase of brain development. *Dev. Dyn.* *227*, 170-184.
- Freimuth, P., Philipson, L., und Carson, S.D. (2008). The coxsackievirus und adenovirus receptor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *323*, 67-87.
- Freimuth, P., Springer, K., Berard, C., Hainfeld, J., Bewley, M., und Flanagan, J. (1999). Coxsackievirus und adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 und fiber knob from adenovirus type 12. *J. Virol.* *73*, 1392-1398.
- Galileo, D.S., Majors, J., Horwitz, A.F., und Sanes, J.R. (1992). Retrovirally introduced antisense integrin RNA inhibits neuroblast migration in vivo. *Neuron* *9*, 1117-1131.
- Gardner, H., Kreidberg, J., Koteliansky, V., und Jaenisch, R. (1996). Deletion of integrin alpha 1 by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev. Biol.* *175*, 301-313.
- Gautam, M., DeChiara, T.M., Glass, D.J., Yancopoulos, G.D., und Sanes, J.R. (1999). Distinct phenotypes of mutant mice lacking agrin, MuSK, or rapsyn. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *114*, 171-178.

Literaturverzeichnis

- Gautam,M., Noakes,P.G., Moscoso,L., Rupp,F., Scheller,R.H., Merlie,J.P., und Sanes,J.R. (1996). Defective neuromuscular synaptogenesis in agrin-deficient mutant mice. *Cell* 85, 525-535.
- Gautam,M., Noakes,P.G., Mudd,J., Nichol,M., Chu,G.C., Sanes,J.R., und Merlie,J.P. (1995). Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature* 377, 232-236.
- Geiger,B., Bershadsky,A., Pankov,R., und Yamada,K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 793-805.
- George,E.L., Georges-Labouesse,E.N., Patel-King,R.S., Rayburn,H., und Hynes,R.O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube und vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119, 1079-1091.
- Georges-Labouesse,E., Mark,M., Messaddeq,N., und Gansmuller,A. (1998). Essential role of alpha 6 integrins in cortical und retinal lamination. *Curr. Biol.* 8, 983-986.
- Giancotti,F.G. und Ruoslahti,E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.
- Godfrey,E.W., Nitkin,R.M., Wallace,B.G., Rubin,L.L., und McMahan,U.J. (1984). Components of Torpedo electric organ und muscle that cause aggregation of acetylcholine receptors on cultured muscle cells. *J. Cell Biol.* 99, 615-627.
- Goodman,C.S. und Shatz,C.J. (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* 72 *Suppl.*, 77-98.
- Greene,D.K., Tumova,S., Couchman,J.R., und Woods,A. (2003). Syndecan-4 associates with alpha-actinin. *J. Biol. Chem.* 278, 7617-7623.
- Groves,A.K. und Bronner-Fraser,M. (1999). Neural crest diversification. *Curr. Top. Dev. Biol.* 43, 221-258.
- Grumet,M. und Edelman,G.M. (1988). Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons und astroglia via different binding mechanisms. *J. Cell Biol.* 106, 487-503.
- Hama,H., Hara,C., Yamaguchi,K., und Miyawaki,A. (2004). PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* 41, 405-415.
- Hanahan,D. (1985). Techniques for Transformation of E. coli. In *DNA Cloning*, D.M.Glover, ed. (Washington D.C.: IRL press Oxford).
- Harada,H., Suzu,S., Hayashi,Y., und Okada,S. (2005). BT-IgSF, a novel immunoglobulin superfamily protein, functions as a cell adhesion molecule. *J. Cell Physiol* 204, 919-926.
- Hata,A., Ridinger,D.N., Sutherland,S., Emi,M., Shuhua,Z., Myers,R.L., Ren,K., Cheng,T., Inoue,I., Wilson,D.E., und . (1993). Binding of lipoprotein lipase to heparin. Identification of five critical residues in two distinct segments of the amino-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 268, 8447-8457.

