

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Guido Posern)

Der Einfluss von Adenosintriphosphat auf das Neuritenwachstum
Neural cell adhesion molecule exprimierender Neuroblastomzellen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Matthias Hoffmann

geboren am 30.11.1983 in Halle/Saale

Betreuer: Prof. Dr. sc. Nat. Rüdiger Horstkorte

Gutachter: 1. Prof. R. Horstkorte

2. PD K. Danker

3. Prof. P. Galuska

Datum der Verteidigung: 23.03.2015

In unendlichem Dank und liebevoller Widmung
meiner Mutter Susanne Hoffmann

Referat:

Das Neural cell adhesion molecule (NCAM) hat im zentralen und peripheren Nervensystem einen stimulierenden und entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von Neuriten. Dabei nimmt es sowohl während der neuronalen Entwicklung als auch bei der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität eine zentrale Rolle ein. Seit Mitte der 90er Jahre weiß man, dass dieses Protein eine hydrolysierende Bindungsstelle (ATPase-Funktion) für den Cotransmitter Adenosintriphosphat (ATP) im Nervensystem besitzt. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der ATP-Bindung auf das durch NCAM stimulierte Neuritenwachstum über das RTCA-(Real-time cell analysis) Verfahren zu untersuchen.

Im ersten Schritt wurden B35-Neuroblastomzellen mittels Lipofektion transfiziert und daraufhin die NCAM140- und NCAM180-Proteinexpression über das Western Blot Verfahren überprüft. Es standen somit die drei Zelllinien B35-WT (ohne NCAM), B35-NCAM140 und B35-NCAM180 zur Verfügung, bei denen das Neuritenwachstum durch Zellimpedanzmessung in einem Echtzeit-Verfahren (RTCA) überprüft und veranschaulicht werden konnte. Alle drei Zelllinien wurden in Abwesenheit oder Anwesenheit von ATP kultiviert und dessen Einfluss auf die Neuritogenese gemessen und fotografisch dokumentiert.

Zusammenfassend kann auf Grundlage der Experimente geschlossen werden, dass Adenosintriphosphat das NCAM-induzierte Neuritenwachstum inhibiert. Sowohl durch die Messung mittels RTCA als auch durch eine fotografische Analyse lies sich zeigen, dass die Neuritenausbildung in NCAM-exprimierenden Zellen über steigende ATP-Konzentrationen stufenweise gehemmt werden kann. Die Wildtyp-Neuroblastomzellen, ohne NCAM-Expression, ließen sich durch die Zugabe von ATP nicht in ihrer Neuritogenese beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich sehr gut mit den Studien anderer Forschungsgruppen in Einklang bringen, in denen man eine Unterbrechung der für die Neuritogenese entscheidenden Signalwege bei einer ATP-Bindung vermutete.

Hoffmann, Matthias: Der Einfluss von Adenosintriphosphat auf das Neuritenwachstum Neural cell adhesion molecule exprimierender Neuroblastomzellen.
Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 74 Seiten, 2014

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	5
1.1	Zelladhäsion	5
1.2	Zelladhäsionsmoleküle.....	6
1.3	Das Neural cell adhesion molecule NCAM	10
1.3.1	Molekulare Struktur und Spleißvarianten	10
1.3.2	Funktion und Unterschiede in der Expression der drei Hauptisoformen	12
1.3.3	Posttranslationale Modifikation und Polysialylierung	14
1.3.4	Extrazelluläre Ligandenbindung und Bindungseigenschaften von NCAM.....	16
1.3.5	Intrazelluläre Ligandenbindung und Bindungseigenschaften von NCAM	17
1.3.6	NCAM vermittelte Signaltransduktion und Neuritenwachstum.....	17
1.4	Das Nukleotid Adenosintriphosphat.....	20
1.4.1	Molekulare Struktur.....	20
1.4.2	Intrazelluläre Funktion und Metabolismus	21
1.4.3	Extrazelluläre ATP Wirkung im Zentralen Nervensystem	22
1.5	Purin-Rezeptoren und Signalwege.....	23
1.6	ATP und seine Bindungsstelle an NCAM.....	24
2	Zielstellung.....	26
3	Material und Methoden	27
3.1	Material	27
3.1.1	Chemikalien	27
3.1.2	Zellkulturmaterialien.....	27
3.1.3	Organismen.....	27
3.1.4	Vektoren.....	28
3.1.5	Antikörper	29
3.1.6	Kits, Größenmarker, Inhibitoren	29
3.1.7	Medien.....	30
3.1.8	Membranen.....	30
3.1.9	Lösungen und Puffer	31
3.1.10	Peroxidase-Reaktion.....	33
3.1.11	Adenosintriphosphat (ATP)	33
3.1.12	Zusätzlich verwendete Chemikalien	34
3.1.13	Geräte	34
3.1.14	Arbeits- und Hilfsmaterialien	35

3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Behandlung von Lösungen und Geräten	36
3.2.2	Allgemeine zellbiologische Methoden.....	36
3.2.3	Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen.....	36
3.2.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen	37
3.2.5	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion	37
3.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
3.2.7	Western Blot.....	39
3.2.8	Zellzahlbestimmung.....	40
3.2.9	Das xCELLigence RTCA DB System	40
3.2.10	Fotographie der Zellen.....	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Transfektion.....	43
4.2	Neuritenwachstum von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180.....	44
4.3	Einfluss von ATP auf das Neuritenwachstum der B35-Zelllinien.....	46
4.4	Einfluss verschiedener ATP-Konzentrationen auf das Neuritenwachstum.....	50
5	Diskussion	54
5.1	NCAM140 induziert mehr Neuritenwachstum als NCAM180.....	54
5.2	ATP hat einen hemmenden Einfluss auf das Neuritenwachstum.....	55
5.3	ATP hemmt das Neuritenwachstum konzentrationsabhängig.....	56
5.4	ATP-Hydrolyse führt möglicherweise zu Konformationsveränderungen	57
6	Zusammenfassung.....	60
7	Literaturverzeichnis.....	62
8	Thesen	74

Curriculum Vitae (Tabellarischer Lebenslauf)

Selbständigkeitserklärung und Publikationen

Danksagung

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AA	Arachidonic acid (Arachidonsäure)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bp	Base pair(s) (Basenpaare)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
B35-Zellen	B35-Neuroblastomzellen
CAM	Cell adhesion molecule
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CEA	Carcinoembryonic antigen
CI	Cell index (Zellindex)
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
Cyt	Cytosolic domain
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
FN	Fibronectin (Fibronektin)
GAG	Glykosaminoglykane
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
h	Hour (Stunde)
HS	Horse serum (Pferdeserum)
ICAM	Intracellular adhesion molecule

Ig	Immunoglobulin (Immunglobulin)
IgCAM	Immunoglobulin-like cell adhesion molecule
IgSF	Immunoglobulin superfamily (Immunglobulin Superfamilie)
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
kb	Kilo base pairs (Kilobasenpaare)
kDa	Kilodalton
L	Liter
LANP	Leucine-rich acidic nuclear protein
m	Milli
M	Molar
MAG	Myelin-associated glycoprotein
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NgCAM	Neural-glia cell adhesion molecule
NGF	Nerve growth factor
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PC12-Zellen	Phäochromozytom Zellen
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PSA	Polysialic acid (Polysialinsäure)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RTCA	Real-time cell analyser/ Real-time cell analysis
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	Tris buffered saline
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN	Grenzflächenaktives Polysorbat 20
VASE	Variable alternative spliced exon
WT	Wildtyp
μ	Mikro

1 Einleitung

1.1 Zelladhäsion

Der menschliche Körper besteht aus 10^{13} Zellen, die mehr als 200 verschiedenen Zelltypen zugeordnet werden können. Dabei bilden sie als Zellverbände die Gewebe. Diese wiederum die Organe und Organsysteme eines Organismus. Eine derart komplexe Struktur benötigt einen Mechanismus um die Integrität aller Gewebe aufrecht erhalten zu können. Die Fähigkeit der Zellen, miteinander in Verbindung zu treten, bezeichnet man als Zellkontakt. Dieser stellt eine essentielle Grundlage für das höher entwickelte Leben dar. Zellkontakte können in drei Gruppen eingeteilt werden. Neben den Verschlusskontakten (Versiegelung von Interzellulärspalten der Epithelien) und den Kommunikationskontakten (Kopplung benachbarter Zellen zu einer elektrischen und metabolischen Funktionseinheit) existieren die Adhäsionskontakte. Ihre Aufgabe ist die Zelladhäsion, ein Mechanismus, welcher sowohl zwischen Zellen als auch zwischen Zellen und der sie umgebenden Proteine der Extrazellulärmatrix existiert. Man bezeichnet diese daher auch als Zell-Zell-Adhäsion und Zell-Matrix-Adhäsion beziehungsweise als homophile und heterophile Bindungen (Lüllmann-Rauch, 2009).

Die Zelladhäsion ist Bestandteil vieler komplexer, physiologischer Vorgänge wie der Proliferation, Differenzierung, Bewegung und Apoptose von Zellen (Ruoslahti and Obrink, 1996). Bereits während der Embryogenese müssen Zellen miteinander über Zelladhäsionsmoleküle interagieren, um die Bildung, das Wachstum und die damit einhergehende Differenzierung des Körpers zu gewährleisten. Für die Hirnentwicklung und dem damit verbundenen zielgerichteten Auswachsen von Neuriten sind sowohl die homophile als auch die heterophile Zelladhäsionsform von entscheidender Bedeutung. Im reifen Organismus entsteht die Immunantwort auf pathogene Erreger durch die Migration und Diapedese der Lymphozyten, welche durch Zelladhäsion gesteuert werden. Heterophile Bindungen gewährleisten diese Vorgänge. Auch die Wundheilung und der damit verbundene Auf- und Abbau bzw. die Elimination von Geweben funktioniert über die Adhäsion und Segregation, dem Lösen von Zellen aus ihrem Verband. Bei pathologischen Vorgängen wie dem Wachstum und der lymphogenen bzw. hämatogenen Metastasierung von Tumorzellen, finden sich ursächliche Veränderungen der Zelladhäsion auf molekulargenetischer Ebene und in der Proteinexpression (Hynes and Lander, 1992). Adhäsionsmoleküle dienen der Zelle aber nicht nur als mechanisch-dynamische Kontaktelemente, sondern sie sind auch in der Lage als interzellulärer Vermittler von Signalen zu

funktionieren. Dabei werden die Informationen aus der Umgebung bzw. der Nachbarzelle registriert, integriert und intrazellulär weitergeleitet. Dies ist der Grund für die zusätzliche Bezeichnung als Adhäsionsrezeptoren. Die Interaktions- und Kommunikationsvorgänge können bidirektional einerseits in das Zellinnere hineingeleitet (Outside-in), andererseits auch aus der Zelle herausgeleitet werden (Inside-out) (Clark and Brugge, 1995). Adhäsionsmoleküle sind zu einem Teil auch mit intrazellulären Signalmolekülen assoziiert. Dabei handelt es sich in der Regel um Adaptorproteine, Proteinkinasen, Phosphatasen und lateral gebundene Rezeptortyrosinkinasen, die ein fester Bestandteil der molekularen Struktur der Adhäsionsmoleküle sein können. Die Induktion dieser Signaltransduktionswege über die Adhäsionsmoleküle führt in der Regel zu einer veränderten Genexpression der Zelle und somit zu einer Änderung der Zellphysiologie (Aplin et al., 1998).

1.2 Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle stellen bezüglich ihres Aufbaus eine Gruppe hochgradig komplexer, integraler Membranproteine mit mehreren kovalent gebundenen Kohlenhydratgruppen dar. Die Unterschiede dieser Glykoproteine finden sich in ihrer Molekülgröße und Zusammensetzung der einzelnen Strukturelemente. Um die Zelladhäsion zu gewährleisten, benötigen sie in der Regel eine große extrazelluläre Domäne und eine transmembranäre Domäne. Intrazellulär schließt sich die cytoplasmatische Domäne an, die unterschiedliche Längen bzw. Größen vorweisen kann. Es existieren jedoch auch einige Zelladhäsionsmoleküle, welche keine cytoplasmatische Domäne besitzen. Diese Isoformen sind über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in die Membran integriert (Aplin et al., 1998).

Zelladhäsionsmoleküle lassen sich aufgrund von Struktur- und Sequenzhomologien in vier Klassen einteilen:

1. Cadherine (Takeichi, 1995)
2. Selektine (Lasky, 1995)
3. Integrine (Reichardt and Tomaselli, 1991)
4. Immunglobulin-Superfamilie (Brümmendorf and Rathjen, 1995)

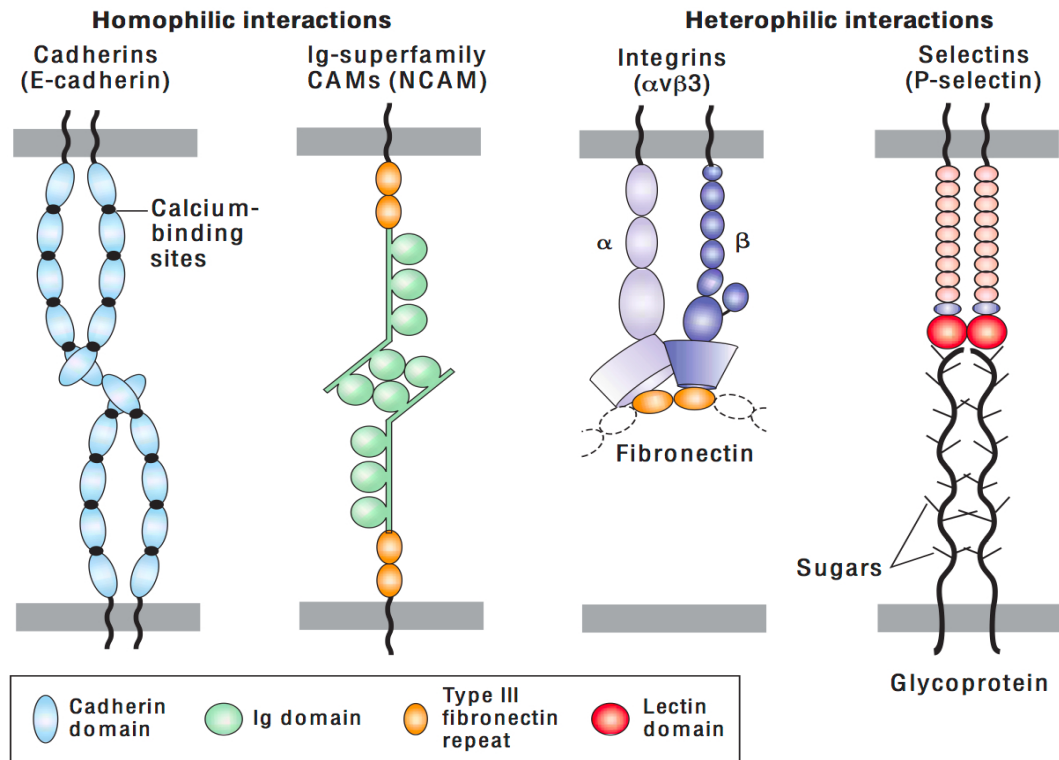


Abb. 1: Die Klassen der Zelladhäsionsmoleküle
(Lodish et al., 2004)

Die Klasse der Cadherine stellt eine Gruppe von verschiedenen Kalzium-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen dar. Sie entwickeln sehr starke homophile Bindungen an ihren, circa 100-Aminosäuren langen, Ektodomänen zwischen den Zellen. Diese sind evolutionär stark konserviert und verfügen über negativ-geladene, Kalzium-abhängige Sequenzmotive. Cadherine spielen eine sehr wichtige Rolle in der Entwicklung von Geweben bei der embryonalen Morphogenese, bei Signaltransduktionsprozessen zwischen Zellen und bei dem generellen Erhalt der Zellpolarität in der normalen Gewebestruktur des menschlichen Organismus. Als Superfamilie werden die Cadherine in sieben Gruppen eingeteilt. Dabei wurden für den Menschen bereits mehr als 80 Proteine beschrieben. Die Wichtigsten und vor allem am genauesten Erforschten sind die klassischen Cadherine, welche nach ihrem Vorkommen in bestimmten Geweben über einen Präfix benannt wurden. Beispielhaft sind hier die E-Cadherine (epithelial), N-Cadherine (neuronal), P-Cadherine (placental) und VE-Cadherine (vascular-endothelial) zu erwähnen (Takeichi, 1995; Gumbiner, 2005).

Die Klasse der Selektine stellt eine kleine Familie von Zelladhäsionsmolekülen dar. Selektine unterscheiden sich in ihrer Aminosäurestruktur und werden ebenfalls nach ihrer Zellherkunft als L-(Leukozyten), P-(Plättchen) und E-(Endothel) Selektine benannt.

Sie werden auf Endothelzellen und verschiedenen Zellen des Blutes exprimiert, um vor allem bei Entzündungsprozessen den Vorgang des „rollings“ zu gewährleisten. Dieser stellt die Grundlage für die nachfolgende Diapedese von Leukozyten, dem „lymphocyte homing“ in einem Entzündungsgebiet, dar (Tedder et al., 1995). Über ihre N-terminale Typ-C-Lektindomäne erkennen und binden Selektine Ca^{2+} -abhängig eine spezielle Tetrasaccharidstruktur des Liganden, welche als Sialyl-Lewis-X-Struktur bezeichnet wurde (Foxall et al., 1992; Erbe et al., 1993).

Die Klasse der Integrine stellt eine Reihe heterodimerer Moleküle dar. Sie bestehen aus einer Alpha- und Beta-Untereinheit. Bisher sind mindestens 24 verschiedene obligate Heterodimere beschrieben worden, die sich durch Kombination aus einer von 18 Alpha- und einer von acht Beta-Untereinheiten zusammensetzen (Giancotti, 2000). Integrine können sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Adhäsion vermitteln. Beta1-Integrine sind auf allen Zelltypen vorhanden und binden vor allem an extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen, Laminin und Fibronectin. Die vier bekannten Beta2-Integrine werden nach Aktivierung durch chemotaktische Faktoren (z.B. IL-8 oder Plättchenaktivierender Faktor) auf Leukozyten exprimiert. Sie vermitteln über heterophile Interaktionen den Kontakt zu anderen Leukozyten oder Endothelzellen. Dies erlaubt den Prozess der Transmigration oder Diapedese von Leukozyten in entzündetes Gewebe. Weiterhin sind Integrine an der Regulation des Zellzyklus, der Zellform und der Zellmobilität über eine Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden involviert (Albelda et al., 1994).

Die Klasse der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) stellt mit über 100 Mitgliedern eine große Gruppe membrangebundener und gelöster, strukturverwandter Proteine dar (Brümmendorf and Rathjen, 1995). Bekannte Vertreter sind neben dem B- und T-Zellrezeptor, die MHC-Moleküle der Klasse I und II. Auch Korezeptoren wie das CD4- und CD8-Molekül sind aus der IgSF bekannt. Sie kommen auf den Zellen des Immun- und Nervensystems, auf Muskelzellen und Epithelzellen vor. Das typische Merkmal dieser Klasse ist die Existenz von mindestens einer Immunglobulin-ähnlichen Domäne im extrazellulären Bereich. Deren Primärstruktur besteht aus circa 70-110 Aminosäuren, welche wiederum zwei antiparallele Beta-Faltblätter bilden. Diese sind über eine Disulfidbrücke, also einem Cysteinrest pro Beta-Faltblatt, verbunden (Vaughn and Bjorkman, 1996). In der Literatur sind vier verschiedene Typen von Ig-Domänen namentlich beschrieben. Die Typen C1, C2 und V ähneln dem konstanten und variablen Teil von Immunglobulinen. Der vierte, intermediäre Typ, wird als I-Typ bezeichnet und umfasst alle anderen Ig-Domänen. Die Anzahl der Domänen pro Molekül kann innerhalb der IgSF sehr variabel sein (Williams and Barclay, 1988).

Die Mitglieder der IgSF weisen sehr heterogene Funktionen auf. Eine davon ist die Zelladhäsion im Nervensystem, welche eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Neuritenwachstums bzw. der Bildung und Aufrechterhaltung von neuronalen Verbindungen spielt (Baldwin et al., 1996). Das Neural cell adhesion molecule (NCAM) erfüllt als Mitglied der IgSF diese Aufgabe. Es gehört zu einer Untergruppe stark glykosylierter, transmembranärer Proteine, die Ca^{2+} -unabhängig Zell-Zelladhäsion vermitteln können. Neben seinen fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht es extrazellulär zusätzlich aus zwei Fibronectin Typ-III homologen Domänen. Diese haben eine 90-Aminosäuren lange Struktur und wurden primär im extrazellulären Matrixprotein Fibronectin entdeckt (Main et al., 1992). Neben NCAM existieren im Nervensystem natürlich noch weitere Zelladhäsionsmoleküle aus der IgSF. Beispielhaft sind hier L1, NgCAM (Neural-glia cell adhesion molecule), NrCAM (Neuronal cell adhesion molecule), Tag-1 (Ratte), F3 (Maus), F11 (Hühnchen), MAG (Myelin-associated glycoprotein) und P₀ zu nennen, deren Übersicht in Tabelle 1 zu finden ist.

Tab. 1: Zelladhäsionsmoleküle des Nervensystems aus der IgSF (Auswahl)
(Horstkorte, 1993)

CAM	Adhäsion	Ligand	Ig-Dom.	Fn-Dom.	Membranverankerung	Gewebeverteilung	Spezies
L1 NgCAM NILE	+	L1, Axonin-1, F11, Neuropilin-1, Semaphorin	6	5	TM	Neurone, Epithelzellen	Mensch, Huhn, Ratte
Neuroglian	+	Neuroglian	6	5	TM	Neurone, Glia	Drosophila
TAG-1	+	Ng-CAM	6	4	GPI	Neurone	Ratte
F11 F3 (Contactin)	+	NgCAM NrCAM, TN-R, TN-C, RPTP Restrictin	6	4	GPI	Neurone	Huhn, Maus
NCAM	+	NCAM Heparansulfat Neurocan, L1 Phosphacan,	5	2	TM/GPI	Neurone, Glia, Muskel	Säuger, Vögel Amphibien
Fascilin II	+	Fascilin II	5	2	TM	Neurone	Drosophila, Heuschrecke
MAG	+	Collagen, Heparin, Ganglioside	5	-	TM	Glia	Mensch, Nager
P ₀	-	P ₀	1	-	TM	Glia	Vertebraten
DCC (Deleted in-Colorectal Carcinoma)	+	Netrin	4	6	TM	Neurone	Säuger

1.3 Das Neural cell adhesion molecule NCAM

Das Neural cell adhesion molecule NCAM (neurales Zelladhäsionsmolekül) stellt ein primär membrangebundenes Glykoprotein dar und wurde im Jahr 1977 erstmals im Nervensystem embryonaler Hühner entdeckt (Brackenbury et al., 1977). NCAM spielt auch im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle während der Induktion, Entwicklung und Aufrechterhaltung des Nervensystems. Es wird bereits in der Embryonalphase im Ektoderm und in einigen Mesodermderivaten wie der Neuralplatte und dem Neuralrohr exprimiert. NCAM hat, neben anderen Zelladhäsionsmolekülen, die Aufgabe spezifische Formierungsprozesse von Zellgruppen zu steuern. Dabei nimmt es einen entscheidenden Einfluss auf die Migration von Neuroblasten und dem sich anschließenden reguliertem Auswachsen von Neuriten (Edelman, 1985). Im adulten Organismus bleibt die NCAM-Expression im Nervensystem weitgehend erhalten. Hier wird es im zentralen Nervensystem von Neuronen, Astrozyten und Gliazellen exprimiert. Seine Hauptaufgabe stellt die Zelladhäsion zwischen Neuronen, zwischen Neuronen und Astrozyten, und zwischen Astrozyten untereinander dar (Keilhauer et al., 1985). NCAM ist in der Synaptogenese, der synaptischen Verformbarkeit und dementsprechend bei Lern- und Gedächtnisprozessen involviert. Bei der Regeneration von Neuriten hat NCAM zusätzlich einen entscheidenden Einfluss (Edelman and Crossin, 1991; Hinsby et al., 2004). Im peripheren Nervensystem wird NCAM von Neuronen und Schwannzellen synthetisiert. Es existieren jedoch auch einige nicht-neuronale Zellen, die das Protein auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Hierzu gehören Skelettmuskelzellen, die Beta-Zellen des Pankreas, die Fibroblasten des Ischiasnerves, natürliche Killerzellen sowie einige endokrine Zellen. NCAM gehört als Zelladhäsionsmolekül in die Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie und besitzt in der CD-Klassifikation den CD56.

