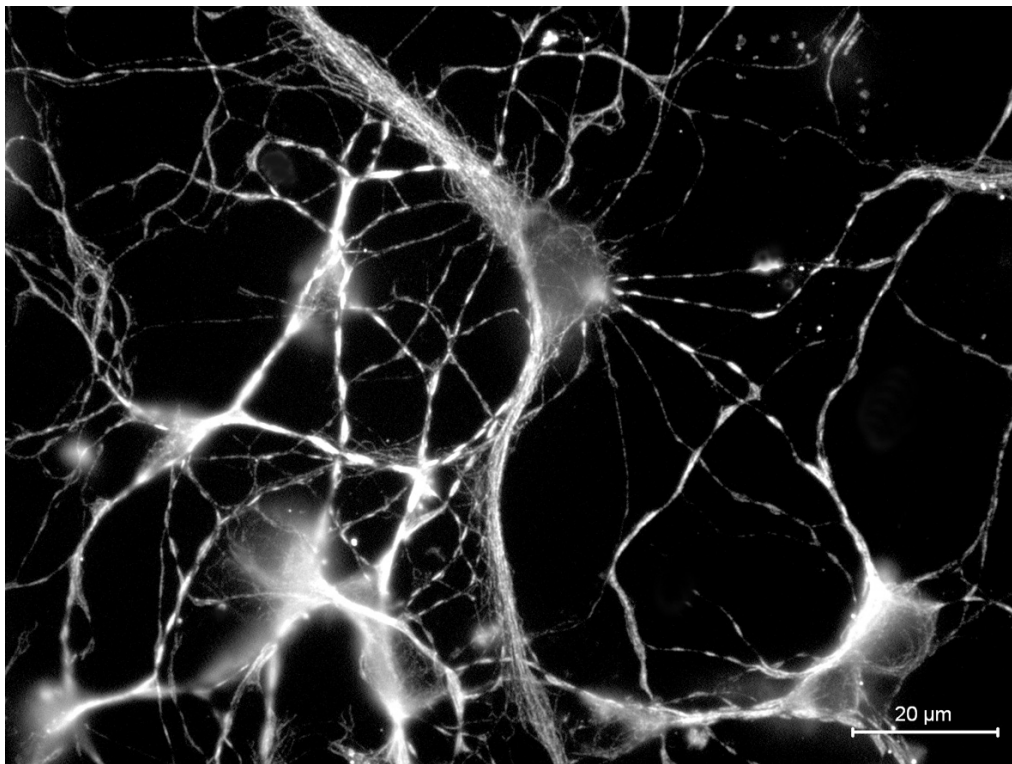


Bindung der extrazellulären Domäne von N-Cadherin an den Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor FGFR-1

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg



vorgelegt von

Bettina Laymann

geboren in Volkach

Würzburg, 2007

Eingereicht am: 29.11.2007

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Professor Dr. Müller

Gutachter: Professor Dr. Drenckhahn.

Gutachter: Professor Dr. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 06.02.2008

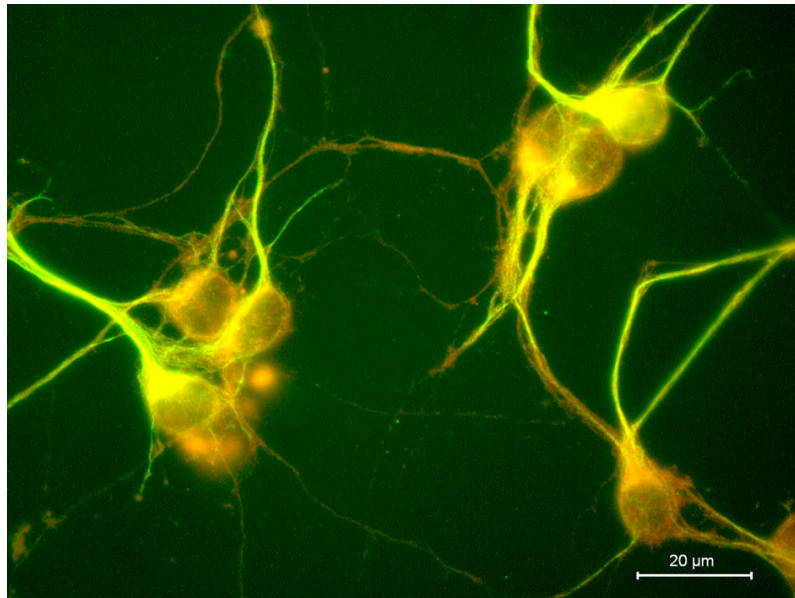
Doktorurkunde ausgehändigt am:

DANKE

Herrn Professor Dr. Georg Krohne danke ich für die Übernahme des Zweitgutachters und besonders für das Wissen jederzeit in ihm einen hilfsbereiten Ratgeber zu finden.