Literaturverzeichnis

- Hattori,M., Fujiyama,A., Taylor,T.D., Watanabe,H., Yada,T., Park,H.S., Toyoda,A., Ishii,K., Totoki,Y., Choi,D.K., Groner,Y., Soeda,E., Ohki,M., Takagi,T., Sakaki,Y., Taudien,S., Blechschmidt,K., Polley,A., Menzel,U., Delabar,J., Kumpf,K., Lehmann,R., Patterson,D., Reichwald,K., Rump,A., Schillhabel,M., Schudy,A., Zimmermann,W., Rosenthal,A., Kudoh,J., Schibuya,K., Kawasaki,K., Asakawa,S., Shintani,A., Sasaki,T., Nagamine,K., Mitsuyama,S., Antonarakis,S.E., Minoshima,S., Shimizu,N., Nordsiek,G., Hornischer,K., Brant,P., Scharfe,M., Schon,O., Desario,A., Reichelt,J., Kauer,G., Blocker,H., Ramser,J., Beck,A., Klages,S., Hennig,S., Riesselmann,L., Dagand,E., Haaf,T., Wehrmeyer,S., Borzym,K., Gardiner,K., Nizetic,D., Francis,F., Lehrach,H., Reinhardt,R., und Yaspo,M.L. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405, 311-319.
- He,Y., Chipman,P.R., Howitt,J., Bator,C.M., Whitt,M.A., Baker,T.S., Kuhn,R.J., Anderson,C.W., Freimuth,P., und Rossmann,M.G. (2001). Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor. *Nat. Struct. Biol.* 8, 874-878.
- Heath,J.K., White,S.J., Johnstone,C.N., Catimel,B., Simpson,R.J., Moritz,R.L., Tu,G.F., Ji,H., Whitehead,R.H., Groenen,L.C., Scott,A.M., Ritter,G., Cohen,L., Welt,S., Old,L.J., Nice,E.C., und Burgess,A.W. (1997). The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein und a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 469-474.
- Henry,M.D. und Campbell,K.P. (1999). Dystroglycan inside und out. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 602-607.
- Hienola,A., Tumova,S., Kuleskiy,E., und Rauvala,H. (2006). N-syndecan deficiency impairs neural migration in brain. *J. Cell Biol.* 174, 569-580
- Hirata,K., Ishida,T., Penta,K., Rezaee,M., Yang,E., Wohlgenuth,J., und Quertermous,T. (2001). Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 16223-16231.
- Hirsch,E., Gullberg,D., Balzac,F., Altruda,F., Silengo,L., und Tarone,G. (1994). Alpha v integrin subunit is predominantly located in nervous tissue und skeletal muscle during mouse development. *Dev. Dyn.* 201, 108-120.
- Hiscott,P., Waller,H.A., Grierson,I., Butler,M.G., und Scott,D. (1992). Local production of fibronectin by ectopic human retinal cells. *Cell Tissue Res.* 267, 185-192.
- Honda,T., Saitoh,H., Masuko,M., Katagiri-Abe,T., Tominaga,K., Kozakai,I., Kobayashi,K., Kumanishi,T., Watanabe,Y.G., Odani,S., und Kuwano,R. (2000). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 77, 19-28.
- Hotta,Y., Honda,T., Naito,M., und Kuwano,R. (2003). Developmental distribution of coxsackie virus und adenovirus receptor localized in the nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 143, 1-13.
- Huang,K.C., Yasrael,Z., Guerin,C., Holland,P.C., und Nalbantoglu,J. (2007). Interaction of the Coxsackie und adenovirus receptor (CAR) with the cytoskeleton: binding to actin. *FEBS Lett.* 581, 2702-2708.
- Hynes,R.O. und Lander,A.D. (1992). Contact und adhesive specificities in the associations, migrations, und targeting of cells und axons. *Cell* 68, 303-322.