1.3.1 Molekulare Struktur und Spleißvarianten

Im Jahr 1986 identifizierte man erstmals das für NCAM codierende Gen auf dem Chromosom 11 des menschlichen Genoms. Es handelt sich dabei um ein singuläres, aus mindestens 25 Exons bestehendes Gen, welches durch alternatives Spleißen seiner prä-mRNA in mehrere Isoformen überführt werden kann (Nguyen et al., 1986; Owens et al., 1987; Barbas et al., 1988). Im ZNS existieren drei Hauptisoformen, die in der SDS-PAGE aufgrund ihrer Molekulargewichte von 120kDa, 140kDa und 180kDa unterschieden und mit NCAM120, NCAM140 und NCAM180 bezeichnet werden.

Die extrazelluläre, molekulare Grundstruktur ist allen drei NCAM-Isoformen gleich. Sie besitzen zwei membrannahe Fibronectin Typ-III homologe Domänen (Cunningham et al., 1987) und fünf Ig-Domänen (Chothia and Jones, 1997). Die transmembranären Glykoproteine NCAM140 und NCAM180 unterscheiden sich nur in der Länge ihrer cytoplasmatischen Domäne. NCAM120 besitzt diese hingegen nicht und ist mit einem GPI-Anker in der Plasmamembran der exprimierenden Zellen verankert. Weiterhin verfügen die NCAM-Moleküle extrazellulär über sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die sogenannte Polysialylierung der N-Glykane an den drei Glykosylierungsstellen der fünften Ig-Domäne stellt als posttranslationale Modifikation von NCAM beim Menschen und andern Vertebraten eine Besonderheit dar (Nelson et al., 1995).

Durch zusätzliches alternatives Spleißen ist es möglich weitere 20-30 Isoformen als Varianten der drei Hauptisoformen zu generieren (Goridis and Brunet, 1992). Dabei generiert das Spleißen hauptsächlich Veränderungen in der extrazellulären Domäne und ist abhängig vom Gewebe und dem aktuellen Entwicklungsstadium des Organismus (Santoni et al., 1987). In den NCAM-Transkripten des Gehirns fand man beispielsweise im kodierenden Bereich für die extrazelluläre Domäne zwei Spleißstellen, die als α und π bezeichnet wurden (Barthels et al., 1992). An der Spleißstelle α zwischen Exon 12 und Exon 13 können alternativ 15, 42 oder 48 Nukleotide und/oder das Trinukleotid AAG inseriert werden, eine Region, die stromabwärts der für die fünfte Ig-Domäne kodierenden DNA liegt. Das π -Exon, welches auch als VASE (Variable alternative spliced exon) bekannt ist, kodiert für ein zusätzlich 10-Aminosäuren langes Insert innerhalb der vierten Ig-Domäne von NCAM. Seine Expression ist sehr stark vom Entwicklungsfortschritt der Zellen abhängig. Das VASE kann die Funktion von NCAM entscheidend beeinflussen und ist daher von großem Interesse (Santoni et al., 1987; Saffell et al., 1994).

Lösliche Formen von NCAM konnten im Gehirn, im Liquor cerebrospinalis und im Blut identifiziert werden. Es handelt es sich dabei um in den Extrazellulärraum entlassene NCAM120 Moleküle oder durch extrazelluläre Spaltung der transmembranären Isoformen entstandene Proteine. Neben diesen fanden sich auch intakte transmembranäre Formen, was die Möglichkeit der aktiven Sekretion dieser Moleküle bedeuten könnte (Krog et al., 1992; Olsen et al., 1993). Man zieht in Betracht, dass die löslichen Formen durch Bindung an zelluläres NCAM die NCAM-vermittelte Zell-Zelladhäsion zu modulieren vermögen. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass an der Astrozyten-Oberfläche gebundenes NCAM die Astrozyten-Proliferation hemmt (Krushel et al., 1998) und lösliches NCAM die Migration von Schwannzellen stimulieren kann (Thomaidou et al., 2001).

1.3.2 Funktion und Unterschiede in der Expression der drei Hauptisoformen

Die drei NCAM-Isoformen sind nicht homogen auf der Oberfläche von allen NCAM-exprimierenden Zellen verteilt. Sie können nicht nur von verschiedenen Zell-Typen exprimiert werden, sondern auch innerhalb der Zellmembran sehr unterschiedlich lokalisiert sein. NCAM180 ist ausschließlich in neuralen Geweben (ZNS, Neuronen, Oligodendrozyten, Astrozyten) zu finden und wird vermutlich erst exprimiert, wenn die Differenzierung der Zellen bereits abgeschlossen ist (Pollerberg et al., 1985). NCAM140 wird dagegen sowohl von Neuronen als auch von Muskelzellen synthetisiert. NCAM120 existiert hauptsächlich auf Gliazellen und tritt in der Entwicklung erst später als die beiden anderen Isoformen in Erscheinung. Die Expression von NCAM140 erfolgt vor allem in Bereichen des Wachstumskegels von auswachsenden Neuriten, wohingegen man NCAM180 an Zell-Zellkontakt-Stellen (Soma und Neuriten) vermehrt findet. Versuche mit Latex-Beads lieferten Indizien dafür, dass Proteine der extrazellulären Matrix direkt oder indirekt die Akkumulation von NCAM180 in den Zellkontaktbereichen stimulieren können (Pollerberg et al., 1990). NCAM140 wurde in Experimenten auf prä- und postsynaptischen Membranen identifiziert. NCAM180 hingegen fand sich nur auf der postsynaptischen Seite, wobei nicht alle postsynaptischen Membranen obligat NCAM180 exprimieren (Persohn et al., 1989).

Die flankierenden Regionen der transmembranären Glykoproteine NCAM140 und NCAM180 sind identisch. Jedoch verfügt NCAM180 im Bereich der cytoplasmatischen Domäne über ein zusätzliches Insert von 267 Aminosäuren, welches von Exon 18 kodiert wird. Dieser Strukturunterschied lässt für NCAM180 die theoretische Möglichkeit von deutlich mehr intrazellulären Interaktionspartnern zu. 1987 konnte gezeigt werden, dass einer dieser Interaktionspartner das Zytoskelett-Membran-Verbindungsmolekül Spectrin ist. Bei diesen Versuchen ist Spectrin zusammen mit NCAM180 durch eine Immunitätschromatographie aufgereinigt worden (Pollerberg et al., 1987). NCAM180 weist, im Gegensatz zu NCAM140, eine reduzierte laterale Mobilität in der Membran auf. Als Ursache hierfür diskutierte man die Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett (Pollerberg et al., 1986). Im Jahr 2003 konnte die Arbeitsgruppe Horstkorte eine Verbindung von NCAM140 und NCAM180 mit dem Zytoskelett-Proteinen Alpha- und Beta-Tubulin und Alpha-Aktinin zeigen (Büttner et al., 2003). Weiterhin fand man Interaktionen von NCAM180 mit den Proteinen MAP1A, Beta-Aktin, Tropomyosin und der rhoA-Kinase 3. Durch seine Verknüpfungen mit dem Zytoskelett nimmt man für NCAM180 an, dass es einen entscheidenden Beitrag zur Stabilisierung von Zell-Zellkontakten leistet (Pollerberg et al., 1985). 2005 konnten neuartige intrazelluläre Bindungspartner von NCAM140 und

NCAM180 identifiziert werden. Diese waren PLC-Gamma, LANP, Syndapin und die zwei Proteinphosphatasen PP1 und PP2A (Büttner et al., 2005). Für NCAM140 hatte man bereits in den 90er Jahren durch Immunpräzipitationsstudien eine Assoziation mit der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase p59fyn und der fokalen Adhäsionskinase FAK nachgewiesen (Beggs et al., 1997).

In bestimmten Bereichen der Plasmamembran können NCAM-Moleküle, als sogenannte „lipid rafts“, vorliegen. In diesen Abschnitten, die detergentenresistente Mikrodomänen der Membran darstellen, herrscht ein hoher Cholesterin- und Sphingolipid-Gehalt. Während sich NCAM120 sehr gehäuft in lipid rafts befindet, ist der größte Anteil der transmembranären Isoformen außerhalb der lipid rafts. Nur ein geringer Anteil, circa 2% der NCAM140 Moleküle, liegt akkumuliert in ihnen vor. Hierfür sind die vier Palmitoylierungsstellen der transmembranären NCAM-Isoformen von Bedeutung, die eine solche Akkumulation ermöglichen (Niethammer et al., 2002).

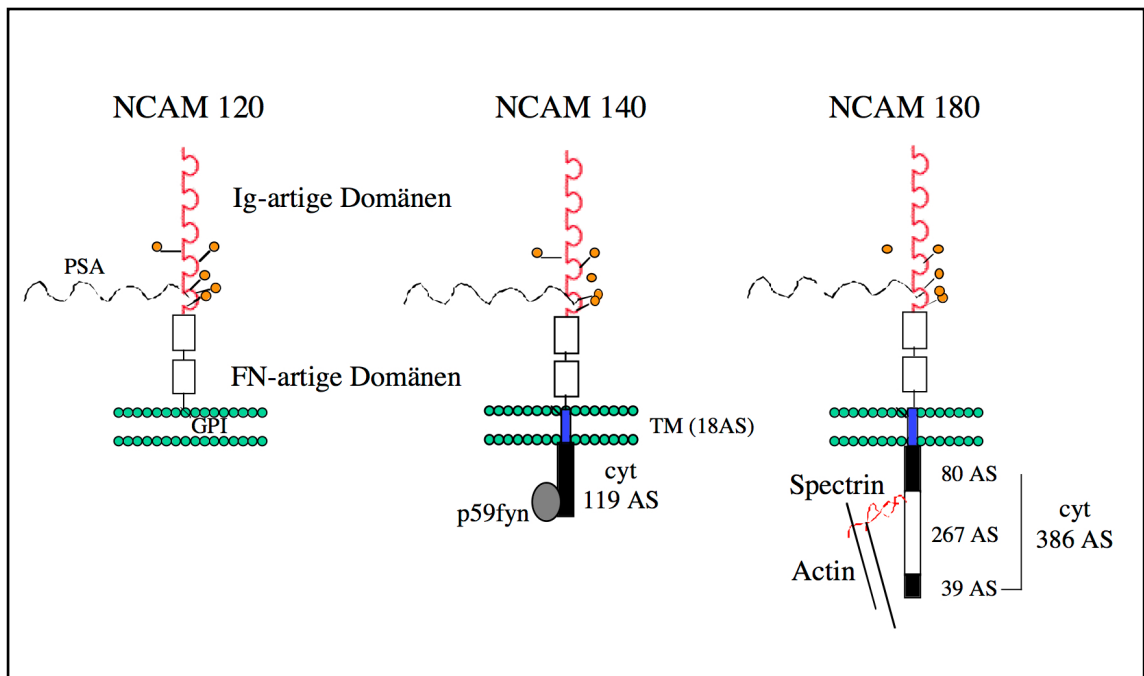


Abb. 2: Schematische Darstellung der drei Hauptisoformen von NCAM
(Horstkorte et al., 2012)

Graphisch dargestellt sind die drei Hauptisoformen NCAM120, NCAM140 und NCAM180.

Abkürzungen: AS - Aminosäuren; cyt - cytosolische Domäne; FN - Fibronectin; GPI - Glykosylphosphatidylinositol Anker; Ig - Immunglobulin; NCAM - Neural cell adhesion molecule; PSA - Polysialinsäure; TM - transmembranäre Domäne

1.3.3 Posttranslationale Modifikation und Polysialylierung

Nachdem die Synthese von Proteinen durch die Translation abgeschlossen ist, können diese posttranslational modifiziert werden. Hierzu gehören beispielsweise die Acetylierung, die Methylierung, die Phosphorylierung oder auch die Glykosylierung. Alle NCAM Isoformen sind posttranslational modifiziert. Im extrazellulären Bereich sind die Glykosylierung der Asparaginreste sowie die Sulfatierung der Asparagin-gebundenen Oligosaccharide bekannt (Sorkin et al., 1984). Die NCAM140 und NCAM180 Isoform kann an Serin- und Threoninresten der cytoplasmatischen Domänen phosphoryliert werden. Weiterhin können drei der vier Cysteinreste der cytoplasmatischen Domäne palmitoyliert werden (Little et al., 1998). Auch die Acetylierung als Modifikation von NCAM ist möglich. Sie könnte dazu dienen, das Molekül zusätzlich in der Membran in bestimmten Mikrodomänen, wie z.B. den „lipid rafts“, zu verankern oder die Domäne für intrazelluläre Proteininteraktionen und damit einer Signaltransduktion auszurichten.

Polysialinsäure kommt in Prokaryoten als Kapselkomponente von Sepsis und Meningitis verursachenden Bakterien vor. Im menschlichen Organismus existiert die Polysialylierung nur für die Alpha-Untereinheit von Natriumkanälen im Gehirn und für das Zelladhäsionsprotein NCAM. In der frühen Entwicklung sind nahezu alle NCAM-Moleküle polysialyliert. Diese Modifikation nimmt allerdings mit zunehmender Gewebedifferenzierung wieder ab. Es existieren einige Hirnareale, in denen polysialyliertes NCAM lebenslang exprimiert wird. Hier haben die Hirnstrukturen die Fähigkeit, Neurone zu generieren, behalten. Weiterhin zeichnen sie sich aber auch durch eine hohe morphologische und physiologische Plastizität aus, wie dies im Hippocampus, der Hypophyse und im Hypothalamus der Fall ist (Edelman, 1985). Die Polysialinsäure stellt ein langes Homopolymer von α -2,8-verknüpften Sialinsäureresten ($n= 8-100$) dar. Die Biosynthese von Polysialinsäure findet im Golgi-Apparat statt. NCAM besitzt in der fünften Ig-Domäne drei Asparaginreste, die mit einem N-Glykan-Grundgerüst versehen sind. An die äußersten Zucker dieser N-Glykane kann die Polysialinsäure addiert werden (Nelson et al., 1995). Diese Modifikation wird durch die zwei Polysialyltransferasen ST8Sia IV (PST) und ST8Sia II (STX) katalysiert (Eckhardt et al., 1995; Nakayama et al., 1995; Scheidegger et al., 1995; Yoshida et al., 1995). Um die spezifische Erkennung und Polysialylierung eines NCAM-Moleküls zu gewährleisten, benötigen die Polysialyltransferasen die fünfte Ig-Domäne, welche die drei Akzeptorstellen für die Polysialinsäure enthält, sowie die benachbarte vierte Ig-Domäne und die erste Fibronectin Typ-III Domäne. Zusätzlich ist eine komplexe Wechselwirkung mit der Membran essentiell (Nelson et al., 1995).

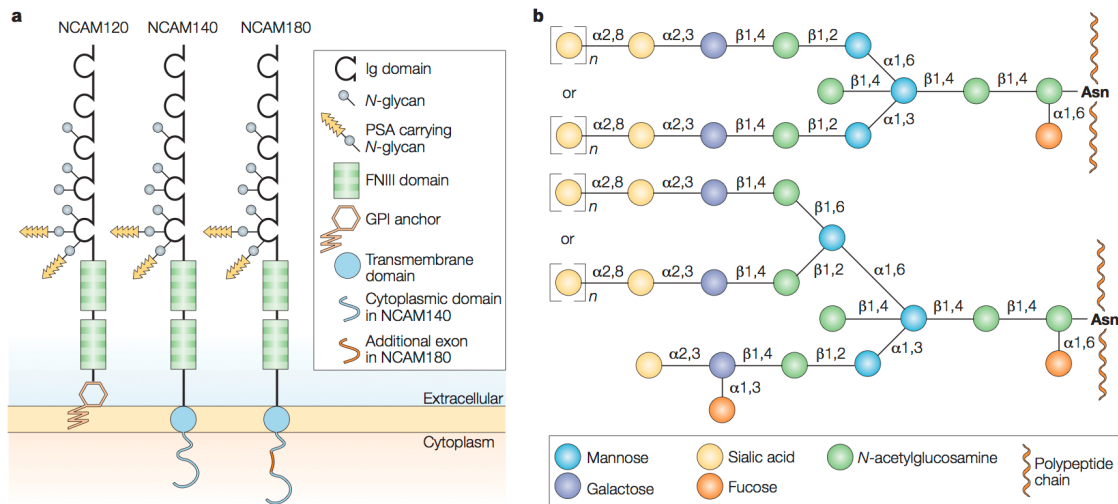


Abb. 3: a) Die drei Hauptisoformen von NCAM
 b) Die Polysialylierung am N-Glykan-Grundgerüst der Asparaginreste von NCAM
 (Kleene and Schachner, 2004)

PSA hat einen entscheidenden Einfluss auf die Zelladhäsion, das Neuritenwachstum und die Migration von Neuronen. Durch die stark negativ geladenen Kohlenhydratketten und deren große Hydrathülle nimmt man für die Funktion der Polysialinsäure primär an, dass die damit verbundene elektrostatische Abstoßung eine Art Platzhalterfunktion besitzt und somit die Adhäsionskräfte zwischen Zellen reduziert (Rutishauser et al., 1988). Im Jahr 2001 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Verlust oder die Inaktivierung der Polysialylierung von NCAM die Differenzierung und das Zellüberleben von Neuronen im Rattenhirn reduziert. Die Daten der Versuche zeigten, dass die Polysialinsäure in einer noch unbekanntem Weise für die Sensitivität von Nervenzellen gegenüber dem Wachstumsfaktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor) verantwortlich war (Vutskits et al., 2001). Dieses Protein, aus der Gruppe der Neutrophine, ist wichtig für den Schutz von Neuronen und Synapsen sowie der Stimulation des Nervenzellwachstums. Kanato et al. zeigten 2008, dass PSA aufgrund seines polyanionischen Charakters und in Abhängigkeit von seiner Kettenlänge BDNF und weitere verschiedene Wachstumsfaktoren wie NGF, Neurotrophin 3 und 4 binden kann. Die Polysialylierung von NCAM hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Akkumulation und die Konzentration von häufig positiv geladenen Wachstumsfaktoren nahe der Zellmembran, was die Bindungswahrscheinlichkeit dieser mit ihren spezifischen Rezeptoren erhöht (Kanato et al., 2008).

1.3.4 Extrazelluläre Ligandenbindung und Bindungseigenschaften von NCAM

NCAM ist in der Lage sowohl homophile als auch heterophile Zelladhäsion im extrazellulären Bereich einzugehen. Im Jahr 1983 wurde erstmalig beschrieben, dass es sich bei den homophilen Bindungen um eine Ca^{2+} -unabhängige NCAM-NCAM-Interaktion in cis- oder trans-Konfiguration handelt. Eine Hypothese ist, dass alle fünf Ig-Domänen des einen NCAM-Moleküls mit denen des anderen in antiparalleler Richtung binden können. Dies bedeutet, dass die erste mit der fünften Ig-Domäne, die zweite mit der vierten Ig-Domäne und die dritte mit der dritten Ig-Domäne des gegenüberliegenden Moleküls interagiert (Ranheim et al., 1996). Aufgrund von NMR-spektroskopischen Untersuchungen und Versuchen mit der ersten Ig-Domäne als rekombinantes Fusionsprotein, wurde von zwei Forschungsgruppen im Jahr 1997 und 1999 aber auch belegt, dass die erste Ig-Domäne des einen NCAM-Moleküls mit der zweiten Ig-Domäne des anderen Moleküls in einer antiparallelen Orientierung interagieren kann (Kiselyov et al., 1997; Atkins et al., 1999). Heute weiß man, dass durch eine NCAM-NCAM-Interaktion eine Stimulation des Neuritenwachstums erfolgt und neben den Ig-Domänen hierbei auch die FN-Domänen benachbarter NCAM-Moleküle involviert sind (Peck and Walsh, 1993; Kiryushko et al., 2006).

Es existieren neben den homophilen aber auch heterophile Bindungseigenschaften des neuronalen Zelladhäsionsproteins. Die zweite Ig-Domäne verfügt über eine 17-Aminosäuren lange Heparin-Sulfat-Bindungsdomäne. Sie ermöglicht NCAM eine heterophile Bindung an den in der Basallamina vorkommenden Proteoglykanen (Cole and Akeson, 1989). Auch die erste Ig-Domäne bindet an Heparin. Beide Domänen sind zusätzlich in der Lage über Heparin an Kollagen I zu binden (Kiselyov et al., 1997). In der vierten Ig-Domäne besitzt NCAM eine Lektin-Domäne, über welche NCAM mit einem oligomannosidischen Glykan von L1 auf der gleichen Zelle eine cis-Interaktion eingehen kann. Dieser NCAM-L1-Komplex verstärkt die homophile trans-Interaktion zu L1 (sog. assistierte homophile Bindung) (Horstkorte et al., 1993). Da L1 mit CD 9, einem integralen Tetraspan-Membranprotein, und CD9 mit $\alpha 6\beta 1$ -Integrinen lateral assoziiert sein kann, steht auch NCAM indirekt über L1 mit diesen Molekülen in Verbindung (Schmidt et al., 1996).

Die lang spekuliertere direkte Interaktion des FGF-Rezeptors mit NCAM konnte vor circa 10 Jahren durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analyse nachgewiesen werden (Kiselyov et al., 2003). Dabei wird die Interaktion über die erste und zweite FN-Domäne des NCAM-Moleküls und der zweiten und dritten Ig-Domäne des FGFR 1 vermittelt. Für die vorliegende Arbeit ist genau dieser NCAM-Bereich interessant, da NCAM hier in der

zweiten FN-Domäne über eine Bindungsstelle für extrazelluläres Adenosintri-phosphat verfügt. Es wurde bewiesen, dass NCAM gebundenes ATP hydrolysieren kann, also eine extrazelluläre ATPase-Funktion besitzt (Dzhandzhugazyan and Bock, 1997). Es lässt sich aber auch vermuten, dass gebundenes ATP die NCAM-FGF-Rezeptor-Bindung reguliert und damit einen wichtigen Einfluss auf das Neuritenwachstum hat.

1.3.5 Intrazelluläre Ligandenbindung und Bindungseigenschaften von NCAM

Die Arbeitsgruppe Horstkorte beschäftigte sich im Jahr 2005 wiederum mit den spezifischen intrazellulären Interaktionspartnern von NCAM140 und NCAM180. Diese konnten durch Affinitätschromatographie und MALDI-TOF-MS verifiziert werden. Die cytoplasmatischen Domänen beider NCAM Moleküle wurden durch Fusionsproteine in *Escherichia coli* exprimiert. Dadurch konnten als Interaktionspartner die Zytoskelettproteine Alpha- und Beta-Tubulin, Alpha-Actinin, PLC-Gamma, LANP, Synapin, die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A für NCAM140 und NCAM180 nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP1A, Beta-Actin und Tropomyosin, die rhoA-bindende Kinase Alpha und Turned on after division-64 (TOAD64) nur Bindungspartner von NCAM180 sind. Eine direkte Interaktion wurde nur mit der PLC-Gamma nachgewiesen (Büttner et al., 2005).

1.3.6 NCAM vermittelte Signaltransduktion und Neuritenwachstum

NCAM ist, wie auch andere Zelladhäsionsmoleküle, an sehr verschiedenen Prozessen wie der Zellmigration, dem axonalem Wachstum und der synaptischen Plastizität beteiligt. Dies lässt vermuten, dass NCAM intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren vermag. Am Ende der 80er- beziehungsweise Anfang der 90er Jahre lieferten experimentelle Studien und Forschungsergebnisse erste Hinweise, dass NCAM in Signaltransduktionsprozesse involviert sein muss. Dabei bewies man anhand von primären Neuronen und PC12-Zellen, dass eine homophile NCAM-Bindung oder eine Stimulation der NCAM-Moleküle durch NCAM-spezifische Antikörper die Konzentration bestimmter Signalmoleküle in der Zelle verändert. Schuch et al zeigten, dass die Zugabe von NCAM- oder L1-Antikörpern zu PC12-Zellen sowohl einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, als auch eine Reduktion der intrazellulären Inositolphosphat-Konzentrationen (IP₂, IP₃) und eine Abnahme des intrazellulären pH-Wertes zur Folge hatte. Dieser intrazelluläre Ca^{2+} -

Konzentrationsanstieg konnte durch das Pertussis-Toxin inhibiert werden, was auf eine Beteiligung von Pertussis-Toxin-sensitiven G-Proteinen an diesem Vorgang hindeutet. Die gleichen Ergebnisse konnte man bei PC12-Zellen und primären Neuronen beobachten, die mit löslichem NCAM oder L1 behandelt wurden (Schuch et al., 1989).