Herrn Professor Dr. Detlev Drenckhahn möchte ich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes danken, insbesondere für die freundliche Atmosphäre, seine Fairnis, Umsicht, Ideen, Interesse und Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Privatdozenten Dr. Stefan Hübner danke ich für die zahlreichen, wertvollen Hinweise, besonders auf dem Gebiet der Molekular- und Proteinbiochemie, die Korrektur der vorliegenden Arbeit und seine stetige und hilfreiche Gesprächsbereitschaft.



Bei den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, die eine gute Zusammenarbeit und ein angenehmes Arbeitsklima ermöglichten, möchte ich mich bedanken; insbesondere bei Erna Kleinschroth für ihre stetige Hilfsbereitschaft, bei Brigitte Treffny für nette Zusammenarbeit in der Botanik, bei Sabine Katzschmann, die stets ein gutes und freundliches Wort fand, bei Dr. Malgorzata Burek und Rita Herrmann für ihre Freundschaft und Unterstützung.

Last but not least in memoriam ein Dankeschön an Dr. Rainer Koob, der mit Wissen und Witz manche bewölkte Situation erhellte.

Frau Professor Dr. Nikola Golenhofen danke ich für die Einführung in die Molekular- und Zellbiologie.

Liebe, Verständnis, Humor und Lachen ermöglichten mir meinen beruflichen Weg, meine Persönlichkeitsbildung, meine Zukunft.

Daher ist diese Arbeit in Dankbarkeit meiner Mutter Maria-Luise Laymann gewidmet.

Herzlichen Dank an Freunde für ihr Interesse, Verständnis, ihre Unterstützung und Freundschaft.



Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung.....	1
1.1.	Zusammenfassung.....	1
1.2.	Summary.....	3
2.	Einleitung.....	5
2.1.	Das Nervensystem.....	5
2.2.	Struktur der Nervenzelle.....	6
2.3.	Signalstoffe.....	7
2.4.	Evolute Betrachtung des Verhältnisses zwischen Zelladhäsionsmolekülen und Immunglobulinen.....	8
2.5.	Aufgaben von Mitgliedern der CAM-Proteinfamilie.....	9
2.6.	Klinische Bedeutung der Bindung zwischen FGFR und N-Cadherin.....	9
2.7.	Nervenzellen.....	10
2.8.	Kleinhirn.....	10
2.8.1.	Mikroskopische Anatomie des Kleinhirns.....	11
3.	Cadherine.....	13
3.1.	Cadherine.....	13
3.2.	Klassische Cadherine.....	13
3.2.1.	Cadherinaufgaben im Embryo und adulten Organismus.....	14
3.2.2.	Aufbau der klassischen Cadherine.....	14
3.2.3.	Besonderheiten.....	15
3.3.	Bindung.....	16
3.3.1.	Synaptisches Bindungsmodell	17
3.3.2.	Modelle der homophilen Cadherinbindung.....	18
3.4.	N-Cadherin (neuronales Cadherin).....	20
4.	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor (Fibroblast-growth-factor-receptor; FGFR).....	21
4.1.	Einteilung.....	21
4.2.	Gewebespezifische Expression von FGFR 1-4	21
4.3.	FGF-Rezeptoren im Zentralen Nervensystem (ZNS).....	22
4.4.	Aufbau von FGFR-1.....	22
4.5.	Bindungsmodelle des FGF-Rezeptors.....	23