Literaturverzeichnis

- Ingham, K.C., Brew, S.A., und Atha, D.H. (1990). Interaction of heparin with fibronectin und isolated fibronectin domains. *Biochem. J.* 272, 605-611.
- Jiang, S. und Caffrey, M. (2007). Solution structure of the coxsackievirus und adenovirus receptor domain 2. *Protein Sci.* 16, 539-542.
- Jiang, S., Jacobs, A., Laue, T.M., und Caffrey, M. (2004). Solution structure of the coxsackievirus und adenovirus receptor domain 1. *Biochemistry* 43, 1847-1853.
- Joester, A. und Faissner, A. (2001). The structure und function of tenascins in the nervous system. *Matrix Biology* 20, 13-22.
- Johansson, S., Svineng, G., Wennerberg, K., Armulik, A., und Lohikangas, L. (1997). Fibronectin-Integrin Interactions. *Frontiers In Bioscience* 2, 126-146.
- Johnson, C.P., Fujimoto, I., Perrin-Tricaud, C., Rutishauser, U., und Leckband, D. (2004). Mechanism of homophilic adhesion by the neural cell adhesion molecule: use of multiple domains und flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6963-6968.
- Johnstone, C.N., Tebbutt, N.C., Abud, H.E., White, S.J., Stenvers, K.L., Hall, N.E., Cody, S.H., Whitehead, R.H., Catimel, B., Nice, E.C., Burgess, A.W., und Heath, J.K. (2000). Characterization of mouse A33 antigen, a definitive marker for basolateral surfaces of intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 279, G500-G510.
- Jones, L.S. (1996). Integrins: possible functions in the adult CNS. *Trends Neurosci.* 19, 68-72.
- Juliano, R.L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors und the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, und immunoglobulin-superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42, 283-323.
- Jüttner, R., More, M.I., Das, D., Babich, A., Meier, J., Henning, M., Erdmann, B., Müller, E.C., Otto, A., Grantyn, R., und Rathjen, F.G. (2005). Impaired synapse function during postnatal development in the absence of CALEB, an EGF-like protein processed by neuronal activity. *Neuron* 46, 233-245.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., und Jessell, T.M. (1996). *Neurowissenschaften - Eine Einführung.* (Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag).
- Kavinsky, C.J. und Garber, B.B. (1979). Fibronectin associated with the glial component of embryonic brain cell cultures. *J. Supramol. Struct.* 11, 269-281.
- Kiryushko, D., Berezin, V., und Bock, E. (2004). Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014, 140-154.
- Koch, M., Olson, P.F., Albus, A., Jin, W., Hunter, D.D., Brunken, W.J., Burgeson, R.E., und Champlaud, M.F. (1999). Characterization und expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J. Cell Biol.* 145, 605-618.
- Kramar, E.A., Bernard, J.A., Gall, C.M., und Lynch, G. (2002). Alpha3 integrin receptors contribute to the consolidation of long-term potentiation. *Neuroscience* 110, 29-39.

Literaturverzeichnis

- Lambrechts,A., Jonckheere,V., Peleman,C., Polet,D., De Vos,W., Vandekerckhove,J., und Ampe,C. (2006). Profilin-I-ligand interactions influence various aspects of neuronal differentiation. *Journal of Cell Science* *119*, 1570-1578.
- Lee,S.J. und Benveniste,E.N. (1999). Adhesion molecule expression und regulation on cells of the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* *98*, 77-88.
- Leiss,M., Beckmann,K., Giros,A., Costell,M., und Fassler,R. (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 502-507.
- Leon,R.P., Hedlund,T., Meech,S.J., Li,S., Schaack,J., Hunger,S.P., Duke,R.C., und DeGregori,J. (1998). Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 13159-13164.
- Leopold,P.L., Kreitzer,G., Miyazawa,N., Rempel,S., Pfister,K.K., Rodriguez-Boulan,E., and Crystal,R.G. (2000). Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum. Gene Ther.* *11*, 151-165.
- Libby,R.T., Champliand,M.F., Claudepierre,T., Xu,Y., Gibbons,E.P., Koch,M., Burgeson,R.E., Hunter,D.D., und Brunken,W.J. (2000). Laminin expression in adult und developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J. Neurosci.* *20*, 6517-6528.
- Lim,B.K., Xiong,D., Dorner,A., Youn,T.J., Yung,A., Liu,T.I., Gu,Y., Dalton,N.D., Wright,A.T., Evans,S.M., Chen,J., Peterson,K.L., McCulloch,A.D., Yajima,T., und Knowlton,K.U. (2008). Coxsackievirus und adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function und connexin 45 localization in the murine heart. *J. Clin. Invest* *118*, 2758-2770.
- Lisewski,U., Shi,Y., Wrackmeyer,U., Fischer,R., Chen,C., Schirdewan,A., Juttner,R., Rathjen,F., Poller,W., Radke,M.H., und Gotthardt,M. (2008). The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction und cell-cell communication. *J. Exp. Med.* *205*, 2369-2379.
- Lois,C., Garcia-Verdugo,J.M., und Alvarez-Buylla,A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* *271*, 978-981.
- Lonberg-Holm,K., Crowell,R.L., und Philipson,L. (1976). Unrelated animal viruses share receptors. *Nature* *259*, 679-681.
- Mandell,K.J. und Parkos,C.A. (2005). The JAM family of proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 857-867.
- Martin,P.T., Kaufman,S.J., Kramer,R.H., und Sanes,J.R. (1996). Synaptic integrins in developing, adult, und mutant muscle: selective association of alpha1, alpha7A, und alpha7B integrins with the neuromuscular junction. *Dev. Biol.* *174*, 125-139.
- Martin,P.T. und Sanes,J.R. (1997). Integrins mediate adhesion to agrin und modulate agrin signaling. *Development* *124*, 3909-3917.
- Martino,T.A., Petric,M., Weingartl,H., Bergelson,J.M., Opavsky,M.A., Richardson,C.D., Modlin,J.F., Finberg,R.W., Kain,K.C., Willis,N., Gauntt,C.J., und Liu,P.P. (2000). The coxsackie-adenovirus receptor (CAR) is used by reference strains und clinical isolates represent-