In den ersten Experimenten zum NCAM-vermittelten Neuritenwachstum im Jahr 1989 wurden PC12-Zellen oder primäre Neurone auf sogenannten Monolayern von NCAM/CAM-transfizierten 3T3-Fibroblasten kultiviert. Das daraus resultierende Neuritenwachstum wurde anschließend mit dem Neuritenwachstum von Zellen verglichen, die auf nicht transfizierten Fibroblasten kultiviert wurden (Doherty et al., 1989). Dabei konnte gezeigt werden, dass alle drei Hauptisoformen von NCAM als Liganden fungieren können und NCAM-abhängiges Neuritenwachstum stimulieren. In weiteren Experimenten ließ sich zeigen, dass auch die löslichen Formen der CAMs (NCAM, L1 und N-Cadherin) als CAM-Fc-Chimere ein CAM-abhängiges Neuritenwachstum induzieren können. Die Fähigkeit von Neuronen, Axone auszubilden, ist von ihrem Polysialinsäuregehalt, sowie von der An- oder Abwesenheit des alternativ gespleißten VASE-Exons im extrazellulären Bereich von NCAM, abhängig (Doherty et al., 1990). Befindet sich dieses VASE-Exon in NCAM-transfizierten Fibroblasten oder in den Neuronen, so wird das durch NCAM-stimulierte Neuritenwachstum inhibiert. Das VASE-Exon ist in den Hirnregionen, die weiterhin morphologische und synaptische Plastizität zeigen, nicht anwesend. Seine Expression ist räumlich begrenzt (Small and Akeson, 1990). In Versuchen, in denen NCAM120 oder NCAM140 mit entfernter cytoplasmatischer Domäne in PC12-Zellen exprimiert wurden, konnte man zeigen, dass die intrazelluläre Domäne von NCAM für die Initiation der Signaltransduktion und für die Stimulierung des Neuritenwachstums von essentieller Bedeutung ist. Als Ergebnis dieser Experimente konnte man diese Zellen anschließend nicht mehr durch NCAM zum Neuritenwachstum stimulieren. Durch die homophilen Wechselwirkungen sind NCAM, L1 und N-Cadherin befähigt, das Neuritenwachstum zu stimulieren (Saffell et al., 1995).

Im Jahr 1991 zeigte sich, dass alle drei CAMs über das G-Protein-abhängige Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen des L- und N-Typs in PC12-Zellen, das Neuritenwachstum stimulieren (Doherty et al., 1991). Das G-Protein hemmende Pertussis-Toxin sowie auch eine Kombination von L- und N-Typ Ca^{2+} -Kanal-Inhibitoren, hemmen dieses CAM-stimulierte Neuritenwachstum vollständig. Bei allen drei CAMs spielt Ca^{2+} demnach als second messenger eine entscheidende Rolle in der Stimulation der Neuritenbildung.

Es existieren hauptsächlich zwei NCAM-vermittelte Signaltransduktionswege, die eine Rolle beim Neuritenwachstum spielen. Dabei handelt es sich zum einen um den durch NCAM-Stimulation aktivierten FGF-Rezeptor-Signalweg, zum anderen um den Weg, der mit der Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinasen startet. Es wird vermutet, dass beide Signalwege über bestimmte Signalmoleküle miteinander gekoppelt sind. Beide führen zum Ras-MAP-Kinase-Weg und können somit eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB bewirken, wodurch die Genexpression der Zellen beeinflusst wird (Budnich et al., 2012). Eine Übersicht über die Signaltransduktionswege ist in Abb. 4 dargestellt.

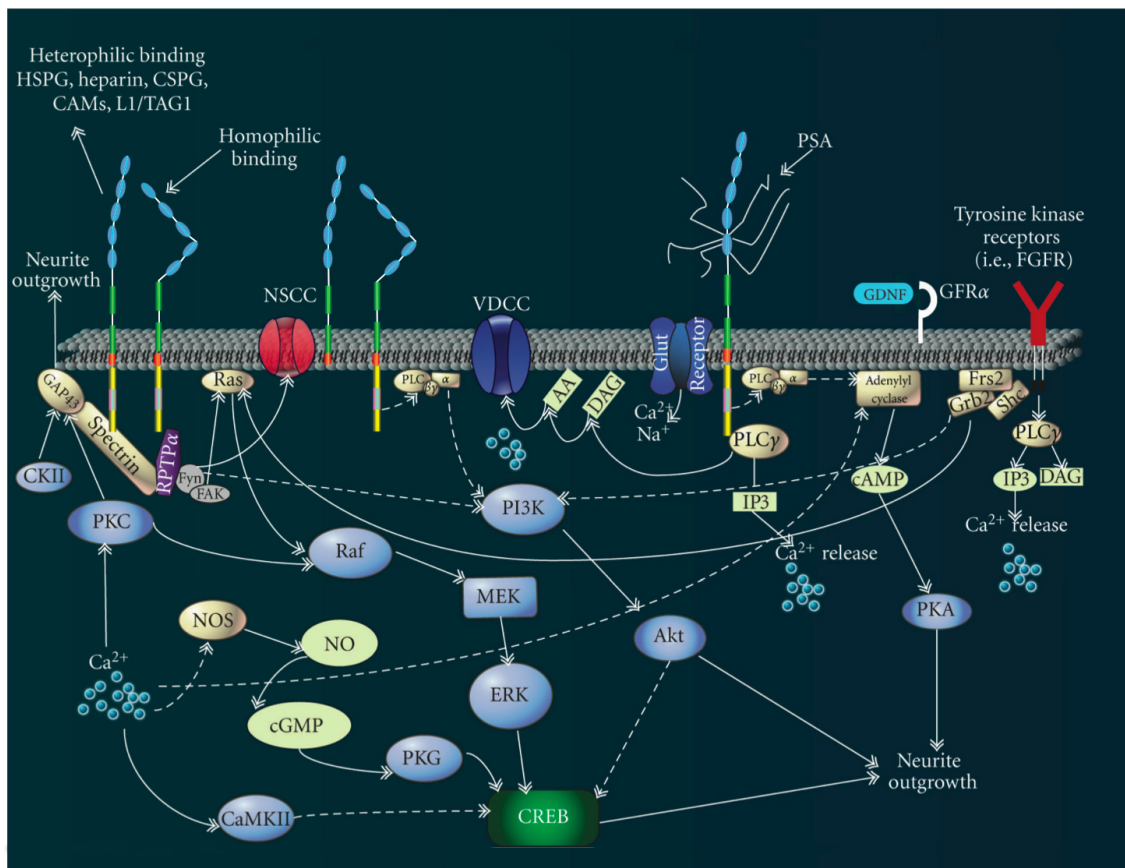


Abb. 4: NCAM- und PSA-NCAM-stimulierte intrazelluläre Signalkaskaden (Budnich et al., 2012)

Graphisch dargestellt sind die aktuellen NCAM und PSA-NCAM-Signalkaskaden die vermutlich im Neuritenwachstum involviert sind. Die gestrichelten Linien geben die momentan vermuteten intrazellulären Signalwege an.

Farben: Tyrosinkinasen= Rot; andere Proteinkinasen= Blau; Nichtproteine= Silber

Abkürzungen: AA - arachidonic acid; cAMP - cyclic adenosine monophosphate; CREB - cAMP response element-binding protein; CaMK - Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase; cGMP - cyclic guanosine monophosphate; CKII - casein kinase II; DAG - diacylglycerol; ERK - extracellular regulated kinase; FAK - focal adhesion kinase; FGFR - fibroblast growth factor receptor; Frs2 - FGFR-substrate 2; GAP-43 - growth-associated protein 43; NO - nitric oxide; NOS - NO synthase; NSCC - nonspecific cation channel; PI3K - phosphatidylinositol 3-kinase; PKA - protein kinase A; PKC - protein kinase C; PKG - protein kinase G; PLC - phospholipase C; RPTP - receptor protein tyrosine phosphatase; VDCC - voltage-dependent Ca²⁺-channel

1.4 Das Nukleotid Adenosintriphosphat

Der deutsche Biochemiker Karl Lohmann entdeckte im Jahr 1929 als Erster das Molekül Adenosintriphosphat (ATP) (Reiche, 2004). Seine Rolle als Hauptenergiequelle für Zellen wurde 1939 bis 1941 von Fritz Albert Lipman, einem deutsch-amerikanischen Biochemiker, beschrieben. Er prägte mit ATP den Begriff der „energy-rich phosphate bonds“ (Lipmann, 1949).

1.4.1 Molekulare Struktur

Adenosintriphosphat steht als Nukleotid im Zentrum des Energiestoffwechsels. Chemisch betrachtet ist es ein farbloser Feststoff mit einer Molaren Masse von $M = 507,18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Der Mensch besitzt eine ATP-Gesamtmenge von ungefähr 50g. Diese Gesamtmenge wird täglich mehrere 1000-mal durch seinen Verbrauch im Körper regeneriert. In den Zellen kommt das Molekül physiologisch gelöst circa eine Milliarde Mal mit einer Konzentration von circa 3-4 mmol/l vor. Durch seine Lösung liegen die OH-Gruppen der Phosphate dissoziiert vor. Da an jedem ATP-Molekül zusätzlich ein Magnesium-Ion gebunden ist, spricht man strenggenommen von $\text{Mg}^{2+}\text{ATP}^{4-}$ (Horn et al., 2002; Rassow et al., 2012). Die Molekulare Struktur von ATP besteht grundsätzlich aus zwei Anteilen, dem Nucleosid Adenosin und der gebundenen Triphosphatgruppe. Das Adenosin setzt sich aus der Pentose Ribose und seiner gebundenen Base, dem Adenin zusammen. Beide sind miteinander über eine N-glykosidische Bindung am C¹-Atom der Ribose verknüpft. Das Adenosin dient als Bindungselement für Enzyme. Für die Funktion im Energiestoffwechsel ist allein das Triphosphat mit seinen Alpha-, Beta- und Gamma-Phosphaten entscheidend. Zwischen dem Alpha-Phosphat und dem C⁵-Atom der Ribose befindet sich eine O-glykosidische Bindung. In diesem speziellen Fall handelt es sich um eine Phosphorsäureester-Bindung. Die beiden folgenden Bindungen sind zwei wesentlich energiereichere Phosphorsäureanhydrid-Bindungen. Bei der Hydrolyse dieser zwei Bindungen wird Energie frei, die anderen Reaktionen zur Verfügung gestellt werden kann. Die Abspaltungsreaktion des Gamma-Phosphats (ATP zu ADP) unter Standardbedingungen hat eine freie Enthalpie von etwa $\Delta G^0 = -30,5 \text{ kJ/mol}$. Spaltet sich ein Pyrophosphat (ATP zu AMP) ab, liegt sie schon bei $\Delta G^0 = -45,6 \text{ kJ/mol}$. Unter physiologischen Bedingungen sind die Beträge der Enthalpie noch höher, da der Konzentrationsunterschied zwischen ATP und ADP in einer Zelle sehr groß ist (Berg et al., 2002; Rassow et al., 2012).

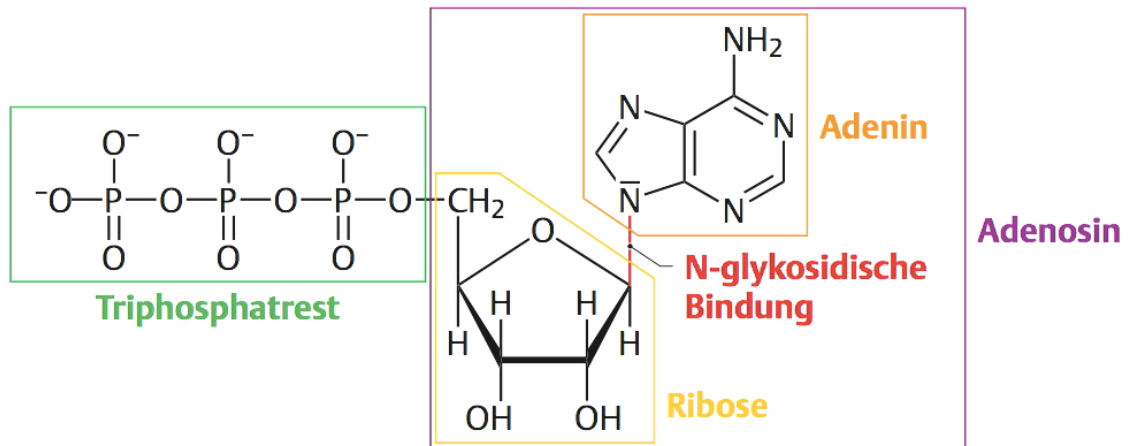


Abb. 5: Chemische Struktur von Adenosin triphosphat
(Rassow et al., 2012)

1.4.2 Intrazelluläre Funktion und Metabolismus

Intrazellulär hat Adenosin triphosphat viele unterschiedliche Funktionen. Der Aufbau eines elektrochemischen Gradienten durch Ionenpumpen und die damit einhergehende Aufrechterhaltung des Membranpotentials ist sehr energieaufwändig und an den Verbrauch von ATP geknüpft. Für die Entdeckung der ATP verbrauchenden Na^+/K^+ -ATPase in den 50er Jahren, wurde Jens C. Skou 1997 der Nobelpreis für Chemie verliehen (Skou, 1957; Clausen, 2007). ATP kann auch der Synthese anderer Nucleosidtriphosphate, mit Hilfe von spezifischen Nucleosidmono- und diphosphat-Kinasen, dienen. Die Synthese von Makromolekülen wie der RNA und DNA ist auf diese Nucleosidtriphosphate bzw. Desoxynucleosidtriphosphate als Bausteine angewiesen (Berg et al., 2002). Durch Muskelkontraktionen verbraucht der menschliche Organismus unentwegt Energie. Diese Energie, notwendig für das Lösen des Myosinkopfes vom Aktin, ist an die Hydrolyse von ATP durch seine ATPase-Funktion gebunden (Schmidt et al., 2010). Weiterhin ist das Nucleotid sehr intensiv an den intrazellulären Signalkaskaden und Regulationsmechanismen von Zellen beteiligt. Die Umwandlung von ATP in cAMP durch die Adenylatcyclase ist an dieser Stelle zu nennen. ATP ist auch ein Cosubstrat von Kinasen, die in der Lage sind, Phosphate zu übertragen. Vor allem die an der Regulation des Energiestoffwechsels (Glykogenaufbau, Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel) beteiligte, tetramere Proteinkinase A (PKA) nutzt ATP als Substrat und Coenzym für diese Übertragungsreaktionen (Alberts et al., 2002). Die Regeneration von ATP geschieht durch die von Peter Mitchell beschriebene oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien durch die ATP-Synthetase (Mitchell, 1961).

1.4.3 Extrazelluläre ATP Wirkung im Zentralen Nervensystem

Eine weitere und lang umstrittene Eigenschaft von Adenosintriphosphat ist seine extrazelluläre Wirkung, die schon 1929 durch Drury und Szent-Gyorgyi am Herz von Säugetieren beschrieben wurde (Drury and Szent-Gyorgyi, 1929). Einige Zeit später, im Jahr 1948, entdeckten Buchthal und Folkow ATP an der neuromuskulären Endplatte (Buchthal and Folkow, 1948). Der britische Wissenschaftler Geoffrey Burnstock aber war es, der das Nukleotid erstmalig als Neurotransmitter im Jahr 1972 vorschlug (Burnstock et al., 1972).

Im zentralen wie auch peripheren Nervensystem wird ATP allein oder als Cotransmitter mit anderen Neurotransmittern wie beispielsweise Glutamat, Dopamin, GABA, Noradrenalin oder Acetylcholin von Neuronen ausgeschüttet (Burnstock, 2004). Die Menge der ATP-Ausschüttung kann je nach Entwicklungsstand und den aktuellen physiologischen Umständen des Gewebes stark variieren (Ghildyal and Manchanda, 2002; Burnstock, 2007). Es hat sich herausgestellt, dass ATP sowohl exzitatorisch, als auch inhibitorisch an Nerven wirken kann (Jahr and Jessell, 1983; Redman and Silinsky, 1994). ATP hat, zusammen mit Glutamat ausgeschüttet, unter anderem eine wichtige Funktion in der Langzeitpotenzierung/-depression und den Prozessen des Lernens und der Gedächtnisbildung im Hippocampus (Pankratov et al., 2002). Neben der Erkenntnis, dass ATP die neurale Stammzellproliferation stimuliert (Ryu et al., 2003), weiß man auch, dass ATP das Neuritenwachstum von PC12-Zellen steigern kann (D'Ambrosi et al., 2001). Das Wachstum von motorischen Axonen kann ATP aber wiederum inhibieren (Cheung et al., 2005). An der Ausschüttung von Vasopressin (ADH) und Oxytocin aus der Hypophyse sind Noradrenalin und ATP synergistisch beteiligt. Auch Gliazellen sind in der Lage ATP über Vesikel und Membrankanäle auszuschütten. Dies erlaubt es ihnen, die neurale Aktivität in ihrer Umgebung zu detektieren und mit anderen Gliazellen zu kommunizieren. Dabei werden die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zellen reguliert (Fields and Burnstock, 2006).

ATP wird über den Transport durch ADP/ATP-Translokasen in Vesikeln im Bereich der präsynaptischen Membran der Nervenenden gespeichert. Dort werden teilweise Konzentrationen von bis zu 1000mM erreicht. Stimuliert durch mechanischen Stress, Hypoxie, Inflammation und einigen Agonisten kann es sowohl unter physiologischen, als auch pathophysiologischen Umständen ausgeschüttet werden (Bodin and Burnstock, 2001). Die Ausschüttung erfolgt hauptsächlich über den Weg der Exozytose. Allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass ATP über Ionenkanäle und gap junctions die Zelle

verlassen kann. Nach seiner Ausschüttung wird ATP sehr schnell durch Ectonucleotidasen hydrolysiert. Zusätzlich existieren noch sehr heterogene Gruppen von Enzymen, die ATP nach seiner Ausschüttung zu ADP, AMP und Adenosin bzw. anderen Molekülen modifizieren können (Zimmermann, 2001). Dies ist wichtig, da diese Reaktionsprodukte unterschiedliche Rezeptoren, die sogenannten Purin-Rezeptoren, bedienen und damit unterschiedliche Signalwege aktivieren.

1.5 Purin-Rezeptoren und Signalwege

Purin-Rezeptoren und deren Signalwege sind an einer fast unüberschaubaren Vielfalt von physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des Körpers beteiligt (Burnstock and Verkhratsky, 2010). Die Existenz von ATP-Rezeptoren ist seit 1972 bekannt (Burnstock 1972). Ihre Signalübertragung hat sich als einer der wichtigsten Mechanismen für interzelluläre Kommunikation im Nervensystem herausgestellt. Beeinflusst werden viele Typen von Neuronen, alle Gliazell-Typen und die Gefäßzellen. Sie haben Einfluss auf die synaptische Plastizität und die Heilung von Gewebsschäden bzw. Verletzungen im ZNS (Fields and Burnstock, 2006). Neben der Regulation und der Kontrolle von autonomen Funktionen, der Neuroprotektion, der Apoptose, der Neuronen-Glia-Interaktion, der Kontrolle des Vasotonus und der Angiogenese ist auch die Sinnesphysiologie mit der Schmerzentstehung durch Purinozeptoren bekannt (Burnstock, 2006). Sie sind für die schnelle synaptische Weiterleitung und die Regulation der neuralen Erregbarkeit mitverantwortlich (Burnstock, 2007; Abbracchio et al., 2009; Verkhratsky et al., 2009).

Purin-Rezeptoren sind eine Gruppe von Membranmolekülen, deren Funktion lange Zeit unverstanden war. Man unterteilt sie heute in P1-Rezeptoren (4 Subtypen), P2X-Rezeptoren (7 Subtypen) und P2Y-Rezeptoren (8 Subtypen). Dabei wirkt Adenosin am P1-Rezeptor, ATP und dessen verwandte Nukleotide wiederum am P2-Rezeptor. P1- und P2Y-Rezeptoren sind klassisch heptahelikale, transmembranäre Rezeptoren. Sie aktivieren die cAMP- und IP3-Signalkaskade mittels G-Proteinen und den spezifischen intrazellulären second messengern. Hinzu kommt, dass einige von ihnen mit Ionenkanälen gekoppelt sind und damit Ionenströme beeinflussen können (Burnstock and Verkhratsky, 2010). P2X-Rezeptoren sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, die vor allem für intrazellulär gerichtete Ca^{2+} -Ströme verantwortlich sind. Die verschiedenen Subgruppen der Rezeptoren zeigen hinzukommend die große biologische und pharmakologische Variabilität der Purinozeptoren (Pankratov et al., 2009).

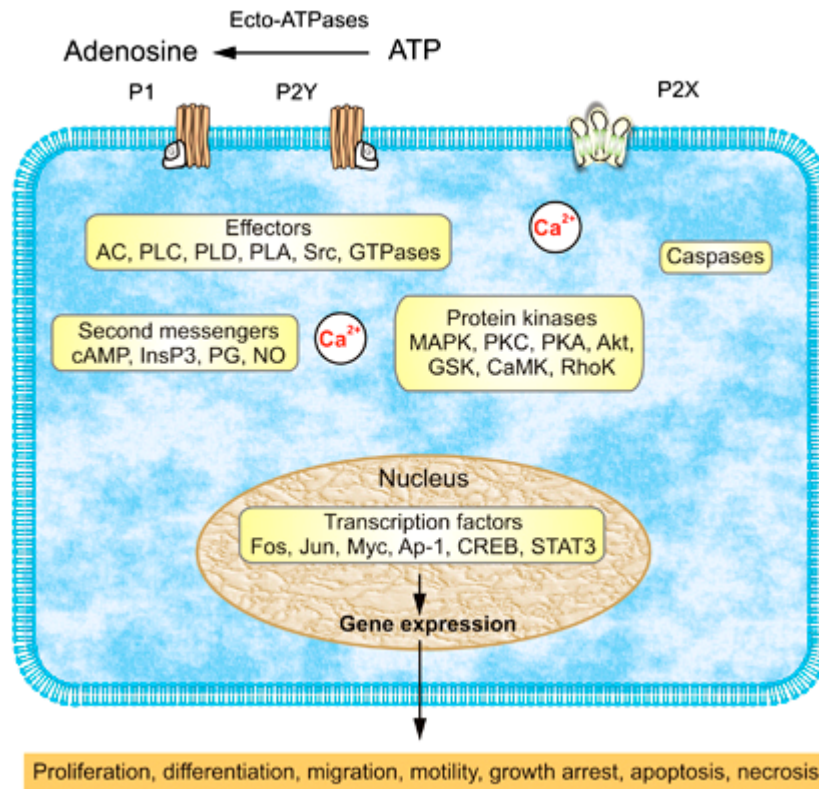


Abb. 6: Purin-Rezeptoren und Signalwege
(Burnstock and Verkhratsky, 2010)

Die Aktivierung von Purinozeptoren kann das Neuritenwachstum von PC12-Zellen steigern (D'Ambrosi et al., 2001), aber auch das Wachstum von motorischen Axonen inhibieren (Cheung et al., 2005). Es wird spekuliert, dass einige Subtypen der Purin-Rezeptoren das Neuritenwachstum stimulieren, während andere es eher inhibieren.

1.6 ATP und seine Bindungsstelle an NCAM

Im Jahr 1997 konnte erstmalig eine extrazelluläre ATPase-Funktion von NCAM verifiziert werden (Dzhandzhugazyan and Bock, 1997). Dabei befindet sich die Bindungsstelle für Adenosintriphosphat in der zweiten Fibronectin Typ-III Domäne des extrazellulären Bereichs von NCAM. Die Rolle der ATPase Aktivität von NCAM ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Eine Hypothese ist, dass sie zur Erniedrigung der extrazellulären ATP-Konzentration beiträgt. Da ATP eine Transmitterfunktion hat, benötigt es schließlich auch einen Mechanismus zur Aufhebung des ATP-Signals durch ATPasen. Die Hydrolyse-Geschwindigkeit, mit der NCAM ATP, abbaut ist allerdings relativ niedrig. Man nimmt

daher an, dass dies nicht der entscheidende Mechanismus sein kann (Hübschmann and Skladchikova, 2010). Eine weitere Hypothese ist, dass durch die ATP-Hydrolyse zyklische Konformationsänderungen von NCAM nahe der Membran möglich sind. Diese Änderungen würden damit die Signaltransduktion in das Zellinnere beeinflussen (Dzhandzhugazyan and Bock, 1997). Man weiß aber auch, dass im Bereich der zweiten Fibronectin Typ-III Domäne von NCAM eine Interaktion mit der dritten Ig-Domäne des FGF-Rezeptors geschieht. Diese Interaktion trägt zur Stimulation des Neuritenwachstums bei. Der ATP-bindende Bereich von NCAM wird genau hier überlappt und man konnte durch Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Analysen feststellen, dass ATP die NCAM-FGF-Rezeptor-Bindung inhibiert. Die Autoren dieser Studie vermuten ATP als einen Modulator dieser Interaktion und des Neuritenwachstums (Kiselyov et al., 2003). In einer 1999 veröffentlichten Studie beschäftigte man sich erstmals ausführlich mit dem Einfluss von ATP auf das durch NCAM induzierte Neuritenwachstum. Man fand heraus, dass ATP selbst und nicht seine weiteren Analoga, das Neuritenwachstum hippocampaler Zellen in abgestuften Konzentrationen inhibieren (Skladchikova et al., 1999). Aus den Ergebnissen der Studien über den Einfluss von ATP auf das Neuritenwachstum NCAM-exprimierender Zellen, wurde in einem von Hübschmann publizierten Artikel zusammenfassend spekuliert, dass das Neuritenwachstum durch ATP inhibiert werde (Hübschmann and Skladchikova, 2010).