4.5.1.	Bindungsmodell zwischen dem FGF-Rezeptor und den Liganden FGF, Heparin und Heparinsulfatproteoglykane.....	23
4.5.2.	Bindung zwischen dem FGFR und Zelladhäsionsmolekülen.....	25
4.5.3.	Definition der CAM-Homologie-Domäne und des CHD-Bindungsmotives.....	26
4.5.4.	Hypothetisches Bindungsmodell über die Rolle von N-Cadherin bei der Aktivierung des FGFR	28
4.5.5.	Bindungsmodell zwischen FGFR und N-Cadherin nach Kamiguchi und Lemmon.....	30
4.6.	Signaltransduktion.....	31
4.6.1.	Signaltransduktion durch Phospholipase C γ (PLC γ)	31
4.6.2.	Signaltransduktion durch Ras/MAPK.....	32
4.6.3.	Diskussion der Signalkaskaden.....	33
4.7.	Verhinderung der Eigendimerisierung.....	34
5.	Material.....	35
5.1.	Reagenzien und Versuchsmaterialien.....	35
5.2.	Verbrauchsmaterialien.....	37
5.3.	Geräte.....	38
5.4.	Stammlösungen.....	40
5.5.	Puffer und Lösungen.....	41
5.6.	Molekulargewichtstandards für DNA und Proteine.....	44
5.7.	Gebrauchsfertige Systeme.....	45
5.8.	Enzyme und Substrate.....	45
5.9.	Medien und Platten für die Kultivierung von Bakterien.....	45
5.10.	Bakterienstämme.....	46
5.11.	Vektoren und Plasmide.....	46
5.11.1.	pDsRed-Monomer-C1-Vektor.....	46
5.11.2.	pEGFP-N3-Vektor.....	46
5.11.3.	pGEM-T®-Vektor.....	47
5.11.4.	pEV-mod-Dsg-1-EZD ^{Iν} -Fc-His.....	47
5.12.	Oligonukleotide.....	47
5.12.1.	Oligonukleotide für die DNA-Synthese.....	46
5.12.2.	Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung.....	47
5.12.3.	Auskunft und Bezeichnung verwendeter cDNAs.....	49
5.13.	Antikörper.....	49

5.13.1.	Primärantikörper.....	50
5.13.2.	Sekundärantikörper.....	50
5.13.3.	Biotinbindendes Protein.....	51
5.14.	Analyseprogramme.....	51
5.15.	Statistik.....	51
6.	Methoden.....	52
6.1.	Molekularbiologie.....	52
6.1.1.	Bakterien.....	52
6.1.1.1.	Bakterienkulturen, Plattenkulturen und Plattenkulturen von Bakterien.....	52
6.1.1.2.	Flüssigkulturen von Bakterien.....	52
6.1.1.3.	Lagerung von Bakterien.....	52
6.1.2.	Methoden zum Umgang mit DNA.....	53
6.1.2.1.	Agarosegelelektrophorese.....	53
6.1.2.2.	Plasmidminipräparation.....	54
6.1.2.3.	DNA-Gelextraktion.....	54
6.1.2.4.	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	55
6.1.2.5.	Oligonukleotide.....	55
6.1.2.6.	Polymerase-Kettenreaktion.....	55
6.1.2.6.1.	Pfu-Polymerase.....	56
6.1.2.6.2.	Expand-High-Fidelity PCR System.....	57
6.1.2.6.3.	Phusion-Polymerase und Inphusion-Polymerase.....	57
6.1.2.6.4.	Reverse Transkriptase PCR.....	58
6.1.2.7.	Restriktionsanalyse von DNA.....	59
6.1.2.8.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	60
6.1.2.9.	Rekombination.....	61
6.1.3.	Hitzeschocktransformation.....	61
6.1.4.	Blue-white screening.....	62
6.1.5.	Analyse positiver Klone durch Sequenzierung.....	62
6.2.	Zellkultur	62
6.2.1.	Sterilisierung von Glasmaterialien und Lösungen.....	62
6.2.2.	Nährmedien.....	62
6.2.3.	Standardzellkultur.....	63
6.2.4.	Cerebelläre Körnerzellkultur.....	64
6.2.5.	Poly-L-Lysin behandelte Deckgläschen.....	65