Literaturverzeichnis

- ing all six serotypes of coxsackievirus group B und by swine vesicular disease virus. *Virology* 271, 99-108.
- McKerracher,L., Chamoux,M., und Arregui,C.O. (1996). Role of laminin und integrin interactions in growth cone guidance. *Mol. Neurobiol.* 12, 95-116.
- McMahan,U.J. (1990). The agrin hypothesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 55, 407-418.
- McMahan,U.J. und Slater,C.R. (1984). The influence of basal lamina on the accumulation of acetylcholine receptors at synaptic sites in regenerating muscle. *J. Cell Biol.* 98, 1453-1473.
- Miner,J.H. (2008). Laminins und their roles in mammals. *Microscopy Research und Technique* 71, 349-356.
- Miner,J.H., Patton,B.L., Lentz,S.I., Gilbert,D.J., Snider,W.D., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., und Sanes,J.R. (1997). The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, und chromosomal locations of alpha 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, und cloning of a novel alpha3 isoform. *J. Cell Biol.* 137, 685-701.
- Mirza,M., Hreinsson,J., Strand,M.L., Hovatta,O., Soder,O., Philipson,L., Pettersson,R.F., und Sollerbrant,K. (2006). Coxsackievirus und adenovirus receptor (CAR) is expressed in male germ cells und forms a complex with the differentiation factor JAM-C in mouse testis. *Exp. Cell Res.* 312, 817-830.
- Mirza,M., Raschperger,E., Philipson,L., Pettersson,R.F., und Sollerbrant,K. (2005). The cell surface protein coxsackie- und adenovirus receptor (CAR) directly associates with the Ligand-of-Numb Protein-X2 (LNX2). *Exp. Cell Res.* 309, 110-120.
- Moulson,C.L., Li,C., und Miner,J.H. (2001). Localization of Lutheran, a novel laminin receptor, in normal, knockout, und transgenic mice suggests an interaction with laminin alpha5 in vivo. *Dev. Dyn.* 222, 101-114.
- Mourey,L., Samama,J.P., Delarue,M., Petitou,M., Choay,J., und Moras,D. (1993). Crystal structure of cleaved bovine antithrombin III at 3.2 A resolution. *J. Mol. Biol.* 232, 223-241.
- Muckelbauer,J.K., Kremer,M., Minor,I., Diana,G., Dutko,F.J., Groarke,J., Pevear,D.C., und Rossmann,M.G. (1995). The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 A resolution. *Structure* 3, 653-667.
- Müller,A.W. und Hassel,M. (2003). *Entwicklungsbiologie.* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- Muller,U., Wang,D., Denda,S., Meneses,J.J., Pedersen,R.A., und Reichardt,L.F. (1997). Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88, 603-613.
- Mullis,K.B. und Faloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Murase,S. und Hayashi,Y. (1996). Expression pattern of integrin beta 1 subunit in Purkinje cells of rat und cerebellar mutant mice. *J. Comp Neurol.* 375, 225-237.

Literaturverzeichnis

- Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpata, G., und Holland, P.C. (1999). Expression of the primary coxsackie und adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation und limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum. Gene Ther.* *10*, 1009-1019.
- Nikonenko, I., Toni, N., Moosmayer, M., Shigeri, Y., Muller, D., und Sargent, J.L. (2003). Integrins are involved in synaptogenesis, cell spreading, und adhesion in the postnatal brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *140*, 185-194.
- Niquet, J., Jorquera, I., Faissner, A., Ben Ari, Y., und Represa, A. (1995). Gliosis und axonal sprouting in the hippocampus of epileptic rats are associated with an increase of tenascin-C immunoreactivity. *J. Neurocytol.* *24*, 611-624.
- Nitkin, R.M., Smith, M.A., Magill, C., Fallon, J.R., Yao, Y.M., Wallace, B.G., und McMahhan, U.J. (1987). Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. *J. Cell Biol.* *105*, 2471-2478.
- Noakes, P.G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J.R., und Merlie, J.P. (1995). Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature* *374*, 258-262.
- Nörenberg, U., Hubert, M., Brümmendorf, T., Tarnok, A., und Rathjen, F.G. (1995). Characterization of functional domains of the tenascin-R (restrictin) polypeptide: cell attachment site, binding with F11, und enhancement of F11-mediated neurite outgrowth by tenascin-R. *J. Cell Biol.* *130*, 473-484.
- Noutsias, M., Fechner, H., de Jonge, H., Wang, X., Dekkers, D., Houtsmuller, A.B., Pauschinger, M., Bergelson, J., Warraich, R., Yacoub, M., Hetzer, R., Lamers, J., Schultheiss, H.P., und Poller, W. (2001). Human coxsackie-adenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) und alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma und upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* *104*, 275-280.
- Nüsslein-Volhard, C. (2004). Das Werden des Lebens. Wie Gene die Entwicklung steuern.
- Oh, E.S. und Couchman, J.R. (2004). Syndecans-2 and-4; Close cousins, but not identical twins. *Molecules und Cells* *17*, 181-187.
- Okegawa, T., Li, Y., Pong, R.C., Bergelson, J.M., Zhou, J., und Hsieh, J.T. (2000). The dual impact of coxsackie und adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res.* *60*, 5031-5036.
- Okegawa, T., Pong, R.C., Li, Y., Bergelson, J.M., Sagalowsky, A.I., und Hsieh, J.T. (2001). The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie und adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res.* *61*, 6592-6600.
- Otey, C.A. und Carpen, O. (2004). Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil. Cytoskeleton* *58*, 104-111.
- Otey, C.A., Vasquez, G.B., Burrige, K., und Erickson, B.W. (1993). Mapping of the Alpha-Actinin Binding-Site Within the Beta-1 Integrin Cytoplasmic Domain. *Journal of Biological Chemistry* *268*, 21193-21197.