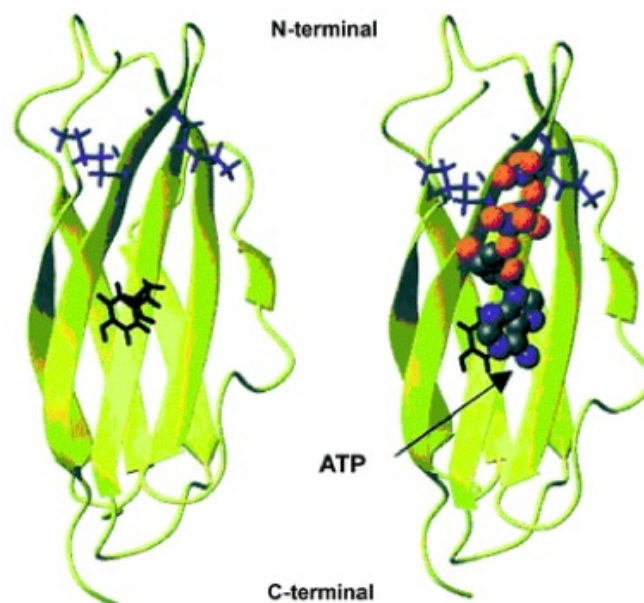


Abb. 7: Die Bindungsstelle für ATP an der 2. Fibronectin Typ-III Domäne von NCAM (Links ohne, rechts mit gebundenem ATP)
(Hübschmann and Skladchikova, 2010)

2 Zielstellung

Die Zielstellung dieser Arbeit war es, den Einfluss der Adenosintriphosphat-Bindung auf das durch NCAM-induzierte Neuritenwachstum über das RTCA-(Real-time cell analysis) Verfahren zu untersuchen. Daher wurden in einem ersten Schritt B35-Neuroblastomzellen mittels Lipofektion mit NCAM cDNA transfiziert und die Proteinexpression mittels Western Blot überprüft. Es standen danach die drei B35-Zelllinien B35-WT (ohne NCAM), B35-NCAM140 und B35-NCAM180 zur Verfügung. Bei diesen konnte nun das Neuritenwachstum über eine Zellimpedanzmessung in einem Echtzeit-Verfahren, der Real-time cell analysis, quantifiziert werden. Alle drei Zelllinien, in Abwesenheit oder Anwesenheit von ATP, wurden über einen Zeitraum von circa 12h beobachtet und der Einfluss auf die Neuritogenese sowohl gemessen als auch fotografisch dokumentiert. Die Ergebnisse sollten eine Aussage über die ATP-NCAM Interaktion bezüglich des Neuritenwachstums erlauben und zur Aufklärung der ATP-Bindungsaufgabe bzw. ATPase-Funktion des neuronalen Zelladhäsionsproteins NCAM beitragen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die für die Laborarbeit in höchster Qualitätsstufe auserwählten Chemikalien wurden bei den Experimenten nach vorgegeben Herstellerinformationen verwandt. Hierbei handelte es sich um Produkte der Firmen AppliChem (Darmstadt), Boehringer Ingelheim (Ingelheim), Gibco (Detroit), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe), Serotech (Berlin), SERVA (Heidelberg) und Sigma (München).

3.1.2 Zellkulturmaterialien

Die für die Zellkultur in höchster Qualitätsstufe auserwählten sterilen Einwegmaterialien oder selbständig autoklavierten und sterilisierten Materialien wurden bei den Arbeiten nach vorgegebenen Herstellerinformationen verwandt. Hierbei handelte es sich um Produkte der Firmen Braun (Melsungen), Eppendorf (Hamburg), Falcon (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Corning (USA) und Nunc (Wiesbaden).

3.1.3 Organismen

Eukaryotische Organismen: B35-Zellen

Bei den für die Experimente verwendeten Zelllinien handelt es sich um B35-Zellen. Diese sind Neuroblastomzellen der Ratte. Sie wurden als Wildtyp B35-Zellen von der AG Horstkorte (Halle/Saale) zur Verfügung gestellt. Nach der erfolgreichen Lipofektion der B35-Wildtypzellen, wurden die RTCA-Experimente mit dem B35-Wildtyp (ohne NCAM), den B35-NCAM140- und den B35-NCAM180-exprimierenden Zellen durchgeführt. Eine Wachstumsverdopplung findet nach circa 24 Stunden statt.

3.1.4 Vektoren

pRc-CMV-NCAM140 und pRc-CMV-NCAM180

Als Grundlage für die Experimente diente der eukaryotische Expressionsvektor pRc/CMV. In ihm wurde die cDNA für NCAM140 bzw. NCAM180 inseriert.

In Abb. 8 ist der Vektor pRc-CMV-NCAM140 dargestellt. Der Vektor pRc-CMV-NCAM180 unterscheidet sich lediglich durch ein zusätzliches Insert von 801 Basenpaaren. Das Insert kodiert für die 267 Aminosäuren längere cytoplasmatische Domäne in NCAM180.

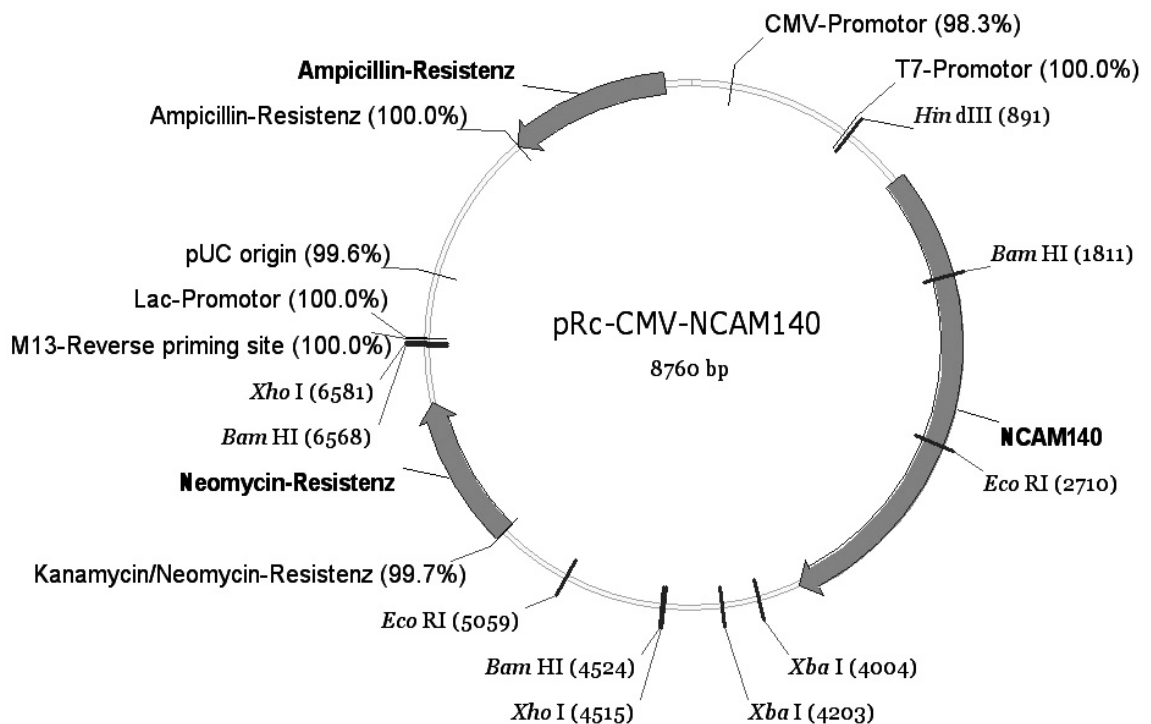


Abb. 8: Aufbau des Vektors pRc-CMV-NCAM140

3.1.5 Antikörper

Tab. 2: Primäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-NCAM 5B8 (monoklonal)	1:750	AG Horstkorte (Halle/Saale)

Tab. 3: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen-anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat)	1:5000	Dianova (Hamburg)

3.1.6 Kits, Größenmarker, Inhibitoren

Tab. 4: Kits

Kits	Hersteller
Protein Assay	BIO-RAD (USA)
Roti-Lumin (Chemilumineszenz-Substrat)	Roth (Karlsruhe)

Tab. 5: Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
Protein Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (10-250 kDa)	Fermentas (USA)

Tab. 6: Inhibitoren

Inhibitoren	Hersteller
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma (München)
Phenylmethylsulfonyl Fluorid	Sigma (München)
Halt Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific (USA)

3.1.7 Medien

Nährmedien für die Zellkultivierung der B35-Zellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

High Glucose (4,5g/L) with L-Glutamin, 500ml

Vertreiber: PAA Laboratories (Pasching)

Medium für die Transfektion von Zellen

OPTI-MEM	GIBCO (Detroit)
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen (Carlsbad)

Medienzusätze

Antibiotika

Penicillin (100U/ml)	Invitrogen (Carlsbad)
Streptomycin (0,1mg/ml)	Invitrogen (Carlsbad)
G- 418 Sulphate	PAA Laboratories (Pasching)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Carlsbad)
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Invitrogen (Carlsbad)

(Dem 500ml-DMEM-Medium wurde für die Kultivierung der Zellen 5ml Penicillin/
Streptomycin-Antibiose, 50ml Fetales Kälberserum und 5ml Glutamin zugesetzt. Die
Lagerung erfolgte bei +4°C im Kühlschrank)

Seren

FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories (Pasching)
---------------------------	-----------------------------

3.1.8 Membranen

Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman (Springfield)
Whatmanpapier	Whatman (Springfield)

3.1.9 Lösungen und Puffer

Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Gellösungen:

Lösung 1:

1,5 M Tris	36,3 g
0,2 % SDS	4 mL
auffüllen auf 200 mL	pH 8,8

Lösung 2:

0,5 M Tris	12,1 g
0,2 % SDS	4 mL
auffüllen auf 200 mL	pH 6,8

10%ige Trenngellösung

7,5	mL	Acrylamid
5,6	mL	Lösung 1
9,4	mL	H ₂ O bidest.
125	µL	APS (10%)
12,5	µL	TEMED

5x reduzierender Probenpuffer

12,5	%	SDS (w/v)
0,3	M	Tris/HCl, pH 6,8
50	%	Glycerin (v/v)
25	%	DTT
0,015	%	Bromphenolblau (w/v)

10 x Laufpuffer

0,25	M	Tris / HCl, pH 8,8
1,92	M	Glycin
1	%	SDS (w/v)
		in H ₂ O bidest.

Lösungen für den Western-Blot

Transfer-Puffer

150 mM Glycin
20 mM Tris/HCl, p8,3
10 % Ethanol (v/v)

Ponceaurot-Färbelösung

2 % Ponceaurot (w/v)
30 % Trichloressigsäure (v/v)
30 % Sulfosalicylsäure (w/v)
vor Gebrauch 1:10 in H₂O bidest. verdünnen

Waschpuffer:

TBS-Puffer

730 mM NaCl
27 mM KCl
4 M TRIS (pH7,5)

TBS-Tween

TBS-Puffer + 0,1 % Tween 20 (v/v)

Blockierungslösung: 5% Milchpulver (ROTH)

Lösungen für die Aufarbeitung von Proteinen

Solubilisationspuffer für Zellen

(pH auf 7,4 einstellen)

1 mM EDTA
1 mM EGTA
150 mM NaCl
20 mM Hepes
3 mM MgCl₂
1 mM PMSF
20 mM β-Glycerolphosphat
1 mM Natriumfluorid
1 mM Natriumorthovanadat
0,5 mM Proteaseinhibitorcocktail
1 % NP40 (Nonylphenylpolyethylenglycol)
0,5 % Natriumcholat
1 % SDS

Puffer für die Zellkultur

PBS

150 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1 mM KH₂PO₄

mit H₂O bidest. auf 1 l auffüllen, pH 7,2

mit NaCl Osmolarität auf 300 mosm einstellen

PBS/EDTA

0,5 g EDTA (=1,34 mM)

in 1 l PBS lösen

3.1.10 Peroxidase-Reaktion

Rotilumin-Lösung A (1:1)

Rotilumin-Lösung B (1:1)

3.1.11 Adenosintriphosphat (ATP)

Hersteller:	AppliChem (Darmstadt)
Lagerung:	bei -20°C
Anteil ADP:	max. 1%
Anteil AMP :	max. 0,5 %
Anteil Wasser:	ca. 10%
Molare Masse:	M = 551,10 g/mol
Formel:	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ Na ₂ O ₁₃ P ₃

ATP wird in der Regel als 100 mM wässrige Stammlösung angesetzt und bei -20°C gelagert. Diese Lösungen haben einen sauren pH-Wert. Deshalb wird die Stammlösung in diesem Fall hergestellt, indem das ATP in Wasser (9/10 des Endvolumens) gelöst und 2 M Tris Base (1/10 des Endvolumens) zugegeben wird.

Für die jeweiligen Versuchsreihen wurde generell eine neue Stammlösung hergestellt. Diese ist dann auf die benötigte Konzentration verdünnt worden.

3.1.12 Zusätzlich verwendete Chemikalien

Produktname	Hersteller	Firmensitz
EDTA reagent	Sigma-Aldrich	München
Ethidiumbromid	AppliChem	Darmstadt
Isopropanol	MERCK Group	Darmstadt
PBS	PAA Laboratories	Pasching

3.1.13 Geräte

Produktname	Hersteller	Firmensitz
Analysenwaage	Sartorius AG	Göttingen
Biosafety cabinet AURA 2000 M.A.C.	BIOAIR Instruments	Mailand
Countess Automated Cell Counter	Invitrogen	Carlsbad
E-Plates 16-well Roche	Roche Diagnostics Germany	Mannheim
Inkubator Heraeus HERAccl 150	Kendro Laboratory Products	Hanau
Kamera AxioCam ICc1	Carl Zeiss Microscopy	Berlin
Laptop HP EliteBook Mobile	Hewlett-Packard Germany	Böblingen
Magnetrührer Cimarec	Fisher Scientific	Schwerte
Mikroskop Axiovert 100	Carl Zeiss Microscopy	Berlin
Mikrowelle KOR-6305	Daewoo Electronics	Seoul
Molecular Imager Chemi Doc XRS Sys.	Bio-Rad Laboratories	München
Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystem	C.B.S. Scientific Company	Del Mar
RTCA DP (xCELLigence Systems)	Roche Diagnostics Germany	Mannheim
Thermomixer compact	Eppendorf Vertrieb	Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge Pico, Heraeus	Kendro Laboratory Products	Hanau
Vortexer Minishaker MS2	IKA- Werke	Staufen
Wasserbad/Inkubationsbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Zentrifuge Hettich Universal 320	Hettich LAB Technology	Tuttlingen

3.1.14 Arbeits- und Hilfsmaterialien

Produktname	Hersteller	Firmensitz
Desinfektion Hände Sterillium	BODE Chemie	Hamburg
Desinfektion Oberfläche Bacillol	BODE Chemie	Hamburg
Desinfektion Geräte Sekusept PLUS	ECOLAB	Mumbai
Handschuhe Sempermed PREMIUM	Semperit Tech. Produkte	Wien
Kanülen Braun Sterican	B. Braun Medical Inc.	Melsungen
Kryoröhrchen Greiner	Greiner Bio-One	Frickenhau.
Laborglasflaschen	DURAN Group	Wertheim
Microtubes Eppendorf tubes	Eppendorf Vertrieb	Hamburg
Microtubes Greiner tubes	Greiner Bio-One	Frickenhau.
Mikroliterpipetten (10/100/200/1000µl)	BRAND	Wertheim
Spritzen Braun Injekt Solo	B. Braun Medical Inc.	Melsungen
Zellkulturröhrchen Greiner	Greiner Bio-One	Frickenhau.
Zellkulturschalen Greiner	Greiner Bio-One	Frickenhau.
Zellkulturflaschen Greiner CELLSTAR	Greiner Bio-One	Frickenhau.
Wachstumsfläche: 25, 75 und 175 cm ²		

3.2 Methoden

3.2.1 Behandlung von Lösungen und Geräten

Die in den Experimenten verwendeten Materialien und Lösungen wurden durch den Prozess der Autoklavierung (20 Minuten bei 120°C) oder durch Erhitzen bei 180°C sterilisiert und damit gleichzeitig von Mikroorganismen und DNase-Aktivität befreit. Verwendete Geräte, die nicht hitzestabil waren, sowie Arbeitsflächen und Hilfsmittel wurden mit einem Flächendesinfektionsmittel (75% Ethanol) gereinigt. Die nicht autoklavierbaren Lösungen sind vor ihrer Verwendung mit einem entsprechenden Filter steril filtriert worden.

3.2.2 Allgemeine zellbiologische Methoden

Alle durchgeführten Experimente mit eukaryotischen Zelllinien wurden zu jeder Zeit in steriler Atmosphäre unter der Zellkulturbank im Labor durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C Temperatur und 5% CO₂ Begasung. Das Zentrifugieren der Zellen erfolgte stets bei 1000rpm über einen Zeitraum von 3 Minuten.

3.2.3 Kultivieren und Passagieren von eukaryotischen Zellen

Für die Kultivierung der im verwendeten Medium adhärent wachsenden B35-Zellen wurden unbeschichtete Kulturflaschen oder Kulturschalen unterschiedlicher Größe verwendet. Dabei wurden nach mikroskopischer Analyse die Zelldichte und die Vitalität der Zellen beurteilt. In einem Verhältnis von circa 1:3 oder 1:4 wurden sie alle zwei bis drei Tage verdünnt. Je nach Zellmengenbedarf konnte daraufhin die Größe des Kulturgefäßes variiert bzw. angepasst werden. Hierzu wurden die Zellen, nachdem sie vorher im PBS gewaschen und mit dem Medium abgelöst wurden, jedes Mal steril aus der Kulturflasche in ein Falconröhrchen überführt und anschließend bei 1000rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand des verbrauchten Mediums wurde danach abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die B35-

Zellen wieder in ein mit frischem Medium versetztes Kulturgefäß überführt und für einen neuen Zyklus kultiviert. Die mit NCAM-transfizierten Zelllinien wurden zusätzlich alle zwei bis drei Wochen mit G418 Antibiotikum versetzt, um die stabile Expression von NCAM über die Zeit der Experimente aufrecht zu erhalten.

3.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die eukaryotischen B35-Zellen können über einen längeren Zeitraum konserviert werden. Hierfür werden frisch gewaschene Zellen nach dem Zentrifugieren als Pellet in Fetalem Kälberserum mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen. Die Zellsuspension muss danach in ein spezielles Kryoröhrchen überführt und langsam bei mindestens -20°C für einige Stunden eingefroren werden. Nach diesem Schritt können die Zellen bei -80°C in einem Gefrierfach oder für einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Alternativ besteht auch die Möglichkeit, die Kryoröhrchen in einem Isopropanolbad sofort bei -80°C einzufrieren und für längere Zeit in flüssigem Stickstoff zu lagern. Um die Zellen wieder in eine Kultur aufzunehmen, werden die eingefrorenen Zellpellets rasch bei 37°C aufgetaut und kurz vor dem vollständigen Auftauen langsam in ein vorher erwärmtes Medium aufgenommen. Durch Zentrifugieren bei 1000rpm für 3 Minuten wird das DMSO entfernt. Das Zellpellet wird im Nährmedium resuspendiert und in Flaschen bzw. Schalen kultiviert. Nach Abschluss der hier beschriebenen Arbeiten wurden die verwendeten B35-Zellen für potentiell weiterführende Experimente in den Kühlanlagen des Labors konserviert.

3.2.5 Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Lipofektion

Durch das Verfahren der Lipofektion ist es über Liposomen möglich, Plasmid-klonierte Gene (cDNA) in eine Vielzahl von eukaryotischen Zelltypen zu transfizieren. Dabei können diese Gene danach sowohl transient als auch stabil von der jeweiligen Zelle exprimiert werden. Für die hier beschriebene Transfektion wurde das Lipofectamine 2000 Reagenz und das OPTI-MEM I-Medium verwendet.

Am vorherigen Tag bzw. sieben Stunden vor dem Beginn der Transfektion wurden 2×10^7 B35-Zellen auf eine 10^2 cm Kulturschale ausgesät und bei 37°C in DMEM/ 10 % FCS/ 1 % P/S/G kultiviert. Für die Transfektion wurden $4\ \mu\text{g}$ DNA in $250\ \mu\text{L}$ OPTI-MEM I-Medium verdünnt. Ebenso erfolgte das Lösen von $10\ \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000 Reagenz in $250\ \mu\text{L}$ OPTI-MEM I-Medium, welche anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die DNA/OPTI-MEM I-Lösung wurde hinterher in die Lipofectamine 2000/OPTI-MEM I-Lösung überführt. Während der Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur kommt es in der Lösung zu einer Formierung des DNA-Lipofectamin-Komplexes. Zwischenzeitlich wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgesaugt und durch $2\ \text{mL}$ frisches Medium (ohne Antibiotika) ersetzt. Die DNA-Lipofectamin-OPTI-MEM-Lösung wurde nun langsam unter leichtem Schwenken der Kulturschale zu den B35-Zellen getropft. Die Zellen wurden anschließend wieder bei 37°C kultiviert. Nach einer Inkubation von 16 - 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen verdünnt. Um eine stabile NCAM 140 bzw. NCAM 180 exprimierende Zelllinie zu erhalten, wurden die Zellen verdünnt und auf eine 96-Well Mikrotiterplatte gebracht. Dabei befand sich in jedem Well nur eine Zelle. Die einzelnen Zellklone wurden weiterhin mit G418 selektiert und mittels Immunoblot auf NCAM-Expression überprüft. Jeweils eine dieser stabilen Zelllinien wurde dann für die Experimente verwendet.

3.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page) wurde um 1970 von Ulrich K. Laemmli, Professor und Lehrstuhlinhaber für Biochemie und Molekulare Biologie an der Universität Genf, für den wissenschaftlichen Nutzen entwickelt. Sie ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen zu linearisieren und nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Die Porengröße der Gele wird je nach Größe der aufzutrennenden Moleküle über den Acrylamidanteil variiert (Laemmli, 1970).

Es wurden für die hier beschriebenen Experimente der vertikalen Elektrophorese die Gelapparatur der Firma C.B.S. SCIENTIFIC Company verwendet. Als Trenngele wurden 10%-ige Acrylamid-Gele genutzt. Die verwendeten Lösungen für die Herstellung der Trenngele wurden eigenständig zusammengemischt, bis circa zwei Zentimeter unterhalb der oberen Glasplattenkante gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel hergestellt. Die zu

analysierenden Proben wurden mit einem reduzierenden SDS-Probenpuffer versetzt und circa 5 Minuten bei 95°C behandelt. Die SDS-PAGE begann mit dem Einlaufen der Analysen in das Sammelgel bei konstanter Spannung von 100 V. Die Auftrennung der Proteine wurde bei konstanter Spannung von 140 V im Trenngel durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Proteinleiter der Firma Fermentas, die Page ruler prestained protein ladder, in der SDS-Page für die darauffolgende Analyse als Größenmarkierung eingesetzt.

3.2.7 Western Blot

Die 1979 von der Arbeitsgruppe um Professor George R. Stark an der University of Stanford entwickelte Methode des Western Blots erlaubt es, die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine aus dem verwendeten Gel auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen. Die Epitope der somit übertragenen Proteine können dann nach Inkubation über nicht-kovalente Bindungen mit spezifischen Antikörpern reagieren. Mit Hilfe eines sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörpers ist es nun möglich, diese zu binden und zu detektieren (Renart et al., 1979).

Für die Experimente wurde das Tank-Blot-Verfahren genutzt und mit Hilfe der Blotapparatur der C.B.S. SCIENTIFIC Company durchgeführt. Nach der Äquibrierung von Whatmanpapier und Nitrocellulosemembran in einem Transferpuffer wurde der Sandwichblot luftblasenfrei zusammengebaut. Die Nitrocellulosemembran war dabei immer der Anode zugewandt. Der Proteintransfer erfolgte bei 4°C und mit einer konstanten Stromstärke von 330 mA für 70 Minuten im Transferpuffer. Anschließend wurden die transferierten Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit Hilfe einer Ponceaurot-Färbelösung reversibel angefärbt und dargestellt. Dazu wurde die Membran circa eine Minute in der Ponceaurot-Färbelösung geschwenkt und anschließend in Aqua bidestillata solange gespült bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Vor der Inkubation mit den primären Antikörpern wurde die Membran wiederum entfärbt. Zu Beginn der Antikörperinkubation wurden die Proteine auf der Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 5%igem Magermilchpulver (w/v) bzw. mit 5%igem BSA (w/v), welches in TBS-Tween gelöst wurde, behandelt. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit TBS-Tween, erfolgte die Inkubation mit dem im TBS-Tween verdünnten ersten Antikörper über Nacht bei 4°C. Nach Entfernen des Antikörpers wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit TBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper, einem

Peroxidase gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (1:5000), für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Western Blot wurde danach mindestens drei Mal für 10 Minuten gründlich gewaschen, wobei beim letzten Waschschrift das TBS ohne Tween verwendet wurde. Die Proteine mit den primären nicht-kovalent gebundenen Antikörpern und den daran gekoppelten sekundären Antikörpern konnten nun unter Anwendung des ECL-Systems (Enhanced-Chemiluminescence-System) auf der Nitrocellulosemembran nachgewiesen werden. Dabei katalysiert die mit dem sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase eine Reaktion, die von einer Chemolumineszenz begleitet wird und somit optisch dargestellt werden kann. Die Nitrocellulosemembran wurde auf eine zurechtgeschnittene Kopierfolie gelegt und anschließend mit einer Mischung aus gleichen Flüssigkeitsmengen Rotilumin-Lösung A und Rotilumin-Lösung B des Rotilumin Chemolumineszenz-Substrat-Kits für circa eine Minute inkubiert. Abschließend konnten mit Hilfe des Molecular Imager ChemiDoc XRS Systems der Firma BIO RAD die Proteine des Western Blots optisch dargestellt und analysiert werden.