6.2.6.	Kryokonservierung von Zellen.....	66
6.2.7.	Einfrieren von Zellen.....	66
6.2.8.	Auftauen von Zellen.....	66
6.2.9.	Transiente Transfektionen von Zellen.....	66
6.2.10.	Generierung von stabilen Zellklonen.....	67
6.2.11.	Herstellung eines Zelllysates.....	67
6.3.	Biochemie.....	68
6.3.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	68
6.3.2.	Färben eines SDS-Gels mit Coomassie [®] Brilliant Blau.....	69
6.3.3.	Elektronentransfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf eine Nitrocellulosemembran (Immunoblot, Westernblot).....	69
6.3.4.	Westernblotanalyse.....	70
6.3.5.	Dot-Blot-Analyse.....	71
6.3.6.	Proteinaufreinigung.....	72
6.3.7.	Protein A-Affinitätschromatographie.....	72
6.3.8.	Gewinnung von Proteinen durch Lyse der CHO-Zellen.....	73
6.3.9.	Dialyse.....	73
6.3.10.	Bradford-Analyse.....	73
6.3.11.	Biotinylierung.....	74
6.3.12.	Beschichtung von Protein A-Mikroperlen.....	74
6.3.13.	Beschichtung von Epoxyagaroseperlen.....	75
6.3.14.	Beschichtung von CNBr-aktivierten Perlen.....	75
6.3.15.	Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA).....	76
6.4.	Mikroskopie.....	77
6.4.1.	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	77
6.4.2.	Laserpinzette.....	77
6.4.2.1.	Messungen mit der Laserpinzette.....	78
7.	Schematische Darstellung von N-Cadherin und FGFR-1 spezifischen Expressionsvektoren.....	79
7.1.	Generierung von pEGFP-N3-FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His.....	79
7.2.	Generierung von von pEGFP-N3-FGFR-1 _(mut) EZD ^{I-III} -Fc-His.....	81
7.3.	Generierung von pDsRed-FGFR-1.....	81
7.4.	Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His.....	82
7.5.	Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III} -Fc-His.....	83

7.6.	Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III+V+V} -L ^{III+IV+V} -Fc-His.....	84
7.7.	Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin.....	86
7.8.	Generierung von pEGFP-N3-Fc-His.....	86
7.9.	Sequenzangaben.....	87
8.	Ergebnisse.....	88
8.1.	Molekularbiologische Versuche.....	88
8.1.1.	Generierung von FGFR-1 und N-Cadherin expremierenden Vektoren.....	89
8.1.1.1.	Generierung FGFR-1 expremierender Vektoren.....	89
8.1.1.1.1.	Generierung von pEV-FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc -His.....	89
8.1.1.1.2.	Generierung von pEGFP-N3-FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His.....	90
8.1.1.1.3.	Generierung von von pEGFP-N3-FGFR-1 _(mut) -EZD ^{I-III} -Fc-His.....	91
8.1.1.1.4.	Generierung von pDsRed-FGFR-1.....	93
8.1.1.2.	Generierung von Vektoren zur Expression von N-Cadherin.....	93
8.1.1.2.1.	Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His und pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III} -Fc-His.....	93
8.1.1.2.2.	Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III+V+V} -L ^{III+IV+V} -Fc-His.....	95
8.1.1.2.3.	Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin.....	97
8.1.1.3.	Generierung von pEGFP-N3-Fc-His.....	98
8.2.	Charakterisierung stabiler Zellklone.....	99
8.2.1.	Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung stabiler Zelllinien.....	100
8.2.2.	Proteinbiochemische Charakterisierung der in stabilen CHO-Zellen gebildeten Fusionsproteine.....	102
8.3.	Nachweis der Coexpression von FGFR-1 und N-Cadherin in CHO-Zellen...	103
8.4.	Nachweis der Expression von FGFR-1 und N-Cadherin in cerebellären Körnerzellen.....	103
8.5.	Bindungsstudien.....	104
8.5.1.	zelluläre Bindungsstudien.....	104
8.5.1.1.	Untersuchung des Axonwachstums von cerebellären Körnerzellen.....	104
8.5.1.1.1.	Etablierung des Zellkultursystems.....	104
8.5.1.1.2.	Untersuchung des Axonwachstums von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe von verschiedenen Proteinen und Peptiden.....	107
8.5.1.1.3.	Untersuchung des Bindungsmotives mit Hilfe cerebellärer Körnerzellen.....	108
8.5.1.2.	Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von exprimierten N-Cadherin-GFP und FGFR-1-DsRed in CHO-Zellen.....	110