Literaturverzeichnis

- Pankov,R. und Yamada,K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* *115*, 3861-3863.
- Parsons,M.J., Pollard,S.M., Saude,L., Feldman,B., Coutinho,P., Hirst,E.M., und Stemple,D.L. (2002). Zebrafish mutants identify an essential role for laminins in notochord formation. *Development* *129*, 3137-3146.
- Parsons,S.F., Lee,G., Spring,F.A., Willig,T.N., Peters,L.L., Gimm,J.A., Tanner,M.J., Mohandas,N., Anstee,D.J., und Chasis,J.A. (2001). Lutheran blood group glycoprotein und its newly characterized mouse homologue specifically bind alpha5 chain-containing human laminin with high affinity. *Blood* *97*, 312-320.
- Patton,B.L. (2000). Laminins of the neuromuscular system. *Microsc. Res. Tech.* *51*, 247-261.
- Patzke,C. (2004). Untersuchung eines adhäsionshemmenden Effektes von gegen den Coxsackie- und Adenovirusrezeptor gerichteten Antikörpern in Bezug auf HeLa-Zellen und dessen Neutralisierung durch fötales Kälberserum. Diplomarbeit.
- Pavlov,I., Lauri,S., Taira,T., und Rauvala,H. (2004). The role of ECM molecules in activity-dependent synaptic development und plasticity. *Birth Defects Res. C Embryo. Today* *72*, 12-24.
- Peterson,J.A., Sheibani,N., David,G., Garcia-Pardo,A., und Peters,D.M. (2005). Heparin II domain of fibronectin uses alpha4beta1 integrin to control focal adhesion und stress fiber formation, independent of syndecan-4. *J. Biol. Chem.* *280*, 6915-6922.
- Petrella,J., Cohen,C.J., Gaetz,J., und Bergelson,J.M. (2002). A zebrafish coxsackievirus und adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus und adenovirus. *J. Virol.* *76*, 10503-10506.
- Pierschbacher,M.D., Ruoslahti,E., Sundelin,J., Lind,P., und Peterson,P.A. (1982). The cell attachment domain of fibronectin. Determination of the primary structure. *J. Biol. Chem.* *257*, 9593-9597.
- Prada,C., Puelles,L., und Genis-Galvez,J.M. (1981). A golgi study on the early sequence of differentiation of ganglion cells in the chick embryo retina. *Anat. Embryol. (Berl)* *161*, 305-317.
- Rakic,P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia* *46*, 882-891.
- Raschperger,E., Engstrom,U., Pettersson,R.F., und Fuxe,J. (2004). CLMP, a novel member of the CTX family und a new component of epithelial tight junctions. *J. Biol. Chem.* *279*, 796-804.
- Raschperger,E., Thyberg,J., Pettersson,S., Philipson,L., Fuxe,J., und Pettersson,R.F. (2006). The coxsackie- und adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability und tissue homeostasis. *Exp. Cell Res.* *312*, 1566-1580.
- Rathjen,F.G. und Schachner,M. (1984). Immunocytological und biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* *3*, 1-10.