3.2.8 Zellzahlbestimmung

Die adhärent wachsenden B35-Zellen wurden für die Zellzahlbestimmung aus ihren unbeschichteten Kulturflaschen/Schalen abgelöst. Danach erfolgte die Überführung in ein Falconröhrchen mit anschließender Zentrifugation. Das Pellet wurde hinterher in 10 mL frischem Medium gut resuspendiert und aus diesem ein Volumen von 1 μ L zusammen mit 9 μ L Trypanblau auf eine Neubauer-Zählkammer des Countes automated cell counters gebracht. Es erfolgte nun eine Doppelbestimmung der jeweiligen Zelllinien. Nach Auswertung des Gerätes und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors konnten so die Zellzahlen für die Versuchsreihen ermittelt werden.

3.2.9 Das xCELLLigence RTCA DB System

Im Fokus der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit stand die Beobachtung und Auswertung der Zellexperimente unter Verwendung des Real-time cell analysers (RTCA). Dieses System wurde in den vergangenen Jahren von ACEA Biosciences Inc. entworfen und der Firma Roche weiterentwickelt. Die Funktionsweise beruht auf dem Electric Cell-substrate impedance sensing (ECIS) und ist ein in der Wissenschaft schon lang bewährtes und in Anwendung gebrachtes Verfahren. Dabei werden mittels Gold beschichteter

Mikroelektroden Informationen über die Proliferation, Adhäsion, Migration, Invasion, Funktionsfähigkeit und die Überlebensfähigkeit von Zellen in Echtzeit erworben. (Xiao et al., 2002)

Zellen wirken aufgrund der isolierenden Eigenschaften ihrer Plasmamembran wie dielektrische Partikel. Änderungen ihrer Form, beispielsweise infolge eines externen Stimulus, ändern die Oberfläche der Plasmamembran und die Stromwege um und durch die Zelle. Die messbare Impedanz (Wechselstromwiderstand) dieser Stromwege steigt sowohl mit zunehmender Adhäsionsfläche, als auch mit der Zellzahl. Sie kann mit einer oder mehreren Frequenzen als Funktion der Zeit in dem System der RTCA aufgezeichnet werden. Dabei wird die relative Impedanzänderung von der RTCA als sogenannter Zellindex dargestellt. Als relative Veränderung der elektrischen Impedanz repräsentiert der Zellindex generell den Echtzeitstatus einer Zellpopulation und wird durch Faktoren wie Zelladhäsion, Entwicklungsfähigkeit und der Zellmorphologie beeinflusst. Der integrierte Laptop zeichnet diesen Zellindex kontinuierlich auf und ist somit für bioanalytische Zwecke nutzbar (Giaever and Keese, 1993; Roche, 2008).

Um das Neuritenwachstum der B35-Zellen in der RTCA in Echtzeit registrieren und beobachten zu können, war es notwendig vor jedem Experiment die dafür erforderlichen E-Plates vorzubereiten. Dabei handelt es sich um Mikrotiterplatten, deren 16 Wells mit zu 80%-Gold beschichteten Mikroelektroden ausgestattet sind. Diese sind mit einer biokompatiblen Oberfläche versehen und erlauben daher ein adhärentes Wachstum von Zellen. Um ein optimales Wachstumsmilieu zu gewährleisten, wurde jedes Well mit dem dafür vorgesehenen Ansatz aus Nährmedium mit Zusätzen und unterschiedlichen, für die Experimente ausschlaggebenden ATP-Konzentrationen, beschickt. Nachdem die Mikrotiterplatten vorbereitet waren, konnten die Zellen in die Wells eingebracht werden. Es wurden in alle Kammern konstant 30.000 B35-Zellen nach einer Zellzahlbestimmung pipettiert. Danach wurde die xCELLigence RTCA in der Regel für 48h gestartet. Das RTCA-Messmodul befand sich bei allen Experimenten in einem Inkubator bei konstanter Temperatur von 37°C und unter 5% CO₂-Begasung. Anschließend wurden die erhaltenen Daten über das Neuritenwachstum mit Hilfe der RTCA Software analysiert und ausgewertet. Die Arbeitsgruppe Horstkorte verifizierte bereits 2012 anhand von PC12-Zellexperimenten, dass der Zellindex der RTCA mit der Neuritenlänge korreliert. Sie verglichen in einigen Experimenten die von Hand einzeln ausgemessene Methode mit dem Neuritenwachstum, welches die RTCA erfasst. Die Ergebnisse stimmten überein. Der Zellindex ist somit als Maß für das Neuritenwachstum verwendbar (Pollsheit et al., 2012).

3.2.10 Fotografie der Zellen

Für die Fotografie der B35-Zellen und damit der visuellen Darstellung des Neuritenwachstums und des Proliferationsverhaltens der Zelllinien, wurde die AxioCam ICc1 der Firma Carl Zeiss verwendet. Das Axiovert 100 Mikroskop dieser Firma erlaubt den Aufsatz der AxioCam Digitalkamera.

Die Zellen wurden, wie bei allen vorausgehenden RTCA-Versuchen, unter gleichen Bedingungen behandelt. Auch hier wurde, um ein optimales Wachstumsmilieu zu gewährleisten, jedes Well mit dem dafür vorgesehenen Ansatz aus Nährmedium mit Zusätzen und unterschiedlichen für die Experimente ausschlaggebenden ATP-Konzentrationen beschickt. Die Wellplatten wurden für die Fotoversuche nach einer Zellzahlbestimmung konstant mit 30.000 bzw. 60.000 B35-Zellen beschickt, um sowohl eine Übersichtsaufnahme als auch eine Aufnahme im Großformat zu erhalten. Für das Wachstum befanden sich die Zellen im Inkubator bei konstanter Temperatur von 37°C und unter 5% CO₂-Begasung. Zwischenzeitlich wurden die Zellen nach den jeweiligen Zeitabständen von 0 Stunden und 12 Stunden fotografiert und darauffolgend das Neuritenwachstum analysiert, ausgewertet und mit den Ergebnissen der RTCA verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Transfektion

Für die Untersuchung des Einflusses von Adenosintriphosphat auf das NCAM-induzierte Neuritenwachstum wurden zunächst NCAM140- und NCAM180-exprimierende B35-Neuroblastomzellen generiert. Die Vektoren, in denen unter der Kontrolle eines CMV-Promoters die NCAM140- und NCAM180-cDNA integriert war, wurden durch Transfektion mit Hilfe von Lipofectamine in den Wildtyp der B35-Zelllinie eingeschleust. Die einzelnen, aus einer Zelle hervorgegangenen, Zellklone wurden in 96-Well Mikrotiterplatten mit G418 Antibiose selektiert. Die Überprüfung der NCAM-Expression erfolgte daraufhin durch einen Western Blot aller drei Zelllinien. Hierbei wurden die beiden NCAM-Varianten durch den an die zytoplasmatische Domäne und damit intrazellulär bindenden 5B8 Anti-NCAM-Antikörper detektiert und mit Hilfe eines zweiten Peroxidase-gekoppelten Antikörpers sichtbar gemacht. In der Abb. 9 sind die NCAM-Proteine mit 140 kDa und 180 kDa deutlich sichtbar. Der B35-Wildtyp exprimiert keine NCAM-Moleküle. Als Ergebnis lagen die drei Zelllinien, B35-Wildtyp ohne NCAM (B35-WT), B35 mit NCAM 140-Expression (B35-NCAM140) und B35 mit NCAM 180-Expression (B35-NCAM180) vor. Sie schufen die Grundlage für die sich anschließenden Untersuchung des Neuritenwachstums durch das RTCA-Verfahren.

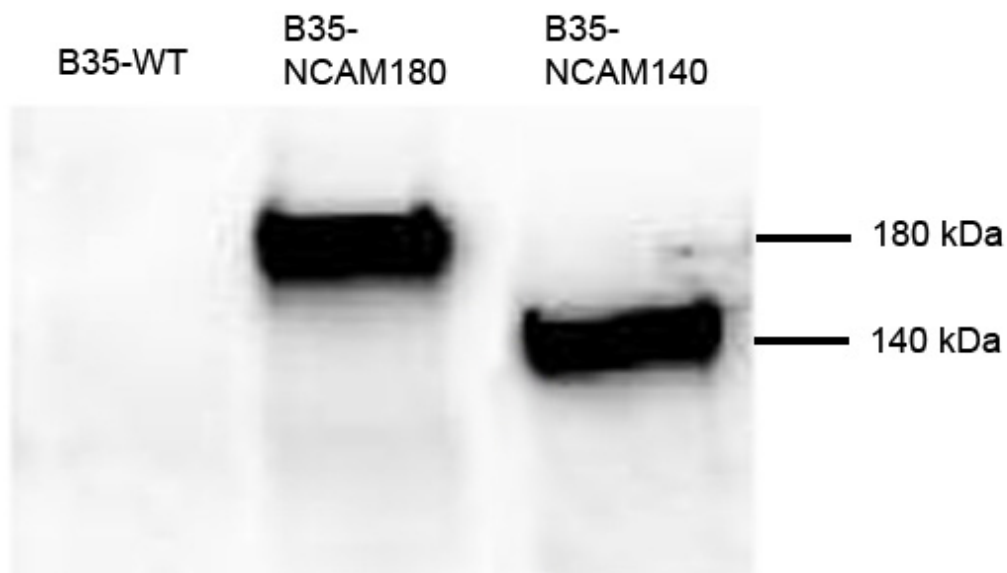


Abb. 9: Western Blot der drei Zelllinien mit Darstellung der NCAM-Expression

Für den optimalen Ablauf der RTCA-Analysen wurden die einzelnen Experimente in Versuchskomplexen durchgeführt. Diese Versuchskomplexe bauten sukzessiv aufeinander auf, um die Übersichtlichkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Experimente in den einzelnen Versuchskomplexen wurden mindestens drei Mal wiederholt, um einen entsprechend hohen Aussagewert zu erhalten. Zusätzlich wurden immer doppelt und zu einem Teil auch vierfach Bestimmungen vorgenommen. Für die Echtzeit-Aufnahmen beschränkten wir uns auf einen Zeitraum von 12 Stunden, da sich das Neuritenwachstum hauptsächlich in diesem Zeitintervall entscheidend vollzieht. In allen Experimenten wurde zusätzlich ein Leerwert (Medium ohne Zellen) mitbestimmt.

4.2 Neuritenwachstum von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180

Dieser erste Versuchskomplex diente der Analyse und Gegenüberstellung des Neuritenwachstums der B35-Zellen vom Wildtyp und der B35-Zellen mit integriertem NCAM140 und NCAM180 in normalem Nährmedium ohne beeinflussende Zusätze. Die Zellen wurden alle in gleicher Zellzahl unter exakt gleichen Voraussetzungen auf Neuritenwachstum untersucht und verglichen. Die Abb. 10 zeigt die Gegenüberstellung des Neuritenwachstums der B35-WT-Zellen, der B35-NCAM140- und der B35-NCAM180-Zellen in normalem Medium ohne Zusätze.

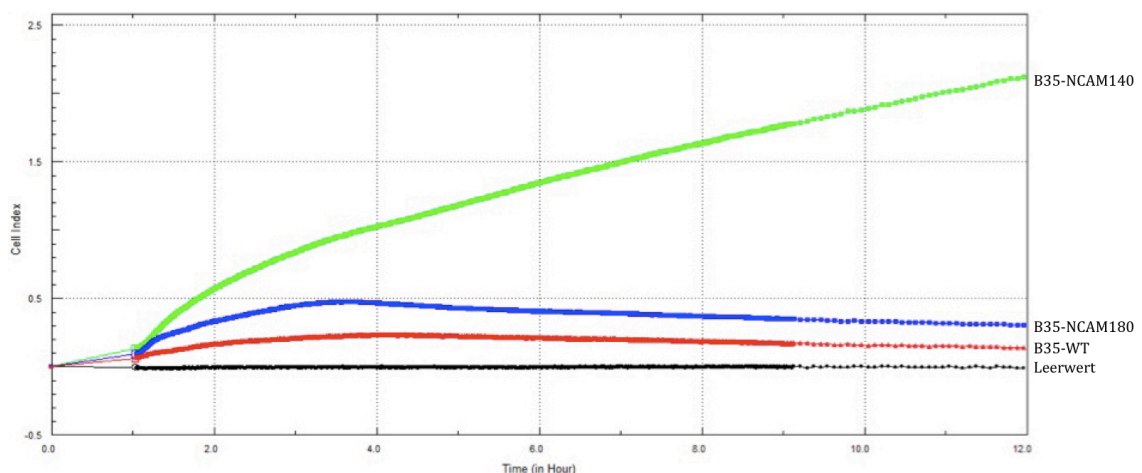


Abb. 10: Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180 in normalem Medium

Graph 1 (Schwarz): Leerwert
Graph 2 (Rot): B35-WT

Graph 3 (Grün): B35-NCAM140
Graph 4 (Blau): B35-NCAM180

In der Abb. 10 ist deutlich sichtbar, dass es ein NCAM-induziertes Neuritenwachstum, dargestellt über einen stärkeren Anstieg des Zellindex (CI= Cell Index), bei den B35-NCAM140-Zellen und B35-NCAM180-Zellen gegenüber dem B35-Wildtyp gibt. Die Zellen mit NCAM140-Expression zeigen ein noch wesentlich stärkeres Neuritenwachstum als die Zellen mit NCAM180-Expression. Der CI der B35-WT-Zellen liegt nach 12h bei ungefähr CI= 0,2. Der CI der B35-NCAM140-Zellen liegt nach 12h bei ungefähr CI= 2,2. Der CI der B35-NCAM180-Zellen liegt nach 12h bei ungefähr CI= 0,3. Das Leermedium ohne Zellen verursacht keine Veränderungen im Zellindex. Alle Zelllinien zeigen eine Adhäsionsphase über die ersten 1 bis 2 Stunden, die durch einen Initial-Anstieg des CI gekennzeichnet ist.

Um die RTCA-Ergebnisse visuell zu überprüfen wurden Foto-Dokumentationen durchgeführt. Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl unter selben Bedingungen beobachtet und über digitale Fotografie aus dem Mikroskop aufgezeichnet. Die Abb. 11 zeigt die fotografische Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT-, B35-NCAM140- und B35-NCAM180-Zellen zu Beginn der Experimente und nach 12 Stunden. Nach 12 Stunden ist die Neuritogenese der B35-NCAM140- und B35-NCAM180-Zellen wesentlich weiter fortgeschritten als das der B35-WT-Zellen. Wobei die NCAM140-exprimierende Zelllinie das stärkste Neuritenwachstum aufweist.

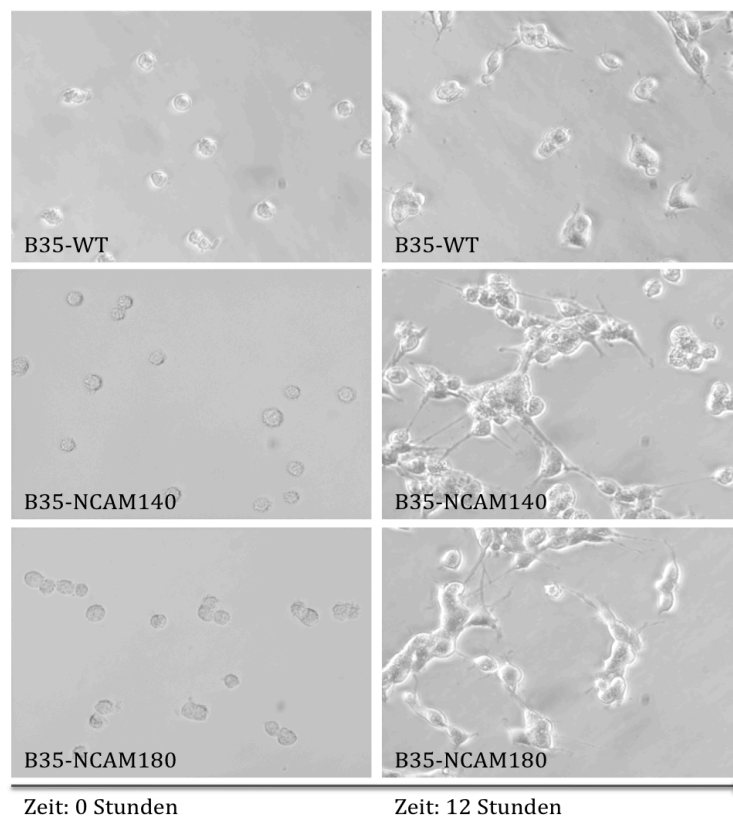


Abb. 11: Fotografische Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180 in normalem Medium zu Beginn und nach 12h

4.3 Einfluss von ATP auf das Neuritenwachstum der B35-Zelllinien

In diesem zweiten Versuchskomplex wurde die Interaktion zwischen Adenosin-triphosphat und dem NCAM-induziertem Neuritenwachstum untersucht. Da ATP in den Vesikeln der präsynaptischen Membran der Nervenenden in sehr unterschiedlichen Konzentrationen (bis zu 1000mM) gespeichert und in den Extrazellulärraum ausgeschüttet wird, orientierten wir uns an der aktuellen Studienlage und bereits vorhandenen Versuchen mit ATP bezüglich der verwendeten Konzentrationen (Kiselyov et al., 2003; Fields and Burnstock, 2006). Die Experimente wurden zuerst mit einer ATP-Konzentration von 2,5mM durchgeführt. Hinzukommend liegen die OH-Gruppen der Phosphate des ATP-Moleküls in wässriger Lösung dissoziiert vor. Daher ist ATP in der Lage als Protonendonator zu wirken. Um keinen zusätzlich beeinflussenden Effekt durch eine pH-Wert-Veränderung zu erhalten, nutzten wir demnach die neutralisierenden Eigenschaften eines Tris-Puffers für alle weiteren Versuche.

Im ersten Schritt erfolgte unter 2,5mM ATP und im normalem Medium ein Vergleich zwischen B35-WT und B35-NCAM140-exprimierenden Zellen.

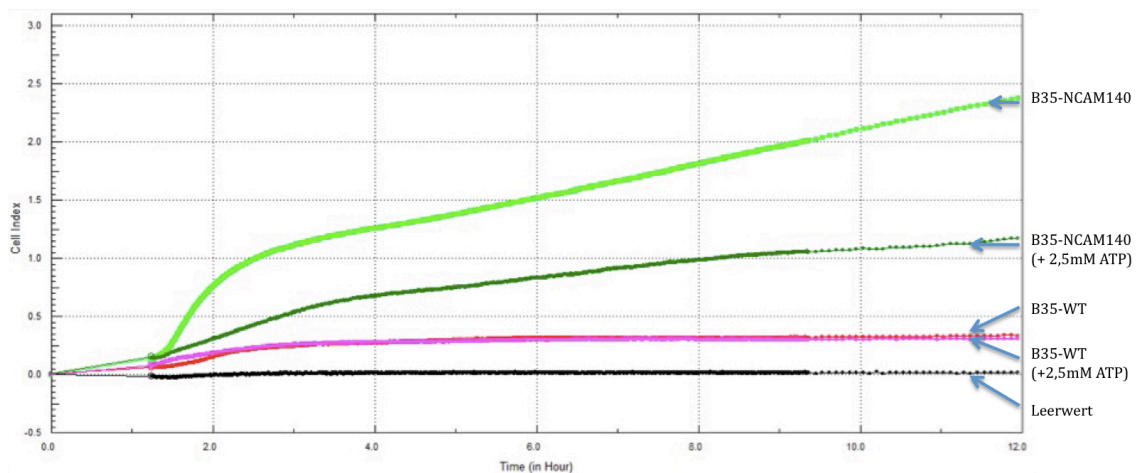


Abb. 12: Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT und B35-NCAM140 in normalem Medium und unter 2,5mM ATP

- Graph 1 (Schwarz) Leerwert
- Graph 2 (Rot) B35-WT
- Graph 3 (Magenta) B35-WT mit 2,5mM ATP
- Graph 4 (Hellgrün) B35-NCAM140
- Graph 5 (Dunkelgrün) B35-NCAM 140 mit 2,5mM ATP

Anhand der Abb. 12 erkennt man die Entwicklung des Neuritenwachstums von B35-WT- und B35-NCAM140-Zellen im normalem Medium, wie sie auch im ersten Versuchskomplex gezeigt wurde. Dabei liegt der Zellindex für die B35-NCAM140 nach 12h bei ungefähr $CI= 2,4$. Die B35-WT haben nach 12h einen Zellindex von $CI= 0,3$. Unter einer 2,5mM ATP-Konzentration zeigte sich bei den B35-WT keine Veränderung im Zellindex. Dieser blieb bei ungefähr $CI= 0,3$. Die NCAM140-exprimierenden Neuroblastomzellen zeigten nach 12h eine ausgesprochene Suppression des Neuritenwachstums mit einem Zellindex von ungefähr $CI= 1,2$ gegenüber im normalem Medium mit $CI= 2,4$.

Im zweiten Schritt erfolgte unter 2,5mM ATP und im normalem Medium ein Vergleich zwischen B35-WT und B35-NCAM180-exprimierenden Zellen.

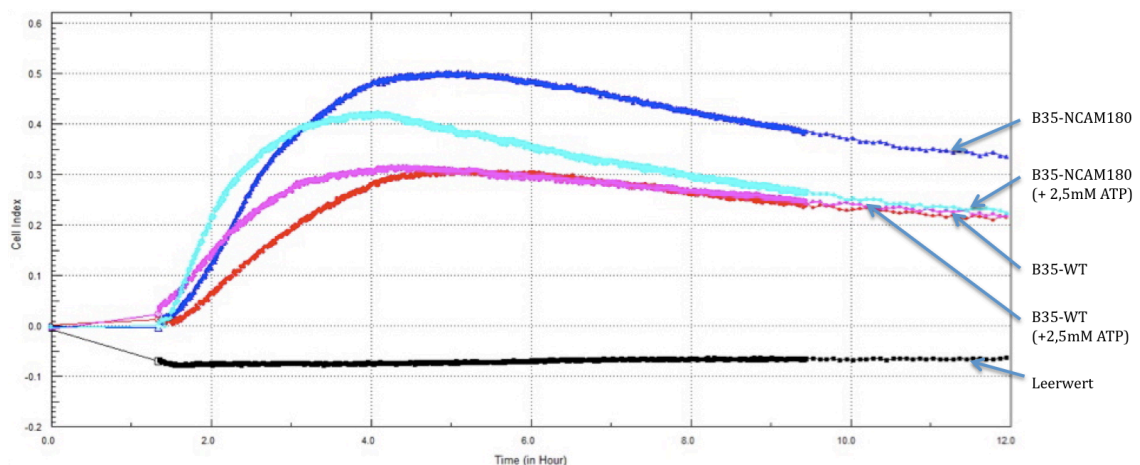


Abb. 13: Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT und B35-NCAM180 in normalem Medium und unter 2,5mM ATP

- Graph 1 (Schwarz) Leerwert
- Graph 2 (Rot) B35-WT
- Graph 3 (Magenta) B35-WT mit 2,5mM ATP
- Graph 4 (Blau) B35-NCAM180
- Graph 5 (Türkies) B35-NCAM 180 mit 2,5mM ATP

Anhand der Abb. 13 erkennt man die Entwicklung des Neuritenwachstums von B35-WT- und B35-NCAM180-Zellen im normalem Medium, wie sie auch im ersten Versuchskomplex gezeigt wurde. Dabei liegt der Zellindex für die B35-NCAM180 Zellen nach 12h bei ungefähr $CI= 0,33$. Die B35-WT Zellen haben nach 12h einen Zellindex von ungefähr $CI= 0,21$. Unter einer 2,5mM ATP-Konzentration zeigte sich bei den B35-Wildtyp Zellen keine Veränderung im Zellindex. Dieser blieb bei ungefähr $CI= 0,21$. Die NCAM180-

exprimierenden Neuroblastomzellen zeigten nach 12h eine leichte Suppression des Neuritenwachstums mit einem Zellindex von ungefähr CI= 0,22 gegenüber im normalem Medium mit CI= 0,33. Es ließ sich also auch für die Neuroblastomzellen mit der NCAM180-Expression zeigen, dass Adenosintriphosphat einen hemmenden Einfluss auf das Neuritenwachstum hat.