8.5.2.	Protein-Proteinbindungsstudien.....	111
8.5.2.1.	Pull-down Versuche.....	111
8.5.2.1.1.	Bindungsstudie mit Protein A-Perlen.....	111
8.5.2.1.2.	Bindungsstudie mit CNBr aktivierten Agaroseperlen.....	113
8.5.2.1.3.	Bindungsstudie mit CNBr aktivierten Sepharoseperlen.....	114
8.5.2.2.	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen FGFR-1 und N-Cadherin Fusionsproteinen mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse.....	115
8.5.2.2.1.	Versuchsansatz 1.....	115
8.5.2.2.2.	Versuchsansatz 2.....	116
8.5.2.2.3.	Versuchsansatz 3.....	117
8.5.2.2.4.	Überprüfung des Bindungsmotivs.....	118
8.5.3.	Bindungsstudien mit Hilfe der Laserpinzette.....	120
8.5.4.	Bindungsstudien mit Hilfe des ELISA.....	122
8.5.4.1.	Wechselwirkung zwischen FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His bzw. FGFR-1 _(mut) EZD ^{I-III} -Fc-His und Cadherinen ohne Berücksichtigung unspezifischer Fc-Fc-Wechselwirkung.....	123
8.5.4.2.	Wechselwirkung zwischen FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His und Cadherinen mit Berücksichtigung unspezifischer Fc-Fc-Wechselwirkung.....	125
9.	Diskussion.....	126
9.1.	Generierung von Vektoren zur Expression von verschiedenen Proteinen und den entsprechenden Zelllinien.....	126
9.2.	Untersuchung zum Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen.....	128
9.3.	Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von exprimierten GFP N-Cadherin und DsRed FGFR-1 Fusionsproteinen in CHO-Zellen.....	130
9.4.	Bindungsstudien.....	130
9.4.1.	Bindungsstudien durch Pull-down Experimente.....	131
9.4.1.1.	Einsatz von Protein A-Perlen.....	131
9.4.1.2.	Einsatz von Epoxyagaroseperlen und CNBr aktivierten Sepharoseperlen.....	131
9.4.2.	Bindungsstudien durch Dot-Blot Experimente.....	132
9.4.3.	Bindungsstudien mit Hilfe des ELISA.....	133
9.5.	Bindungsstudien mit Hilfe der Laserpinzette.....	134
9.6.	Vergleich zwischen den Ergebnissen der Protein-Protein-Bindungsstudien und den Untersuchungen des Axonwachstums von cerebellären Körnerzellen	135

10.	Ausblick.....	139
11.	Literaturverzeichnis.....	140
12.	Abkürzungen.....	149
13.	Lebenslauf.....	152

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung

N-Cadherin, ein Mitglied der klassischen Cadherin Familie vermittelt durch homophile Bindungen der extrazellulären Domänen (EZD) zwischen benachbarten Zellen Zell-Zell-Kontakte. Im Nervensystem kontrolliert es zahlreiche Aufgaben wie beispielsweise die Ausbildung von Synapsen, die synaptische Plastizität, das Auswachsen von Axonen und deren richtungsgezielte Orientierung.

In Untersuchungen zum Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen konnte von Doherty et al. (1995, 1996) gezeigt werden, dass die isolierte EZD^{I-V} von N-Cadherin über den FGFR-1 (Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor-1) ein richtungsvermittelt Auswachsen von Axonen verursacht. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Bindungsmodell erstellt (Doherty et al., 1996). Dieses geht davon aus, dass zwischen transdimeren N-Cadherin-Molekülen, über die Aminosäuren IDPVNGQ der EZD Wechselwirkungen mit den Aminosäuren HAV der EZD von FGFR-1 auftreten (siehe hierzu Abb. 17). Der dadurch dimerisierte FGFR-1 bewirkt innerhalb der Nervenzelle eine intrazelluläre Signaltransduktion, die in einem zielgerichteten Axonwachstum resultiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, dieses Bindungsmodell näher zu untersuchen.

Ausgehend von den für N-Cadherin und FGFR-1 kodierenden cDNAs und entsprechenden Vektorsystemen wurden in CHO-Zellen stabile Zelllinien erstellt. Das zugrundeliegende Expressionssystem führte zu einem Ausschleusen der für die Experimente notwendigen Fc-Fusionsproteine in den Kulturüberstand. Eine daran anschließende auf Protein A basierende Affinitätschromatographie des Kulturüberstandes ermöglichte die Isolierung und Anreicherung der Fc-Fusionsproteine. Desweiteren wurden Expressionsvektoren verwendet, die für subzelluläre Lokalisationsuntersuchungen verwendet wurden.