Literaturverzeichnis

- Rathjen, F.G., Wolff, J.M., Frank, R., Bonhoeffer, F., und Rutishauser, U. (1987). Membrane glycoproteins involved in neurite fasciculation. *J. Cell Biol.* *104*, 343-353.
- Reichardt, L.F. und Tomaselli, K.J. (1991). Extracellular matrix molecules und their receptors: functions in neural development. *Annu. Rev. Neurosci.* *14*, 531-570.
- Reizes, O., Benoit, S.C., und Clegg, D.J. (2008). The role of syndecans in the regulation of body weight und synaptic plasticity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 28-45.
- Rentsendorj, A., Agadjanian, H., Chen, X., Cirivello, M., Macveigh, M., Kedes, L., Hamm-Alvarez, S., und Medina-Kauwe, L.K. (2005). The Ad5 fiber mediates nonviral gene transfer in the absence of the whole virus, utilizing a novel cell entry pathway. *Gene Ther.* *12*, 225-237.
- Rogers, S.L., McCarthy, J.B., Palm, S.L., Furcht, L.T., und Letourneau, P.C. (1985). Neuron-specific interactions with two neurite-promoting fragments of fibronectin. *J. Neurosci.* *5*, 369-378.
- Roth, G. (1996). *Das Gehirn und seine Wirklichkeit.* (Frankfurt am Main: Suhrkamp Taschenbuch Wissenschaft).
- Ruegg, M.A. (2001). Molecules involved in the formation of synaptic connections in muscle und brain. *Matrix Biol.* *20*, 3-12.
- Sakai, T., Johnson, K.J., Murozono, M., Sakai, K., Magnuson, M.A., Wieloch, T., Cronberg, T., Isshiki, A., Erickson, H.P., und Fassler, R. (2001). Plasma fibronectin supports neuronal survival und reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing und hemostasis. *Nat. Med.* *7*, 324-330.
- Sakisaka, T. und Takai, Y. (2005). Cell adhesion molecules in the CNS. *J. Cell Sci.* *118*, 5407-5410.
- Sanes, J.R., Apel, E.D., Burgess, R.W., Emerson, R.B., Feng, G., Gautam, M., Glass, D., Grady, R.M., Krejci, E., Lichtman, J.W., Lu, J.T., Massoulié, J., Miner, J.H., Moscoso, L.M., Nguyen, Q., Nichol, M., Noakes, P.G., Patton, B.L., Son, Y.J., Yancopoulos, G.D., und Zhou, H. (1998). Development of the neuromuscular junction: genetic analysis in mice. *J. Physiol Paris* *92*, 167-172.
- Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D.F., Robinson, S.D., Hynes, R.O., und Goetinck, P.F. (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions und actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 2805-2810.
- Sasaki, T., Mann, K., Miner, J.H., Miosge, N., und Timpl, R. (2002). Domain IV of mouse laminin beta1 und beta2 chains. *Eur. J. Biochem.* *269*, 431-442.
- Sasaki, T. und Timpl, R. (2001). Domain IVa of laminin alpha5 chain is cell-adhesive und binds beta1 und alphaVbeta3 integrins through Arg-Gly-Asp. *FEBS Lett.* *509*, 181-185.
- Schechtman, D., Mochly-Rosen, D., und Ron, D. (2003). Glutathione S-transferase pull-down assay. *Methods Mol. Biol.* *233*, 345-350.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., und Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in non-neuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* *101*, 657-669.