Im dritten Schritt erfolgte in einem neuen Versuch, unter 2,5mM ATP und im normalem Medium nochmals ein Vergleich zwischen B35-WT, B35-NCAM140- und B35-NCAM180-exprimierenden Zellen.

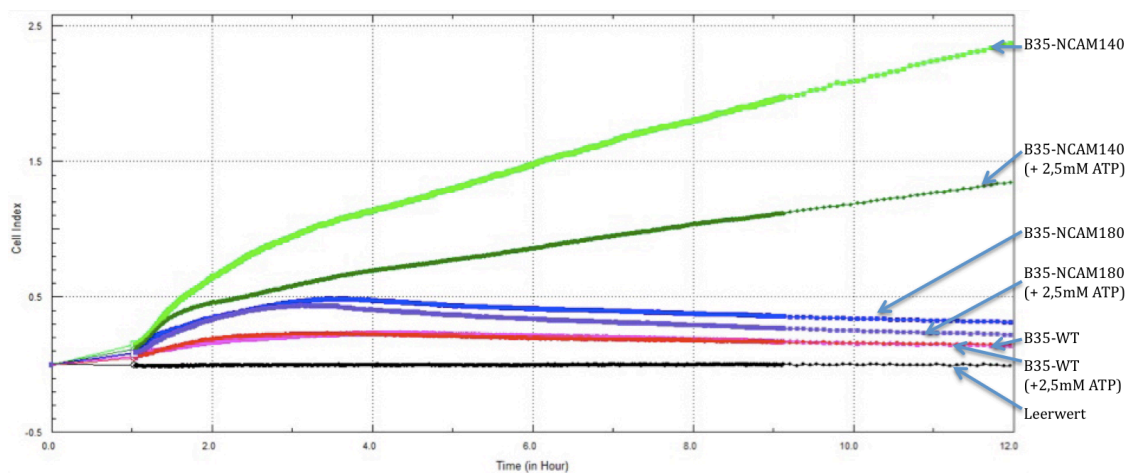


Abb. 14: Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180 in normalem Medium und unter 2,5mM ATP

- Graph 1 (Schwarz) Leerwert
- Graph 2 (Rot) B35-WT
- Graph 3 (Magenta) B35-WT mit 2,5mM ATP
- Graph 4 (Hellgrün) B35-NCAM140
- Graph 5 (Dunkelgrün) B35-NCAM140 mit 2,5mM ATP
- Graph 6 (Blau) B35-NCAM180
- Graph 7 (Lila) B35-NCAM 180 mit 2,5mM ATP

Anhand der Abb. 14 erkennt man die regelrechte Entwicklung des Neuritenwachstums von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180 Zellen im normalem Medium, wie sie auch im ersten Versuchskomplex gezeigt wurde. Alle Zellen zeigen eine Adhäsionsphase in den ersten 2 Stunden. Die B35-WT Zellen haben im normalem Medium nach 12h einen Zellindex von CI= 0,2. Unter einer 2,5mM ATP-Konzentration zeigte sich bei den B35-WT-Zellen keine Veränderung im Zellindex. Dieser blieb bei ungefähr CI= 0,2. Die NCAM140-exprimierenden Neuroblastomzellen zeigten nach 12h in 2,5mM ATP eine ausgesprochene Suppression des Neuritenwachstums mit einem Zellindex von ungefähr CI= 1,3 gegenüber

im normalem Medium mit CI= 2,4. Die NCAM180-exprimierenden Zellen zeigten nach 12h in 2,5mM ATP eine Suppression des Neuritenwachstums mit einem Zellindex von ungefähr CI= 0,2 gegenüber im normalem Medium mit CI= 0,3. Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass das Neuritenwachstum durch Adenosintriphosphat sowohl einen hemmenden Einfluss bei den NCAM140-exprimierenden, als auch bei den NCAM180-exprimierenden Zellen hat.

Auch zum Abschluss dieses Versuchskomplexes wurden digitale Fotoserien der Zellen und des Neuritenwachstums zu Beginn und nach 12h angefertigt. Diese sind in Abb. 15 dargestellt.

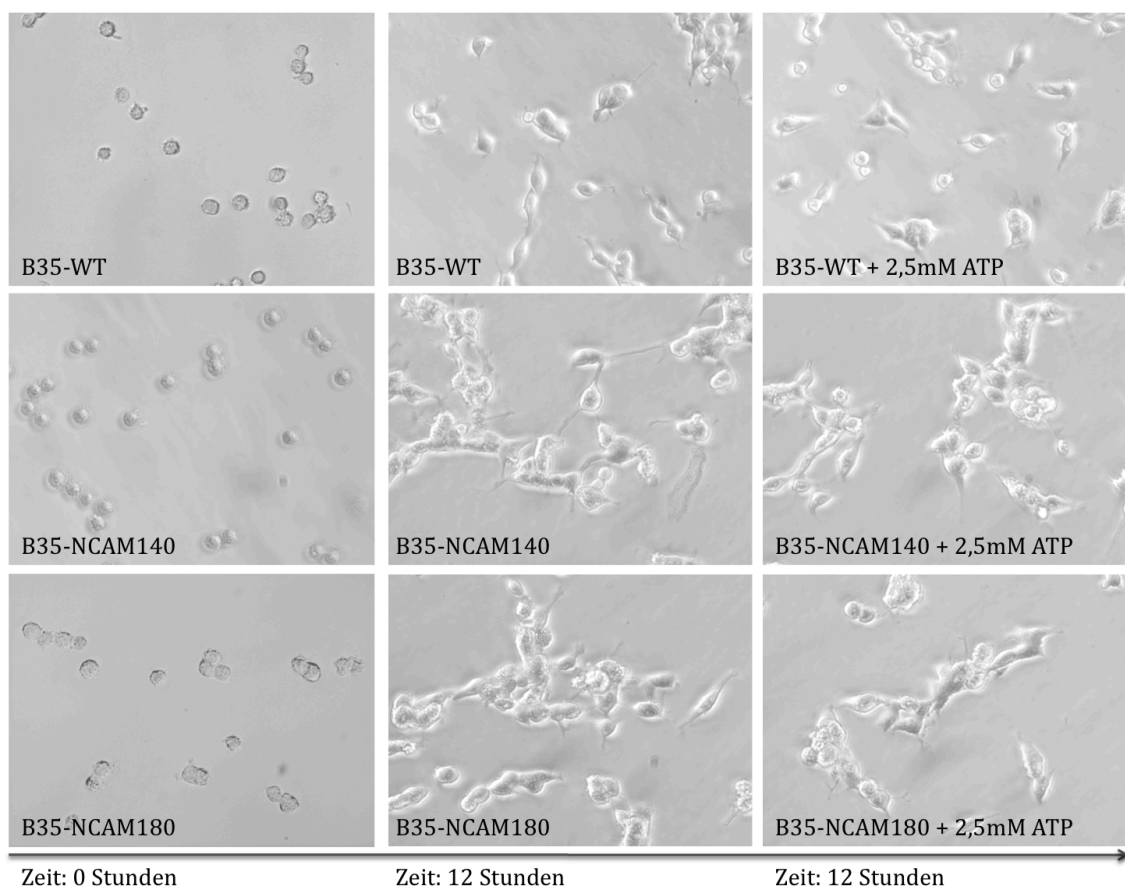


Abb. 15: Fotografische Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180 in normalem Medium und unter 2,5mM ATP zu Beginn und nach 12h

4.4 Einfluss verschiedener ATP-Konzentrationen auf das Neuritenwachstum

In diesem letzten Versuchskomplex stellte sich die Frage, ob eine abgestufte Veränderung der extrazellulären ATP-Konzentration auch mit einem abgestuften Effekt des Neuritenwachstums einhergeht. Nachdem Versuchskomplex 2 mit einer entsprechenden ATP-Konzentration von 2,5mM durchgeführt wurde, konnten in diesem Abschnitt B35-WT mit B35-NCAM140- und B35-NCAM180-Zellen in normalem Medium und unter verschiedenen ATP-Konzentrationen untersucht werden. Es wurden aufsteigende ATP-Konzentrationen von 1mM, 2mM und 2,5mM verwendet.

Im ersten Schritt erfolgte im normalem Medium und unter 1mM, 2mM und 2,5mM ATP-Lösung ein Vergleich zwischen B35-WT und B35-NCAM140-exprimierenden Zellen.

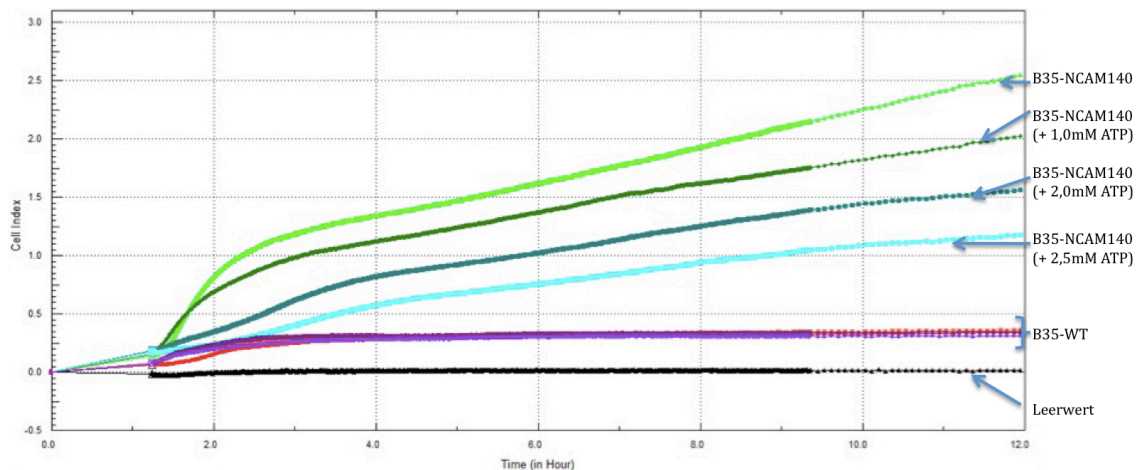


Abb. 16: Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT und B35-NCAM140 in normalem Medium und unter 1mM; 2mM; 2,5mM ATP

Graph 1 (Schwarz) Leerwert

Graph 2 (Rot) B35-WT

Graph 3 (Magenta) B35-WT mit 1mM ATP

Graph 4 (Orange) B35-WT mit 2,0mM ATP

Graph 5 (Lila) B35-WT mit 2,5mM ATP

Graph 6 (Hellgrün) B35-NCAM140

Graph 7 (Dunkelgrün) B35-NCAM140 mit 1mM ATP

Graph 8 (Mintgrün) B35-NCAM140 mit 2mM ATP

Graph 9 (Türkies) B35-NCAM140 mit 2,5mM ATP

In der Abb. 16 zeigt sich eine Entwicklung des Neuritenwachstums der B35-Wildtyp Zellen im normalem Medium und unter der Zugabe von 1mM, 2mM, 2,5mM ATP mit einem nahezu gleichen Zellindex von $CI = 0,3$. Es lässt sich daher vermuten, dass ATP auf diese Zelllinie keinen Einfluss hatte. Die NCAM140-exprimierenden Zellen zeigten im normalem Medium ein Neuritenwachstum wie es unter anderem aus dem ersten Versuchskomplex bekannt war. Nach 12h hatten sie einen Zellindex von ungefähr $CI = 2,6$. Unter 1mM ATP

konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI= 2$ gemessen werden. Unter 2mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI= 1,6$ gemessen werden. Unter 2,5mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI= 1,2$ gemessen werden. Daher lässt sich hier eine abgestufte Hemmung des Neuritenwachstums bei NCAM140-exprimierenden Zellen gegenüber B35-Wildtyp Zellen, welche sich unbeeinflusst durch die stufenweise Zugabe von ATP zeigen, veranschaulichen.

Im zweiten Schritt erfolgte im normalem Medium und unter 1mM, 2mM und 2,5mM ATP-Lösung ein Vergleich zwischen B35-WT und B35-NCAM180-exprimierenden Zellen.

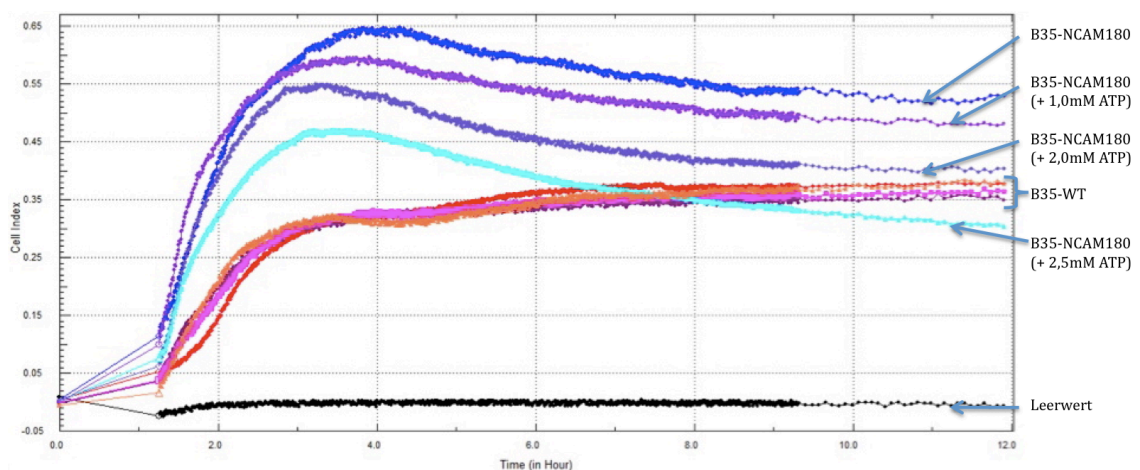


Abb. 17: Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT und B35-NCAM180 in normalem Medium und unter 1mM; 2mM; 2,5mM ATP

Graph 1 (Schwarz) Leerwert

Graph 2 (Rot) B35-WT

Graph 3 (Dunkelrot) B35-WT mit 1mM ATP

Graph 4 (Orange) B35-WT mit 2,0mM ATP

Graph 5 (Magenta) B35-WT mit 2,5mM ATP

Graph 6 (Dunkelblau) B35-NCAM180

Graph 7 (Lila) B35-NCAM180 mit 1mM ATP

Graph 8 (Blau) B35-NCAM180 mit 2mM ATP

Graph 9 (Türkies) B35-NCAM 180 mit 2,5mM ATP

In der Abb. 17 zeigt sich eine Entwicklung des Neuritenwachstums der B35-Wildtyp Zellen im normalem Medium und unter der Zugabe von 1mM, 2mM, 2,5mM ATP mit einem CI zwischen 0,35-0,45. Daher lässt sich auch hier vermuten, dass ATP auf diese Zelllinie keinen Einfluss hatte. Die NCAM180-exprimierenden Zellen zeigten im normalem Medium ein Neuritenwachstum, wie es unter anderem aus dem ersten Versuchskomplex bekannt war. Nach 12h hatten sie einen Zellindex von ungefähr $CI= 0,53$. Unter 1mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI= 0,5$ gemessen werden. Unter 2mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI= 0,4$ gemessen werden. Unter 2,5mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI= 0,3$ gemessen werden. Daher lässt sich auch hier eine

abgestufte Hemmung des Neuritenwachstums bei NCAM180-exprimierenden Zellen gegenüber B35-Wildtyp Zellen, welche sich unbeeinflusst durch die stufenweise Zugabe von ATP zeigen, veranschaulichen.

Im dritten Schritt erfolgte in einem neuen Versuch im normalen Medium und unter 1mM, 2mM und 2,5mM ATP-Lösung ein Vergleich zwischen B35-WT, B35-NCAM140- und B35-NCAM180-exprimierenden Zellen.

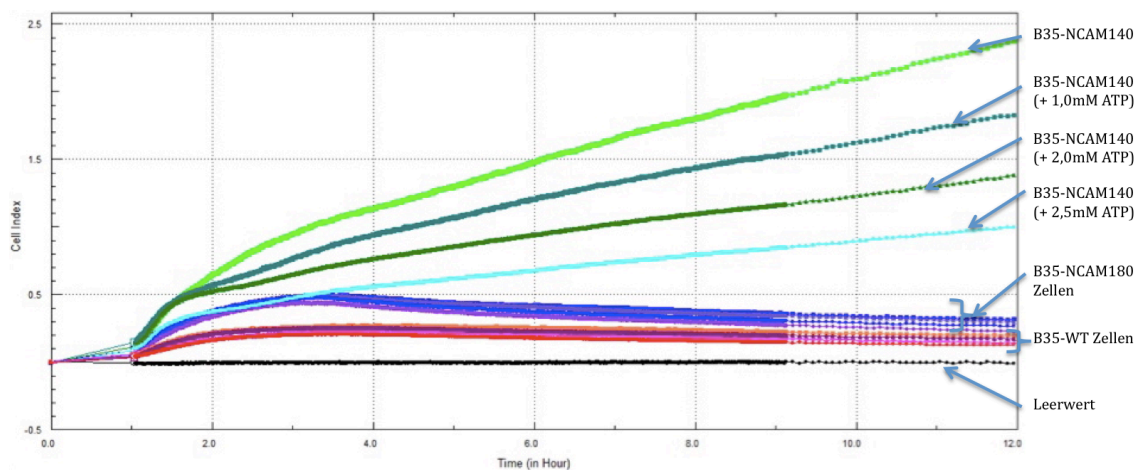


Abb. 18: Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT, B35-NCAM140 und B35-NCAM180 in normalem Medium und unter 1mM; 2mM; 2,5mM ATP

- | | |
|--|---|
| Graph 1 (Schwarz) Leerwert | Graph 10 (Dunkelblau) B35-NCAM180 |
| Graph 2 (Rot) B35-WT | Graph 11 (Lila) B35-NCAM180 mit 1mM ATP |
| Graph 3 (Dunkelrot) B35-WT mit 1mM ATP | Graph 12 (Blau) B35-NCAM180 mit 2mM ATP |
| Graph 4 (Orange) B35-WT mit 2,0mM ATP | Graph 13 (Türkies) B35-NCAM 180 mit 2,5mM ATP |
| Graph 5 (Magenta) B35-WT mit 2,5mM ATP | |
| Graph 6 (Hellgrün) B35-NCAM140 | |
| Graph 7 (Mintgrün) B35-NCAM140 mit 1mM ATP | |
| Graph 8 (Dunkelgrün) B35-NCAM140 mit 2mM ATP | |
| Graph 9 (Türkies) B35-NCAM 140 mit 2,5mM ATP | |

In der Abb. 18 zeigt sich eine Entwicklung des Neuritenwachstums der B53-Wildtyp Zellen im normalen Medium und unter der Zugabe von 1mM, 2mM, 2,5mM ATP mit einem nahezu gleichen Zellindex von $CI = 0,2$. Die unterschiedlichen ATP-Konzentrationen haben auf diese Zelllinie keinen Einfluss. Die NCAM140-exprimierenden Zellen zeigten im normalen Medium ein regelrechtes Neuritenwachstum wie es aus den anderen Experimenten bekannt war. Nach 12h hatten sie einen Zellindex von ungefähr $CI = 2,4$. Unter 1mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI = 1,8$ gemessen werden. Unter 2mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf $CI = 1,4$ gemessen werden.

Unter 2,5mM ATP konnte eine Hemmung des Zellindexes auf CI= 1,0 gemessen werden. Die NCAM180-exprimierenden Zellen zeigten im normalem Medium ein regelrechtes Neuritenwachstum mit einem Zellindex von CI= 0,4. Unter den verschiedenen ATP-Konzentrationen konnte auch hier eine abgestufte Hemmung des Neuritenwachstums mit steigendem ATP-Gehalt gezeigt werden. Zum Abschluss dieses letzten Versuchskomplexes wurden wiederum digitale Fotoserien der Zellen und des Neuritenwachstums angefertigt. Die Abb. 19 zeigt alle drei Zelllinien nach 12h in normalem Medium und unter einer 1mM, 2mM und 2,5mM ATP-Konzentration.

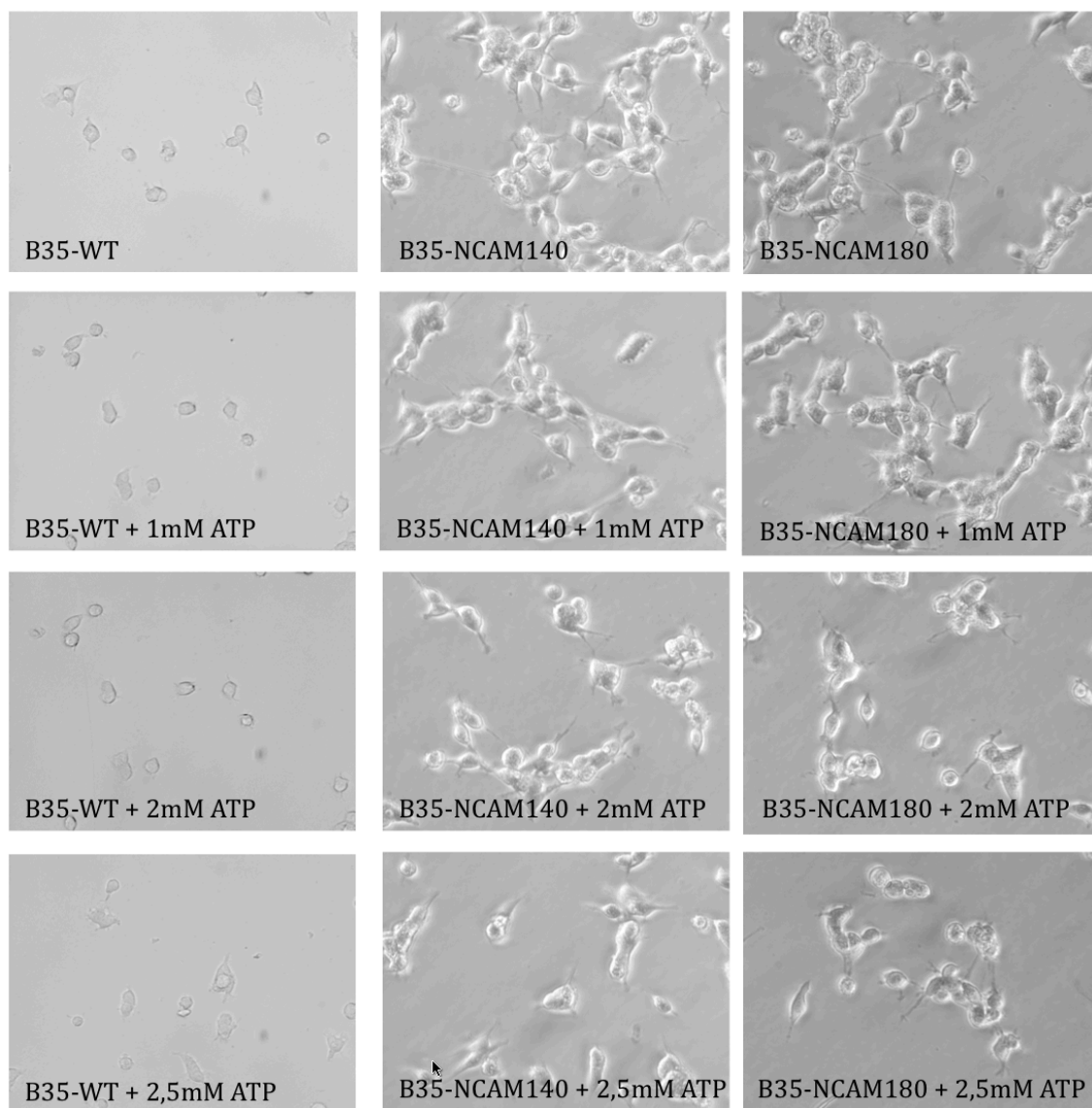


Abb. 19: Fotografische Darstellung des Neuritenwachstums von B35-WT-, B35-NCAM140- und B35-NCAM180-Zellen nach 12h unter 1mM; 2mM; 2,5mM ATP

5 Diskussion

Das neurale Zelladhäsionsmolekül NCAM ist an einer Vielzahl von molekularen Interaktionen und der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden involviert. Obwohl über die Struktur und Funktion des Glykoproteins viele Informationen vorliegen, weiß man über die Funktion der extrazellulären, ATP-hydrolysierenden Domäne sehr wenig. Auf dieser Grundlage stellte sich die Frage nach dem Einfluss der ATP-NCAM-Interaktion, auf das NCAM-induzierte Neuritenwachstum. Es wurden im Labor zunächst stabile NCAM140- und NCAM180-exprimierende B35-Neuroblastomzellen generiert. Die Kontrolle erfolgte durch einen Western Blot aller drei Zelllinien.

5.1 NCAM140 induziert mehr Neuritenwachstum als NCAM180

Der erste Versuchskomplex, dessen Ergebnisse in der Abb. 10 dargestellt sind, widmete sich der Analyse und Gegenüberstellung des Neuritenwachstums der B35-Zellen vom Wildtyp und der B35-Zellen mit integriertem NCAM140 und NCAM180 in normalem Nährmedium ohne beeinflussende Zusätze. In den ersten 60-120 Minuten ist die Adhäsionsphase der Zellen, wie sie in den RTCA-Experimenten erfolgt, durch den initialen Anstieg des Zellindex gekennzeichnet. Die Erklärung für die Zellindexerhöhung liegt in der Adhäsion der Zellen, deren Zellmembran wie ein Dielektrikum auf die Goldplatinen wirkt und somit den Wechselstromwiderstand erhöht. Da sich die Impedanz im RTCA-System erhöht, kommt es außer im Leermedium ohne Zellen auch zum Anstieg des Graphen. Die im weiteren Verlauf registrierte Impedanzerhöhung geschieht durch das Auswachsen von Neuriten, welches sich vor allem in den ersten zehn Stunden nach der Zelladhäsion vollzieht (Greene and Tischler, 1976). Dabei haben die Wildtyp-Zellen ein sehr niedriges NCAM-unabhängiges Baseline-Neuritenwachstum. Eine Erklärung für dieses Baseline-Neuritenwachstum der B35-WT-Zellen ist die Tatsache, dass neben einer eventuell minimalen und kaum detektierbaren NCAM-Expression auch andere Proteine wie L1, and N-Cadherin das Neuritenwachstum stimulieren (Kiryushko et al., 2004). Nach zwölf Stunden liegt der Zellindex für die B35-NCAM140-Zellen bei $CI=2,2$. Dies entspricht dem elffachen der Wildtypzellen und dem circa siebenfachen der B35-NCAM180-Zellen. Damit ist eindeutig, dass die NCAM140-Isoform das stärkste Neuritenwachstum induziert. In einer 1985 veröffentlichten Studie fand man NCAM140 an den Wachstumskegeln von Nervenzellen. Es wurde neben NCAM180, welches eher Zelladhäsion erzeugte, vor allem für die Neuritogenese verantwortlich gemacht (Pollerberg et al., 1985). Auch die

Arbeitsgruppe um R. Horstkorte konnte 2004 diese Ergebnisse bestätigen (Büttner et al., 2004). Die Fotos der Abb. 11 verdeutlichen diese Zusammenhänge. Es zeigt sich ein minimales Baseline-Neuritenwachstum der B35-WT-Zellen, neben vermehrtem Neuritenwachstum der transfizierten Zellen. Die B35-NCAM140-Zellen zeigen nach 12h die meisten und längsten Neuriten. Dieser Abschnitt der Arbeit verifiziert durch die Echtzeit-Analysen der RTCA, dass NCAM140 stärker als die NCAM180-Isoform das Neuritenwachstum induziert.

5.2 ATP hat einen hemmenden Einfluss auf das Neuritenwachstum

Der Zweite Versuchskomplex widmete sich der ATP-NCAM-Interaktion. Die ATP-Konzentrationen im ZNS können insgesamt sehr variabel sein und schwanken vom micromolaren bis millimolaren Bereich in den präsynaptischen Vesikeln (Burnstock, 2006). Einige Studien zeigen allerdings, dass die Konzentration durchschnittlich im unteren mM-Bereich liegt (Dubyak and el-Moatassim, 1993). Da keine genauen Angaben zu extrazellulären ATP-Mengen im Nervensystem existieren, orientierten wir uns an vorangegangenen Studien mit ATP unter Verwendung einer 2,5mM Konzentrationsstufe (Kiselyov et al., 2003). Die OH-Gruppen der Phosphate des ATP-Moleküls liegen in wässriger Lösung dissoziiert vor. Daher ist ATP in der Lage als Protonendonator zu wirken. Zum Ausschluss eines zusätzlich beeinflussenden Effektes durch eine pH-Wert-Veränderung nutzten wir für alle weiteren Versuche einen pH-stabilisierenden 2M Tris-Puffer (pH=6,8). Neben dem Medium-pH-Indikator nutzen wir pH-Messstreifen zur zusätzlichen Kontrolle für die weiteren Experimente. In Abb. 12 ist der Einfluss von 2,5mM ATP als Mediumzusatz auf B35-WT- und B35-NCAM140-Zellen zu erkennen. Die B35-NCAM140-Zellen zeigen unter ATP hierbei einen starken Abfall des Neuritenwachstums von CI=2,4 (ohne ATP) auf CI=1,2 (mit ATP). Dies entspricht einer Suppression um 50%. Es gab keinen Unterschied für die B35-WT-Zellen durch ATP. Die sich anschließende Fotoserie unterstützt dieses Ergebnis in Abb. 15. In Abb. 13 ist der Einfluss von 2,5mM ATP als Mediumzusatz auf B35-WT- und B35-NCAM180-Zellen zu erkennen. Die B35-NCAM180-Zellen zeigen unter ATP einen Abfall des Neuritenwachstums von CI=0,33 (ohne ATP) auf CI=0,22 (mit ATP). Dies entspricht einer Suppression um 30%. Es gab keine Veränderung im Zellindex der B35-WT Zellen durch ATP. Die sich anschließende Fotoserie unterstützt dieses Ergebnis ebenfalls in Abb. 15. In Abb. 14 erfolgte eine Bestätigung der vorhergehenden Ergebnisse, indem alle Zellen zusammen in einer neuen, gemeinsamen Messreihe mit und ohne ATP untersucht worden. Die B35-WT-Zellen zeigen keine Unterschiede im Zellindex. Die B35-NCAM140-Zellen

zeigen wiederum eine Suppression des Neuritenwachstums gemessen am Zellindex von $CI=2,4$ auf $CI=1,3$. Dies entspricht einer Suppression um nahezu 50%. Die B35-NCAM180-Zellen zeigten eine Suppression Neuritenwachstums gemessen am Zellindex von $CI=0,3$ auf $CI=0,2$ um circa 30%. Diese Ergebnisse bestätigen die Messwerte aus Abb. 12 und 13. Dieser Versuchskomplex aus RTCA und Fotoserie zeigt, dass ATP einen hemmenden Einfluss auf das Neuritenwachstum NCAM-exprimierender Neuroblastomzellen hat. Dabei wird das Neuritenwachstum NCAM140-exprimierender Zellen stärker als NCAM180-exprimierender Zellen gehemmt. ATP zeigt in seiner Interaktion mit NCAM also auch Isoform-spezifische Unterschiede.

5.3 ATP hemmt das Neuritenwachstum konzentrationsabhängig

Es stellte sich nun die Frage nach einem ATP-konzentrationsabhängigen Effekt auf die Hemmung des Neuritenwachstums bei einer ATP-NCAM-Interaktion. In Abb. 16 ist der Einfluss von 1mM; 2mM; 2,5mM ATP und normalem Medium auf B35-WT- und B35-NCAM140-Zellen dargestellt. Dabei zeigt sich ein sukzessiver Abfall des Neuritenwachstums der NCAM140-Zellen um jeweils circa 20% bei steigenden ATP-Konzentrationen. Es gab keine Veränderung des Neuritenwachstums der B35-WT-Zellen unter ATP-Inkubation. In Abb. 17 ist der Einfluss von 1mM; 2mM; 2,5mM ATP und normalem Medium auf B35-WT- und B35-NCAM180-Zellen dargestellt. Dabei zeigt sich ein sukzessiver Abfall des Neuritenwachstums der NCAM180-Zellen um jeweils circa 10-15% bei steigenden ATP-Konzentrationen. Es gab keine Veränderung des Neuritenwachstums der B35-WT-Zellen unter ATP-Inkubation. In Abb. 18 erfolgte eine Bestätigung der vorhergehenden Ergebnisse, indem alle Zellen zusammen in einer neuen, gemeinsamen Messreihe unter dem Einfluss von 1mM; 2mM; 2,5mM ATP und normalem Medium untersucht worden. Dabei kam es zu identischen Ergebnissen, welche die der Abb. 16 und 17 bestätigen. Die Fotoserie der Abb. 19 bestätigt die ATP-Effekte. Isoform-spezifische Unterschiede bei der ATP-NCAM-Interaktion zeigten sich auch hier. Dieser Versuchskomplex aus RTCA und Fotoserie zeigt, dass ATP einen von seiner Konzentration abhängigen hemmenden Effekt auf das Neuritenwachstum NCAM-exprimierender Neuroblastomzellen hat. Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass in Abb. 13 und 17 die Skalierung der Y-Achse der Diagramme minimiert wurde. Der Grund hierfür liegt in dem deutlich geringeren Zellindex der B35-NCAM180-Zellen im Vergleich zu den B35-NCAM140-Zellen. Um die Veränderung des Zellindex im Detail zu verdeutlichen wurde diese kleinere Skalierung ausnahmsweise als vorteilhafter erachtet.

5.4 ATP-Hydrolyse führt möglicherweise zu Konformationsveränderungen

Für das NCAM-vermittelte Neuritenwachstum werden neben dem NCAM-Ras-MAP-Kinase-Weg, vor allem auch der NCAM-FGF-Rezeptor-Weg verantwortlich gemacht. Die Stimulation des Neuritenwachstums findet dabei über eine heterophile, cis-konfigurierte Bindungen von NCAM mit dem FGFR statt. Diese heterophile Interaktion zwischen der ersten und zweiten FN-Typ-III-Domäne von NCAM und der zweiten und dritten Ig-Domäne des FGFR führt zu einer intrazellulären Phosphorylierung des FGFR. Die zweite FN-Domäne des NCAM-Moleküls verfügt zusätzlich über ein 15 Aminosäuren langes FG-Loop-Peptid. Durch NMR-Spektroskopie und SPR-Analysen fand man heraus, dass sowohl die Domäne selbst, als auch der FG-Loop an den FGFR binden, um dessen Phosphorylierung zu initiieren. Diese Phosphorylierung aktiviert über die PLC die Spaltung von PIP₃ zu DAG und IP₃, wodurch intrazellulär die Kalzium-Konzentration der Nervenzelle erhöht wird. Durch die damit verbundene Aktivierung der PKC, welche als Vermittler zwischen dem NCAM-Ras-MAP-Kinase- und NCAM-FGFR-Weg gesehen wird, kommt es zur Aktivierung der CREB und somit zu einer veränderten Proteinexpression, welche maßgeblich zur Neuritenausbildung der Zelle beiträgt (Kolkova et al., 2000; Kiselyov et al., 2003). Die Inkubation von Antikörpern sowohl gegen den FGFR, als auch gegen die erste und zweite FN-Typ-III-Domäne von NCAM, hemmt diesen NCAM-induzierten Signalweg und die damit verbundene Neuritenbildung. Die Bedeutsamkeit der Bindung zwischen NCAM und dem FGFR in Bezug auf das Neuritenwachstum wird somit verständlich (Williams et al., 1994; Kasper et al., 1996).

Kiselyov et al. untersuchten in einer 2003 publizierten Studie die Interaktion zwischen NCAM und dem FGFR. Sie determinierten dabei die Struktur der zweiten FN-Typ-III-Domäne anhand von NMR-Spektroskopie und demonstrierten durch SPR-Analysen die Bindung zwischen den Domänen der beiden Moleküle. Dabei betonten sie, dass das FG-Loop-Peptid essentiell für die Bindung und Phosphorylierung des FGFR ist. Zum Abschluss ihrer Untersuchungen widmeten sie sich der ATP-Hydrolyse durch NCAM und deren Einfluss auf die NCAM-FGFR-Bindung. Durch SPR-Analysen wurde gezeigt, dass die Bindung der zweiten und dritten FN-Domäne von NCAM mit der zweiten und dritten Ig-Domäne des FGFR unter 1mM ATP zu 60%; unter 1,5mM zu 70%; unter 2mM ATP zu 85% und unter 10mM zu 100% gehemmt werden kann (Kiselyov et al., 2003).

Die Ergebnisse des zweiten und dritten Versuchskomplexes dieser Arbeit zeigen ebenfalls eine Inhibition dieser Signalwege und des Neuritenwachstums durch ATP. Die ATP-Hydrolyse durch NCAM ist mit circa 1000 ATP-Molekülen pro Minute relativ niedrig

(Dzhandzhugazyan and Bock, 1997). Langsame Hydrolyse-Geschwindigkeiten wie diese wurden bisher vor allem in Proteinen wie GTPasen beobachtet, bei denen die Hydrolyse zu zyklischen Konformationsänderungen führte, um Signale weiter leiten zu können (Coleman et al., 1994; Dzhandzhugazyan and Bock, 1997). Weiterhin existiert in der Nähe des ATP-hydrolysierenden Abschnitts ein Bereich, welcher in der Lage ist bei katalytischen Prozessen wie der Hydrolyse von ATP, Konformationsveränderungen des Moleküls zu regulieren (Smith and Rayment, 1996). Daher liegt die Vermutung nahe, dass es bei der Hydrolyse von ATP durch NCAM zu Konformationsveränderungen im Bereich der zweiten FN Typ-III Domäne kommt. Dies könnte die Bindungseigenschaften zwischen dieser Domäne und dem FG-Loop-Peptid mit dem FGFR beeinflussen, wobei die Phosphorylierung des FGFR ausbleibt. Durch die damit verbundene Unterbrechung der Signaltransduktion könnte ATP das Neuritenwachstum hemmen. Je höher die ATP-Konzentration ist, desto höher ist die Sättigung eines hydrolysierenden Abschnitts in Bezug auf seine Enzymkinetik und umso mehr NCAM-Moleküle können mit ATP interagieren. Damit nimmt die Stärke der Signalhemmung in den B35-Zellen zu, was den abgestuften Effekt der unterschiedlichen ATP-Konzentrationen erklären würde.

Extrazelluläres ATP interagiert vermutlich zusätzlich mit weiteren Zelloberflächenproteinen. Durch GPI-verankerte Ectonucleotidasen der Zellmembran kann ATP zu ADP, AMP oder Adenosin werden, welche an Purin-Rezeptoren binden (Zimmermann, 2001). Adenosin wirkt am A₁- und A₂-Subtyp der P₁-Rezeptoren in humanen Neuroblastomzellen und führt vermutlich vor allem in den Anfängen der neuralen Entwicklung zur Induktion des Neuritenwachstums (Canals et al., 2005). Weiterhin können auch P_{2X}- und P_{2Y}-Rezeptoren durch ATP und dessen verwandte Nukleotide aktiviert werden. In Nerven- und Gliazellen induziert ATP kurze Signale durch ionotrope P_{2X}-Rezeptoren und länger andauernde Signale durch G-Protein-gekoppelte P_{2Y}-Rezeptoren. Extrazellulär hat es eher einen stimulierenden Einfluss auf das Neuritenwachstum und einen trophischen Effekt auf die Entwicklung und das Wachstum, die Regeneration und Proliferation verschiedener Zelltypen des ZNS. Auch die synaptische Plastizität vermag ATP sowohl prä- als auch postsynaptisch zu modifizieren. Dennoch sind die zellulären Antworten auf die Aktivierung von Purin-Rezeptoren insgesamt von der Konzentration und Lokalisation der Rezeptoren abhängig (Höpker et al., 1996; Heine et al., 2006). Extrazelluläres ATP ist außerdem ein Substrat für Ectoproteinkinasen, die in der Lage sind, Langzeit-Potenzierung in der synaptischen Plastizität hervorzurufen (Chen et al., 1996). Anhand von extrazellulären Proteinkinase-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Blockierung extrazellulärer Proteinkinasen zu einer Blockierung des Neuritenwachstums von PC12-Zellen und zu einer Hemmung der Synapsen-Bildung von kortikalen Neuronen

des Großhirns führt (Nagashima et al., 1991; Kuroda et al., 1992). Auch NCAM ist ein Ziel von Ectoproteinkinasen. Die Funktion der daraus resultierenden Phosphorylierung ist allerdings noch nach wie vor unklar (Ehrlich et al., 1986). Die Ergebnisse dieser Arbeit schließen eine Involvierung und den damit verbundenen Einfluss von Purin-Rezeptoren und Ectoproteinkinasen nicht aus. Da sich die verwendeten B35-Zellen aber vermutlich weder in der Expression ihrer Purin-Rezeptoren noch in der Expression ihrer Ectoproteinkinasen unterscheiden, gibt es keine Evidenz für deren direkte Einflussnahme auf die Veränderung des Neuritenwachstums und damit auf die Ergebnisse dieser Arbeit.

In allen Stadien der neuralen Entwicklung, wie auch im adulten Gehirn bei der Regeneration und der Entstehung von Lern- und Gedächtnisprozessen ist die Balance aus synaptischer Plastizität und Stabilität der Nervenzellen eine grundlegende Voraussetzung. Diese Prozesse, welche durch Neuritenbildung, der Induktion neuer und Elimination vorhandener Synapsen gekennzeichnet sind, werden unter anderem durch Membranproteine wie dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM gesteuert und gewährleistet (Edelman, 1985). Da die Verbindungen zwischen Nervenzellen nicht kontinuierlich stabil sind, könnte ATP hypothetisch bei der Formung synaptischer Kontakte als Stoppsignal für das Neuritenwachstum aus der postsynaptischen Membran ausgeschüttet werden, sobald auswachsende Neuriten die Membran erreichen. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt sich, dass die Isoform NCAM140 vor allem für die Neuritenbildung verantwortlich ist und ATP konzentrationsabhängig und Isoform-spezifisch als Inhibitor und Modulator des NCAM-vermittelten Neuritenwachstums vorzuschlagen wäre.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Adenosintriphosphat auf das Neuritenwachstum NCAM-exprimierender Neuroblastomzellen untersucht. Das zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie gehörende, vorwiegend membrangebundene, Glykoprotein NCAM wird neben Immun- und Skelettmuskelzellen vor allem auf Nervenzellen exprimiert. NCAM spielt während der neuronalen Entwicklung für die Migration von Neuroblasten und dem gerichteten Auswachsen von Neuriten eine entscheidende Rolle. Nach der Differenzierung ist es für den Erhalt der synaptischen Plastizität und für die Regenerationsfähigkeit von Nervengewebe verantwortlich. Die extrazelluläre Domäne des NCAM-Moleküls besteht neben fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen aus zwei Fibronectin Typ-III Domänen. Die zweite, Fibronectin Typ-III Domäne ist in der Lage eine cis-konfigurierte Bindung mit dem FGF-Rezeptor einzugehen. Dabei kommt es über dessen Aktivierung zu einer vorwiegend Ca^{2+} -vermittelten Stimulation des Transkriptionsfaktors CREB. Dieser ist für die Induktion des Neuritenwachstums verantwortlich. Die erwähnte Fibronectin Typ-III Domäne besitzt allerdings zusätzlich eine ATP-hydrolysierende (ATPase-) Funktion für den im Nervengewebe vorkommenden Cotransmitter Adenosintriphosphat. Durch die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten der zweiten Fibronectin Typ-III Domäne, mit ATP und dem FGF-Rezeptor, sind Interferenzen im Bindungsverhalten und damit eine veränderte intrazelluläre Signaltransduktion für das Neuritenwachstum durchaus denkbar.

Im ersten Schritt dieser Arbeit wurden B35-Neuroblastomzellen transfiziert und die darauf hin stabile NCAM140- und NCAM180-Proteinexpression der Zellen über einen Western Blot überprüft. Es standen danach drei Zelllinien B35-WT (ohne NCAM), B35-NCAM140 und B35-NCAM180 zur Verfügung. Für die sich anschließenden Experimente wurde die Real-time Zell-Analyse, ein Verfahren in dem sich das Neuritenwachstum in Echtzeit an lebenden Zellen quantifizieren lässt, genutzt (Pollsheit et al., 2012). Alle drei Zelllinien, mit ATP inkubiert bzw. ohne ATP als Kontrollen, wurden beobachtet und der Einfluss auf die Neuritogenese sowohl gemessen als auch fotografisch dokumentiert. Anhand der experimentellen RTCA-Daten dieser Arbeit konnte bewiesen werden, dass maßgeblich die 140kDa große Isoform NCAM140 Neuritenwachstum induziert. Der hemmende Einfluss von Adenosintriphosphat auf das NCAM-induzierte Neuritenwachstum ist die zentrale Erkenntnis der RTCA-Experimente. ATP hat nicht nur einen Isoform-spezifisch sondern vor allem auch konzentrationsabhängig hemmenden Einfluss auf die NCAM-vermittelte Neuritogenese. Dabei wird gegenüber NCAM180 vor allem das durch NCAM140-induzierte Neuritenwachstum inhibiert. Höhere ATP-

Konzentrationen sind in der Lage das Neuritenwachstum stärker zu hemmen als niedrige. Diese Ergebnisse stellen den Cotransmitter Adenosintriphosphat als einen wichtigen Hauptregulator des NCAM-induzierten Neuritenwachstums in einen neuen und bedeutungsvollen Fokus. Sie lassen sich sehr gut mit den Studien anderer Forschungsgruppen in Einklang bringen, in denen man eine Veränderung oder sogar eine Unterbrechung der für die Neuritogenese entscheidenden Signalwege bei einer ATP-NCAM-Bindung vermutete (Hübschmann and Skladchikova, 2010).

7 Literaturverzeichnis

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., Zimmermann, H., 2009.
Purinergic signalling in the nervous system: an overview.
Trends Neurosci. 32, 19–29.
- Albelda, S.M., Smith, C.W., Ward, P.A., 1994.
Adhesion molecules and inflammatory injury.
FASEB J. 8, 504–512.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.:
Molecular Biology of the Cell.
Garland Science Publishing, New York, 2002, pp. 215-234.
- Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K., Juliano, R.L., 1998.
Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.
Pharmacol. Rev. 50, 197–263.
- Atkins, A.R., Osborne, M.J., Lashuel, H.A., Edelman, G.M., Wright, P.E., Cunningham, B.A., Dyson, H.J., 1999.
Association between the first two immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM.
FEBS Lett. 451, 162–168.
- Baldwin, T.J., Fazeli, M.S., Doherty, P., Walsh, F.S., 1996.
Elucidation of the molecular actions of NCAM and structurally related cell adhesion molecules.
J. Cell. Biochem. 61, 502–513.
- Barbas, J.A., Chaix, J.C., Steinmetz, M., Goridis, C., 1988.
Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse.
EMBO J. 7, 625–632.
- Barthels, D., Vopper, G., Boned, A., Cremer, H., Wille, W., 1992.
High Degree of NCAM Diversity Generated by Alternative RNA Splicing in Brain and Muscle.
Eur. J. Neurosci. 4, 327–337.
- Beggs, H.E., Baragona, S.C., Hemperly, J.J., Maness, P.F., 1997.
NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn).
J. Biol. Chem. 272, 8310–8319.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L.:
Biochemistry.
W H Freeman, New York, 2002, pp. 376-380.
- Bodin, P., Burnstock, G., 2001.
Purinergic signalling: ATP release.
Neurochem. Res. 26, 959–969.

- Brackenbury, R., Thiery, J.P., Rutishauser, U., Edelman, G.M., 1977.
Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding.
J. Biol. Chem. 252, 6835–6840.
- Brümmendorf, T., Rathjen, F.G., 1995.
Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily.
Protein Profile 2, 963–1108.
- Buchthal, F., Folkow, B., 1948.
Interaction between acetylcholine and adenosine triphosphate in normal, curarised and denervated muscle.
Acta Physiol. Scand. 15, 150–160.
- Budinich, C.S., Chen, H., Lowe, D., Rosenberger, J.G., Bernstock, J.D., McCabe, J.T., 2012.
Mouse Brain PSA-NCAM Levels Are Altered by Graded-Controlled Cortical Impact Injury.
Neural Plast 2012, 1-13.
- Burnstock, G., 2004.
Cotransmission.
Curr Opin Pharmacol 4, 47–52.
- Burnstock, G., 2006.
Historical review: ATP as a neurotransmitter.
Trends in Pharmacological Sciences 27, 166–176.
- Burnstock, G., 2007.
Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission.
Physiol. Rev. 87, 659–797.
- Burnstock, G., Dumsday, B., Smythe, A., 1972.
Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide.
Br. J. Pharmacol. 44, 451–461.
- Burnstock, G., Verkhatsky, A., 2010.
Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death.
Cell Death & Disease 1, e9.
- Büttner, B., Kannicht, C., Reutter, W., Horstkorte, R., 2003.
The neural cell adhesion molecule is associated with major components of the cytoskeleton.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 310, 967–971.
- Büttner, B., Kannicht, C., Reutter, W., Horstkorte, R., 2005.
Novel cytosolic binding partners of the neural cell adhesion molecule: mapping the binding domains of PLC gamma, LANP, TOAD-64, syndapin, PP1, and PP2A.
Biochemistry 44, 6938–6947.