Literaturverzeichnis

- Schwartz,I., Seger,D., und Shaltiel,S. (1999). Vitronectin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *31*, 539-544.
- Schwartz,M.A. (2001). Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* *11*, 466-470.
- Shapiro,L., Love,J., und Colman,D.R. (2007). Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function und diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* *30*, 451-474.
- Sharma,A., Askari,J.A., Humphries,M.J., Jones,E.Y., und Stuart,D.I. (1999). Crystal structure of a heparin- und integrin-binding segment of human fibronectin. *EMBO J.* *18*, 1468-1479.
- Shaw,C.A., Holland,P.C., Sinnreich,M., Allen,C., Sollerbrant,K., Karpati,G., und Nalbantoglu,J. (2004). Isoform-specific expression of the Coxsackie und adenovirus receptor (CAR) in neuromuscular junction und cardiac intercalated discs. *BMC Cell Biol.* *5*, 42.
- Shur,B.D. (1993). Glycosyltransferases as cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* *5*, 854-863.
- Simmons,D.L. (1993). Cloning cell surface molecules by transient expression in mammalian cells. In *Cellular Interactions in Development - a Practical Approach.*, D.A.Hartley, ed. (Oxford: IRL Press), pp. 93-128.
- Skeith,A., Dunlop,L., Galileo,D.S., und Linser,P.J. (1999). Inhibition of beta1-integrin expression reduces clone size during early retinogenesis. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *116*, 123-126.
- Sollerbrant,K., Raschperger,E., Mirza,M., Engstrom,U., Philipson,L., Ljungdahl,P.O., und Pettersson,R.F. (2003). The Coxsackievirus und adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-*numb* protein-X (LN_X). *J. Biol. Chem.* *278*, 7439-7444.
- Stettler,E.M. und Galileo,D.S. (2004). Radial glia produce und align the ligand fibronectin during neuronal migration in the developing chick brain. *J. Comp Neurol.* *468*, 441-451.
- Suzu,S., Hayashi,Y., Harumi,T., Nomaguchi,K., Yamada,M., Hayasawa,H., und Motoyoshi,K. (2002). Molecular cloning of a novel immunoglobulin superfamily gene preferentially expressed by brain und testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *296*, 1215-1221.
- Tachibana,I. und Hemler,M.E. (1999). Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 und CD81 in muscle cell fusion und myotube maintenance. *J. Cell Biol.* *146*, 893-904.
- Tessier-Lavigne,M. und Goodman,C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* *274*, 1123-1133.
- Testaz,S., Delannet,M., und Duband,J. (1999). Adhesion und migration of avian neural crest cells on fibronectin require the cooperating activities of multiple integrins of the (beta)1 und (beta)3 families. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 24)*, 4715-4728.
- Thelen,K., Kedar,V., Panicker,A.K., Schmid,R.S., Midkiff,B.R., und Maness,P.F. (2002). The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins. *J. Neurosci.* *22*, 4918-4931.

Literaturverzeichnis

- Thoelen,I., Magnusson,C., Tagerud,S., Polacek,C., Lindberg,M., und Van Ranst,M. (2001). Identification of alternative splice products encoded by the human coxsackie-adenovirus receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 216-222.
- Timpl,R. (1989). Structure und biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 180, 487-502.
- Timpl,R. (1996). Macromolecular organization of basement membranes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 618-624.
- Timpl,R., Sasaki,T., Kostka,G., und Chu,M.L. (2003). Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 479-489.
- Togashi,H., Abe,K., Mizoguchi,A., Takaoka,K., Chisaka,O., und Takeichi,M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35, 77-89.
- Tom,V.J., Doller,C.M., Malouf,A.T., und Silver,J. (2004). Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. *J. Neurosci.* 24, 9282-9290.
- Tomko,R.P., Johansson,C.B., Totrov,M., Abagyan,R., Frisen,J., und Philipson,L. (2000). Expression of the adenovirus receptor und its interaction with the fiber knob. *Exp. Cell Res.* 255, 47-55.
- Tomko,R.P., Xu,R., und Philipson,L. (1997). HCAR und MCAR: the human und mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses und group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 3352-3356.
- Tucker,A.L., Song,J., Zhang,X.Q., Wang,J., Ahlers,B.A., Carl,L.L., Mounsey,J.P., Moorman,J.R., Rothblum,L.I., und Cheung,J.Y. (2006). Altered contractility und $[Ca^{2+}]_i$ homeostasis in phospholemman-deficient murine myocytes: role of Na^+/Ca^{2+} exchange. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 291, H2199-H2209.
- van Raaij,M.J., Chouin,E., van der,Z.H., Bergelson,J.M., und Cusack,S. (2000). Dimeric structure of the coxsackievirus und adenovirus receptor D1 domain at 1.7 Å resolution. *Structure.* 8, 1147-1155.
- van't Hof,W. und Crystal,R.G. (2002). Fatty acid modification of the coxsackievirus und adenovirus receptor. *J. Virol.* 76, 6382-6386.
- Varoqueaux,F., Aramuni,G., Rawson,R.L., Mohrmann,R., Missler,M., Gottmann,K., Zhang,W., Sudhof,T.C., und Brose,N. (2006). Neuroligins determine synapse maturation und function. *Neuron* 51, 741-754.
- Venstrom,K.A. und Reichardt,L.F. (1993). Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules und their receptors in the nervous system. *FASEB J.* 7, 996-1003.
- Vestweber,D. und Blanks,J.E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins und their ligands. *Physiol Rev.* 79, 181-213.
- Vuento,M. und Vaheri,A. (1979). Purification of Fibronectin from Human Plasma by Affinity Chromatography under Non-Denaturing Conditions. *Biochem. J.* 183, 331-337.