- Büttner, B., Reutter, W., Horstkorte, R., 2004.
Cytoplasmic domain of NCAM 180 reduces NCAM-mediated neurite outgrowth.
J. Neurosci. Res. 75, 854–860.
- Canals, M., Angulo, E., Casadó, V., Canela, E.I., Mallol, J., Viñals, F., Staines, W., Tinner, B., Hillion, J., Agnati, L., Fuxe, K., Ferré, S., Lluís, C., Franco, R., 2005.
Molecular mechanisms involved in the adenosine A and A receptor-induced neuronal differentiation in neuroblastoma cells and striatal primary cultures.
J. Neurochem. 92, 337–348.
- Chen, W., Wieraszko, A., Hogan, M.V., Yang, H.A., Kornecki, E., Ehrlich, Y.H., 1996.
Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 8688–8693.
- Cheung, K.K., Chan, W.Y., Burnstock, G., 2005.
Expression of P2X purinoceptors during rat brain development and their inhibitory role on motor axon outgrowth in neural tube explant cultures.
Neuroscience 133, 937–945.
- Chothia, C., Jones, E.Y., 1997.
The molecular structure of cell adhesion molecules.
Annu. Rev. Biochem. 66, 823–862.
- Clark, E.A., Brugge, J.S., 1995.
Integrins and signal transduction pathways: the road taken.
Science 268, 233–239.
- Clausen, T., 2007.
J.C. Skou identified Na⁺, K⁺ pump - a breakthrough and its significance.
Ugeskr. Laeg. 169, 2897.
- Cole, G.J., Akeson, R., 1989.
Identification of a heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM using synthetic peptides.
Neuron 2, 1157–1165.
- Coleman, D.E., Berghuis, A.M., Lee, E., Linder, M.E., Gilman, A.G., Sprang, S.R., 1994.
Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis.
Science 265, 1405–1412.
- Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., Edelman, G.M., 1987.
Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing.
Science 236, 799–806.
- D'Ambrosi, N., Murra, B., Cavaliere, F., Amadio, S., Bernardi, G., Burnstock, G., 2001.
Interaction between ATP and nerve growth factor signalling in the survival and neuritic outgrowth from PC12 cells.
Neuroscience 108, 527–534.

- Doherty, P., Ashton, S.V., Moore, S.E., Walsh, F.S., 1991.
Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels.
Cell 67, 21–33.
- Doherty, P., Barton, C.H., Dickson, G., Seaton, P., Rowett, L.H., Moore, S.E., Gower, H.J., Walsh, F.S., 1989.
Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms.
J. Cell Biol. 109, 789–798.
- Doherty, P., Cohen, J., Walsh, F.S., 1990.
Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid.
Neuron 5, 209–219.
- Drury, A.N., Szent-Gyorgyi, A., 1929.
The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart.
J Physiol 68, 213–237.
- Dubyak, G.R., el-Moatassim, C., 1993.
Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides.
Am. J. Physiol. 265, C577–606.
- Dzhandzhugazyan, K., Bock, E., 1997.
Demonstration of an extracellular ATP-binding site in NCAM: functional implications of nucleotide binding.
Biochemistry 36, 15381–15395.
- Eckhardt, M., Mühlenhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M., Gerardy-Schahn, R., 1995.
Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1.
Nature 373, 715–718.
- Edelman, G.M., 1985.
Cell adhesion and the molecular processes of morphogenesis.
Annu. Rev. Biochem. 54, 135–169.
- Edelman, G.M., Crossin, K.L., 1991.
Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology.
Annu. Rev. Biochem. 60, 155–190.
- Ehrlich, Y.H., Davis, T.B., Bock, E., Kornecki, E., Lenox, R.H., 1986.
Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells.
Nature 320, 67–70.
- Erbe, D.V., Watson, S.R., Presta, L.G., Wolitzky, B.A., Foxall, C., Brandley, B.K., 1993.
P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion.
J. Cell Biol. 120, 1227–1235.
- Fields, R.D., Burnstock, G., 2006.
Purinergic signalling in neuron-glia interactions.
Nat. Rev. Neurosci. 7, 423–436.

- Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., Brandley, B.K., 1992.
The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide.
 J. Cell Biol. 117, 895–902.
- Ghildyal, P., Manchanda, R., 2002.
Neurotransmission by ATP: new insights, novel mechanisms.
 Indian J. Biochem. Biophys. 39, 137–147.
- Giaever, I., Keese, C.R., 1993.
A morphological biosensor for mammalian cells.
 Nature 366, 591–592.
- Giancotti, F.G., 2000.
Complexity and specificity of integrin signalling.
 Nat. Cell Biol. 2, E13–14.
- Goridis, C., Brunet, J.F., 1992.
NCAM: structural diversity, function and regulation of expression.
 Semin. Cell Biol. 3, 189–197.
- Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976.
Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.
 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 2424–2428.
- Gumbiner, B.M., 2005.
Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis.
 Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 622–634.
- Heine, C., Heimrich, B., Vogt, J., Wegner, A., Illes, P., Franke, H., 2006.
P2 receptor-stimulation influences axonal outgrowth in the developing hippocampus in vitro.
 Neuroscience 138, 303–311.
- Hinsby, A.M., Berezin, V., Bock, E., 2004.
Molecular mechanisms of NCAM function.
 Front. Biosci. 9, 2227–2244.
- Höpker, V.H., Saffrey, M.J., Burnstock, G., 1996.
Neurite outgrowth of striatal neurons in vitro: involvement of purines in the growth-promoting effect of myenteric plexus explants.
 Int. J. Dev. Neurosci. 14, 439–451.
- Horn, F., Lindenmeier, G., Moc, I., Grillhösl, C., Berghold, S.:
Biochemie des Menschen.
 Thieme, Stuttgart, 2002, S. 228-231.
- Horstkorte, P.R., Büttner, D.B., Bork, D.K.:
NCAM1. In: Choi, S.: **Encyclopedia of Signaling Molecules.**
 Springer, New York, 2012, pp. 1183–1187.

- Horstkorte, R., 1993.
Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von Kohlenhydratbindenden Eigenschaften der neuronalen Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM.
Diss., ETH Zürich.
- Horstkorte, R., Schachner, M., Magyar, J.P., Vorherr, T., Schmitz, B., 1993.
The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth.
J. Cell Biol. 121, 1409–1421.
- Hübschmann, M.V., Skladchikova, G., 2010.
The role of ATP in the regulation of NCAM function.
Adv. Exp. Med. Biol. 663, 81–91.
- Hynes, R.O., Lander, A.D., 1992.
Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons.
Cell 68, 303–322.
- Jahr, C.E., Jessell, T.M., 1983.
ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones.
Nature 304, 730–733.
- Kanato, Y., Kitajima, K., Sato, C., 2008.
Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization.
Glycobiology 18, 1044–1053.
- Kasper, C., Stahlhut, M., Berezin, V., Maar, T.E., Edvardsen, K., Kiselyov, V.V., Soroka, V., Bock, E., 1996.
Functional characterization of NCAM fibronectin type III domains: demonstration of modulatory effects of the proline-rich sequence encoded by alternatively spliced exons a and AAG.
J. Neurosci. Res. 46, 173–186.
- Keilhauer, G., Faissner, A., Schachner, M., 1985.
Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies.
Nature 316, 728–730.
- Kiryushko, D., Berezin, V., Bock, E., 2004.
Regulators of Neurite Outgrowth: Role of Cell Adhesion Molecules.
Annals of the New York Academy of Sciences 1014, 140–154.
- Kiryushko, D., Korshunova, I., Berezin, V., Bock, E., 2006.
Neural Cell Adhesion Molecule Induces Intracellular Signaling via Multiple Mechanisms of Ca²⁺ Homeostasis.
Mol Biol Cell 17, 2278–2286.
- Kiselyov, V.V., Berezin, V., Maar, T.E., Soroka, V., Edvardsen, K., Schousboe, A., 1997.
The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding.
J. Biol. Chem. 272, 10125–10134.

- Kiselyov, V.V., Skladchikova, G., Hinsby, A.M., Jensen, P.H., Kulahin, N., Soroka, V., Pedersen, N., Tsetlin, V., Poulsen, F.M., Berezin, V., Bock, E., 2003.
Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP.
Structure 11, 691–701.
- Kleene, R., Schachner, M., 2004.
Glycans and neural cell interactions.
Nat. Rev. Neurosci. 5, 195–208.
- Kolkova, K., Novitskaya, V., Pedersen, N., Berezin, V., Bock, E., 2000.
Neural cell adhesion molecule-stimulated neurite outgrowth depends on activation of protein kinase C and the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway.
J. Neurosci. 20, 2238–2246.
- Krog, L., Olsen, M., Dalseg, A.M., Roth, J., Bock, E., 1992.
Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma.
J. Neurochem. 59, 838–847.
- Krushel, L.A., Tai, M.H., Cunningham, B.A., Edelman, G.M., Crossin, K.L., 1998.
Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signaling pathways involved in the inhibition of astrocyte proliferation.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 2592–2596.
- Kuroda, Y., Ichikawa, M., Muramoto, K., Kobayashi, K., Matsuda, Y., Ogura, A., 1992.
Block of synapse formation between cerebral cortical neurons by a protein kinase inhibitor.
Neurosci. Lett. 135, 255–258.
- Laemmli, U.K., 1970.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680–685.
- Lasky, L.A., 1995.
Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response.
Annu. Rev. Biochem. 64, 113–139.
- Lipmann, F.A., 1949.
Mechanism of peptide bond formation.
Federation proceed. 8, 597-602.
- Little, E.B., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1998.
Palmitoylation of the cytoplasmic domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM serves as an anchor to cellular membranes.
Cell Adhes. Commun. 6, 415–430.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A.:
Molecular Cell Biology.
Macmillan Higher Education, London, 2004, pp. 199-200.

- Lüllmann-Rauch, R.:
Histologie.
Thieme, Stuttgart-New York, 2009, S. 31-39.
- Main, A.L., Harvey, T.S., Baron, M., Boyd, J., Campbell, I.D., 1992.
The three-dimensional structure of the tenth type III module of fibronectin: an insight into RGD-mediated interactions.
Cell 71, 671–678.
- Mitchell, P., 1961.
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.
Nature 191, 144–148.
- Nagashima, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., 1991.
Inhibition of nerve growth factor-induced neurite outgrowth of PC12 cells by a protein kinase inhibitor which does not permeate the cell membrane.
FEBS Lett. 293, 119–123.
- Nakayama, J., Fukuda, M.N., Fredette, B., Ranscht, B., Fukuda, M., 1995.
Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 7031–7035.
- Nelson, R.W., Bates, P.A., Rutishauser, U., 1995.
Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule.
J. Biol. Chem. 270, 17171–17179.
- Nguyen, C., Mattei, M.G., Mattei, J.F., Santoni, M.J., Goridis, C., Jordan, B.R., 1986.
Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11.
J. Cell Biol. 102, 711–715.
- Niethammer, P., Delling, M., Sytnyk, V., Dityatev, A., Fukami, K., Schachner, M., 2002.
Cosignaling of NCAM via lipid rafts and the FGF receptor is required for neuritogenesis.
J. Cell Biol. 157, 521–532.
- Olsen, M., Krog, L., Edvardsen, K., Skovgaard, L.T., Bock, E., 1993.
Intact transmembrane isoforms of the neural cell adhesion molecule are released from the plasma membrane.
Biochem. J. 295, 833–840.
- Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1987.
Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 294–298.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O.A., Verkhratsky, A., 2009.
P2X receptors and synaptic plasticity.
Neuroscience 158, 137–148.

- Pankratov, Y.V., Lalo, U.V., Krishtal, O.A., 2002.
Role for P2X receptors in long-term potentiation.
J. Neurosci. 22, 8363–8369.
- Peck, D., Walsh, F.S., 1993.
Differential effects of over-expressed neural cell adhesion molecule isoforms on myoblast fusion.
J. Cell Biol. 123, 1587–1595.
- Persohn, E., Pollerberg, G.E., Schachner, M., 1989.
Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes.
J. Comp. Neurol. 288, 92–100.
- Pollerberg, E.G., Sadoul, R., Goridis, C., Schachner, M., 1985.
Selective expression of the 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development.
J. Cell Biol. 101, 1921–1929.
- Pollerberg, G.E., Burridge, K., Krebs, K.E., Goodman, S.R., Schachner, M., 1987.
The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions.
Cell Tissue Res. 250, 227–236.
- Pollerberg, G.E., Nolte, C., Schachner, M., 1990.
Accumulation of N-CAM 180 at Contact Sites Between Neuroblastoma Cells and Latex Beads Coated with Extracellular Matrix Molecules.
Eur. J. Neurosci. 2, 879–887.
- Pollerberg, G.E., Schachner, M., Davoust, J., 1986.
Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule.
Nature 324, 462–465.
- Pollscheit, J., Glaubitz, N., Haller, H., Horstkorte, R., Bork, K., 2012.
Phosphorylation of serine 774 of the neural cell adhesion molecule is necessary for cyclic adenosine monophosphate response element binding protein activation and neurite outgrowth.
J. Neurosci. Res. 90, 1577–1582.
- Ranheim, T.S., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1996.
Homophilic adhesion mediated by the neural cell adhesion molecule involves multiple immunoglobulin domains.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 4071–4075.
- Rassow, J., Deutzmann, R., Netzker, R., Hauser, K.:
Duale Reihe Biochemie.
Thieme, Stuttgart-New York, 2012, S. 414-415.
- Redman, R.S., Silinsky, E.M., 1994.
ATP released together with acetylcholine as the mediator of neuromuscular depression at frog motor nerve endings.
J. Physiol. 477, 117–127.

- Reichardt, L.F., Tomaselli, K.J., 1991.
Extracellular matrix molecules and their receptors: functions in neural development.
Annu. Rev. Neurosci. 14, 531–570.
- Reiche, K., 2004.
Über den Entdecker des Adenosintri-phosphats - Karl Lohmann (1898 - 1978) Biochemiker, Hochschullehrer und Förderer der experimentellen Medizin.
Diss., Humboldt-Univ. Berlin.
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R., 1979.
Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 3116–3120.
- Roche Diagnostics:
RTCA SP Instrument Operator's Manual.
Roche Applied Science, Mannheim, 2008, S. 1-54.
- Ruoslahti, E., Obrink, B., 1996.
Common principles in cell adhesion.
Exp. Cell Res. 227, 1–11.
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A.K., Mann, D.M., Sunshine, J., 1988.
The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions.
Science 240, 53–57.
- Ryu, J.K., Choi, H.B., Hatori, K., Heisel, R.L., Pelech, S.L., McLarnon, J.G., Kim, S.U., 2003.
Adenosine triphosphate induces proliferation of human neural stem cells: Role of calcium and p70 ribosomal protein S6 kinase.
J. Neurosci. Res. 72, 352–362.
- Saffell, J.L., Doherty, P., Tiveron, M.C., Morris, R.J., Walsh, F.S., 1995.
NCAM requires a cytoplasmic domain to function as a neurite outgrowth-promoting neuronal receptor.
Mol. Cell. Neurosci. 6, 521–531.
- Saffell, J.L., Walsh, F.S., Doherty, P., 1994.
Expression of NCAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to NCAM in a cellular substratum.
J. Cell Biol. 125, 427–436.
- Santoni, M.J., Barthels, D., Barbas, J.A., Hirsch, M.R., Steinmetz, M., Goridis, C., 1987.
Analysis of cDNA clones that code for the transmembrane forms of the mouse neural cell adhesion molecule (NCAM) and are generated by alternative RNA splicing.
Nucleic Acids Res. 15, 8621–8641.
- Scheidegger, E.P., Sternberg, L.R., Roth, J., Lowe, J.B., 1995.
A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells.
J. Biol. Chem. 270, 22685–22688.

- Schmidt, C., Künemund, V., Wintergerst, E.S., Schmitz, B., Schachner, M., 1996.
CD9 of mouse brain is implicated in neurite outgrowth and cell migration in vitro and is associated with the alpha 6/beta 1 integrin and the neural adhesion molecule L1.
J. Neurosci. Res. 43, 12–31.
- Schmidt, R.F., Lang, F., Heckmann, M.:
Physiologie des Menschen.
Springer, Berlin, 2010, S. 117-143.
- Schuch, U., Lohse, M.J., Schachner, M., 1989.
Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems.
Neuron 3, 13–20.
- Skladchikova, G., Rønn, L.C.B., Berezin, V., Bock, E., 1999.
Extracellular adenosine triphosphate affects neural cell adhesion molecule (NCAM)-mediated cell adhesion and neurite outgrowth.
J. Neurosci. Res. 57, 207–218.
- Skou, J.C., 1957.
The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves.
Biochim. Biophys. Acta 23, 394–401.
- Small, S.J., Akeson, R., 1990.
Expression of the unique NCAM VASE exon is independently regulated in distinct tissues during development.
J. Cell Biol. 111, 2089–2096.
- Smith, C.A., Rayment, I., 1996.
Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins.
Biophys. J. 70, 1590–1602.
- Sorkin, B.C., Hoffman, S., Edelman, G.M., Cunningham, B.A., 1984.
Sulfation and phosphorylation of the neural cell adhesion molecule, N-CAM.
Science 225, 1476–1478.
- Takeichi, M., 1995.
Morphogenetic roles of classic cadherins.
Curr. Opin. Cell Biol. 7, 619–627.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., Engel, P., 1995.
The selectins: vascular adhesion molecules.
FASEB J. 9, 866–873.
- Thomaidou, D., Coquillat, D., Meintanis, S., Noda, M., Rougon, G., Matsas, R., 2001.
Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases zeta/beta as the putative F3 receptors on Schwann cells.
J. Neurochem. 78, 767–778.

- Vaughn, D.E., Bjorkman, P.J., 1996.
The (Greek) key to structures of neural adhesion molecules.
Neuron 16, 261–273.
- Verkhratsky, A., Verkhrastry, A., Krishtal, O.A., Burnstock, G., 2009.
Purinoceptors on neuroglia.
Mol. Neurobiol. 39, 190–208.
- Vutskits, L., Djebbara-Hannas, Z., Zhang, H., Paccaud, J.P., Durbec, P., Rougon, G., Muller, D., Kiss, J.Z., 2001.
PSA-NCAM modulates BDNF-dependent survival and differentiation of cortical neurons.
Eur. J. Neurosci. 13, 1391–1402.
- Williams, A.F., Barclay, A.N., 1988.
The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition.
Annu. Rev. Immunol. 6, 381–405.
- Williams, E.J., Furness, J., Walsh, F.S., Doherty, P., 1994.
Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin.
Neuron 13, 583–594.
- Xiao, C., Lachance, B., Sunahara, G., Luong, J.H.T., 2002.
An In-Depth Analysis of Electric Cell–Substrate Impedance Sensing To Study the Attachment and Spreading of Mammalian Cells.
Anal. Chem. 74, 1333–1339.
- Yoshida, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Hamamoto, T., Tsuji, S., 1995.
Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain.
J. Biol. Chem. 270, 14628–14633.
- Zimmermann, H., 2001.
Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature.
Dr. Dev. Res. 52, 44–56.

8 Thesen

1. NCAM140 induziert mehr Neuritenwachstum als NCAM180.
2. ATP bindet an die zweite Fibronectin Typ-III Domäne von NCAM.
3. ATP hemmt das NCAM-induzierte Neuritenwachstum.
4. ATP hemmt das NCAM-induzierte Neuritenwachstum konzentrationsabhängig.
5. ATP hat einen Isoform-spezifisch hemmenden Effekt.

Curriculum Vitae

Matthias Hoffmann

Schierker Weg 09
D-06120 Halle/ Saale
T: 0151/ 125 13 138
E: matthoffmann@gmx.net

Geburtsdatum: 30.11.1983
Geburtsort: Halle/ Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademische Ausbildung

Vorauss. 12/2014 Abschluss Studium der Humanmedizin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2014

Seit 2011 Promotion am Institut für Physiologische Chemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Seit 2008 Studium der Humanmedizin
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 2010
(Note: Sehr gut)

Berufserfahrungen

2006 – 2008 Berufswweiterbildungen: Anästhesie-Assistenz/ Notfallmedizin/
Intensivpflege
Universitätsklinikum Halle

2004 – 2006 Berufsausbildungen: Rettungssanitäter und Rettungsassistent
Landesrettungsschule Halle
(Note: Sehr gut)

2003 – 2004 Zivildienst
Universitätsklinikum Halle – Klinik für Anästhesiologie u. operative
Intensivmedizin

Schulische Ausbildung

1994 – 2003 Christian-Wolff-Gymnasium – Halle

1990 – 1994 Wolfgang-Borchert-Grundschule – Halle

Promotion:**Der Einfluss von Adenosintriphosphat auf das Neuritenwachstum
Neural cell adhesion molecule exprimierender Neuroblastomzellen**

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Physiologische Chemie
Prof. Dr. rer. nat. Rüdiger Horstkorte

Studienaufenthalte:

Praktisches Jahr:

- 2014 Schweiz: Universität Bern – Hôpital du Valais
 (Department für Innere Medizin – Dr. med. Stefan Schwery)
- 2013 England: University of Cambridge – School of Medicine
 (Department of Anesthetics & Intensive Care – Prof. David Menon, M.D.)

Famulaturen:

- 2013 United States of America: New York University – School of Medicine
 (Department of Emergency Medicine – Prof. Lewis R. Goldfrank, M.D.)
- 2012 Deutschland: Charité – Universitätsmedizin Berlin
 (Klinik für Anästhesiologie – Prof. Dr. med. C. Spies)
- 2012 Tansania: Mnazi Mmoja Hospital – MMH Zanzibar Town
 (Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie)
- 2011 Deutschland: Charité – Universitätsmedizin Berlin
 (Klinik für Neurochirurgie – Prof. Dr. med. P. Vajkoczy)

Sprachkenntnisse:

- Deutsch (Muttersprache)
- Englisch (Fließend in Wort und Schrift)
- Französisch (Grundkenntnisse)
- Italienisch (Grundkenntnisse)
- Spanisch (Grundkenntnisse)

Interessen:

- Schlagzeug spielen in mehreren Bands (seit 20 Jahren)
- Zeichnen und Malen von Landschaften und Menschen
- Sport (Marathon, Radfahren, Eislaufen, Skifahren, Wellenreiten)

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es ist mir bekannt, dass ich den Dokortitel nicht führen kann, bevor mir die Promotionsurkunde bzw. eine vorläufige Bescheinigung gemäß § 16 der Promotionsordnung ausgehändigt wurde.

Frühere Promotionsversuche:

Ich bestätige, dass ich bisher keine Promotionsversuche durchgeführt habe.

Matthias Hoffmann

Halle/Saale, den 01.06.2014

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Professor Rüdiger Horstkorte für die Bereitstellung des Themas und die tolle Zusammenarbeit während meines Aufenthaltes im Institut bedanken. Durch seine vielseitige Unterstützung und uneingeschränkte Zugänglichkeit empfand ich die Arbeit im Labor der Hollystraße als äußerst angenehm.

Herrn Doktor Kaya Bork möchte ich für die Unterstützung, die beständige Geduld, aber vor allem für die aufschlussreichen Diskussionen in Bezug auf die Orientierung, Planung, Durchführung und die Auswertung meiner Experimente danken. Sie haben mir das Verständnis für Forschung vermittelt und mich zu guter letzt an das Ziel meiner Arbeit gebracht.

Nicole Glaubitz hat mich bei der Einführung und Durchführung meiner Laborarbeiten von vornherein uneingeschränkt unterstützt. Durch ihre ausgezeichneten Fähigkeiten und ihrem großen Engagement als technische Mitarbeiterin erlernte ich schnell die Arbeiten im Labor. Ihr gilt mein besonderer Dank.

Weiterhin möchte ich der gesamten Arbeitsgemeinschaft um Professor Horstkorte, vor allem Annett Thate danken, die mich bei Nicoles Abwesenheit unterstützten. Doktor Herbert Neuhaus danke ich für die gute Stimmung und dem abwechslungsreichen Musikprogramm im Labor welche die Arbeit stets zu einem Vergnügen machten.

Meinen guten Freunden und Kommilitonen Sascha Kolokowsky, Alexander Zich und Hannes Haller danke ich für ihre Unterstützung und die vielen aufbauenden Worte. Diese Zeit bleibt unvergessen.

Ich möchte auch den Gutachtern für ihre Bemühungen meine Dankbarkeit aussprechen.

Meiner lieben Schwester Sophia die mich in medizinischen Belangen über die Jahre immer wieder forderte und deren großer Ehrgeiz mir ein Beispiel ist möchte ich ebenfalls für alles danken was sie für mich getan hat.

Uwe danke ich für die vielen schönen Gespräche an den Abenden in meinem Zimmer und seiner immer währenden Unterstützung. Ich habe ihm unglaublich viel in meinem Leben zu verdanken.

Vor allen anderen möchte ich aber einer ganz besondern Person danken, ohne die all dies niemals möglich gewesen wäre, meiner Mutter Susanne Hoffmann. Ohne ihre Fürsorge und Unterstützung in meinem Leben wäre, ein Studium der Humanmedizin und eine Promotion, nicht möglich gewesen.

Ihr möchte ich diese Arbeit von ganzen Herzen und in aufrichtiger Dankbarkeit widmen.

Matthias Hoffmann

Halle/Saale, den 01.06.2014