Literaturverzeichnis

- Walters,R. W., Freimuth,P., Moninger,T.O., Ganske,I., Zabner,J., und Welsh,M.J. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110, 789-799.
- Weaver,C.D., Yoshida,C.K., de,C., I, und Reichardt,L.F. (1995). Expression und in vitro function of beta 1-integrin laminin receptors in the developing avian ciliary ganglion. *J. Neurosci.* 15, 5275-5285.
- White,E.S., Baralle,F.E., und Muro,A.F. (2008). New insights into form und function of fibronectin splice variants. *J. Pathol.* 216, 1-14.
- Wickham,T.J., Mathias,P., Cheresch,D.A., und Nemerow,G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 und alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309-319.
- Winder,S.J. (2001). The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem. Sci.* 26, 118-124.
- Witke,W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility und other cellular processes. *Trends in Cell Biology* 14, 461-469.
- Wizemann,H., Garbe,J.H., Friedrich,M.V., Timpl,R., Sasaki,T., und Hohenester,E. (2003). Distinct requirements for heparin und alpha-dystroglycan binding revealed by structure-based mutagenesis of the laminin alpha2 LG4-LG5 domain pair. *J. Mol. Biol.* 332, 635-642.
- Woods,A. und Couchman,J.R. (2000). Integrin modulation by lateral association. *J. Biol. Chem.* 275, 24233-24236.
- Woods,A. und Couchman,J.R. (2001). Syndecan-4 und focal adhesion function. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 578-583.
- Woods,A., McCarthy,J.B., Furcht,L.T., und Couchman,J.R. (1993). A synthetic peptide from the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin promotes focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell* 4, 605-613.
- Xia,D., Henry,L.J., Gerard,R.D., und Deisenhofer,J. (1994). Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure* 2, 1259-1270.
- Xu,D., Hopf,C., Reddy,R., Cho,R.W., Guo,L., Lanahan,A., Petralia,R.S., Wenthold,R.J., O'Brien,R.J., und Worley,P. (2003). Narp und NP1 form heterocomplexes that function in developmental und activity-dependent synaptic plasticity. *Neuron* 39, 513-528.
- Yoshida,T. und Takeuchi,M. (1991). Expression of fibronectin und laminin by different types of mouse glial cells cultured in a serum-free medium. *Cytotechnology* 7, 187-196.
- Yu,Y.R., Tian,X.H., Wang,Y., und Feng,M.F. (2006). Rapid production of human KIR2DL4 extracellular domain und verification of its interaction with HLA-G. *Biochemistry (Mosc.)* 71 Suppl 1, S60-S65.
- Zautner,A.E., Korner,U., Henke,A., Badorff,C., und Schmidtke,M. (2003). Heparan sulfates und coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *J. Virol.* 77, 10071-10077.

Literaturverzeichnis

Zen, K., Liu, Y., McCall, I.C., Wu, T., Lee, W., Babbin, B.A., Nusrat, A., und Parkos, C.A. (2005). Neutrophil migration across tight junctions is mediated by adhesive interactions between epithelial coxsackie und adenovirus receptor und a junctional adhesion molecule-like protein on neutrophils. *Mol. Biol. Cell* 16, 2694-2703.

Zhang, Y. und Bergelson, J.M. (2005). Adenovirus receptors. *J. Virol.* 79, 12125-12131.

Zhang, Z. und Galileo, D.S. (1998). Retroviral transfer of antisense integrin alpha6 or alpha8 sequences results in laminar redistribution or clonal cell death in developing brain. *J. Neurosci.* 18, 6928-6938.

9 Lebenslauf

10 Danksagung

Zunächst möchte ich Fritz G. Rathjen herzlich für die Möglichkeit, meine Dissertation in seinem Labor anzufertigen, danken. Materielle, aber auch konzeptionelle Unterstützung sowie streng, aber stets korrekt geführte Diskussionen, die zu Anregungen führten, werden mir aus dieser intensiven Zeit positiv im Gedächtnis bleiben.

Frau Prof. Dr. Carmen Birchmeier-Kohler danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Vor allem möchte ich Joachim Behlke für seine tatkräftige und fruchtbare Kooperation danken.

Eva-Christina Müller und Albrecht Otto danke ich ebenfalls für viele hilfreiche Erläuterungen und experimentelle Beiträge.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rathjen am MDC danken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen: Madlen Driesner, Mechthild Henning, Hannelore Drechsler, René Jüttner, Hannes Schmidt, Agné Stonkute, Rogério B. Craveiro, Till Puschmann, Antonia Strutz, Linn Markert, Sylvia Krüger und Jadwiga Cholewa.

Auch Klaas Max möchte ich für seine freundliche Kooperation danken.

Ganz besonderer Dank gebührt natürlich meiner lieben Familie.

11 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe.

Berlin, Dezember 2008

Christopher Patzke