Zu Beginn der Bindungsstudien wurde Untersuchungen zum Axonwachstum cerebellärer Körnerzellen durchgeführt. Diese dienten zum einen der Überprüfung der von Doherty und Walsh (1996) durchgeführten Experimente zum Längenwachstum cerebellärer Körnerzellen in Gegenwart ausgewählter Zelladhäsionsmoleküle (NCAM, L1 und N-Cadherin), zum anderen dienten sie der Überprüfung der Funktionalität der FGFR-1- und N-Cadherin-spezifischen Peptide (HAV und IDPVNGQ). Wie zu erwarten wurde durch Zugabe von N-Cadherin EZD^{I-V} ein Axonlängenwachstum festgestellt, dass durch Zugabe der HAV- und IDPVNGQ-Peptide inhibiert wurde.

Für den Ausschluß der Wirkung von Fremdproteinen wurden in der vorliegenden Arbeit direkte Bindungsstudien durchgeführt. Hierzu wurden sowohl ELISA- als auch in Dot-Blot-Experimente durchgeführt. Diese ergaben eine Wechselwirkung der EZD von FGFR-1 und N-Cadherin. Eine von DsRed-FGFR-1 abhängige Lokalisation von GFP-N-Cadherin in CHO-Zellen deutete ebenfalls auf eine Interaktion hin. Nähere Bindungsstudien zeigten, dass die Bindungsmotive IDPVNGQ und HAV für eine Wechselwirkung der FGFR-1- und N-Cadherin-spezifischen EZDs bedeutungslos sind. Auch an der Laserpinzette durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass Wechselwirkungen zwischen N-Cadherin (auf Mikroperlen immobilisiert) und PC12-Zellen in Gegenwart der inhibierenden IDPVNGQ- und HAV-Peptide nicht verhindert werden konnten. Zusammenfassend ist es gelungen zum ersten Mal eine direkte Wechselwirkung zwischen N-Cadherin und FGFR-1 nachzuweisen. Allerdings konnte in Konkurrenzexperimenten eine Bedeutung der postulierten Bindungsmotive nicht bestätigt werden.

1.2. Summary

N-cadherin, a member of the classic cadherin family, mediates intercellular contacts between neighbouring cells through homophile bonds. In the nervous system, it is involved in numerous functions, such as the formation of synapses, synaptic plasticity, the development of axons and their spatio-controlled orientation.

In studies regarding axonal growth of cerebellar granule cells, Doherty et al., (1995, 1996) were able to demonstrate that the isolated extracellular domain I-V (ECD^{I-V}) of N-cadherin together with FGFR-1 (Fibroblast Growth Factor Receptor-1) induces directional development of axons. Based on these observations, a bonding model was derived (Doherty et al., 1996), assuming that ECD-directed interactions with the HAV amino acids of the FGFR-1-ECD occur via the IDPVNGQ amino acids from the ECD of N-cadherin (see Fig. 17). Consequently, dimerized FGFR-1 induce intracellular signalling within the nerve cells, resulting in continuous axonal growth. The aim of this thesis was to examine the bonding model in more detail.

In order to conduct studies of interactions between N-cadherin and FGFR-1 respective expression vectors were constructed and used to generate stable cell lines for protein production. Subsequent to expression and secretion of the fusion proteins into the supernatant, purification was performed by protein A-specific affinity chromatography. In addition expression vectors were generated suitable for investigating subcellular localization of N-cadherin-GFP in the presence /absence of FGFR-1-dsRed.

Initial binding studies were conducted on cerebellar granule cells, firstly to confirm CAM-dependency of axonal growth as shown by Doherty and Walsh (1996) and secondly functionality of the inhibitory FGFR-1- and N-cadherin-specific peptides (HAV and IDPVNGQ) on N-cadherin binding activity. As expected, addition of N-cadherin ECD^{I-V} to cerebellar granule cells resulted into axonal growth, whereas the presence of the inhibitory HAV- and IDPVNGQ-peptides reduced binding of N-cadherin ECD^{I-V} to cerebellar granule cells significantly.

To exclude unspecificity of protein interactions in such complex binding studies, protein-protein interactions were performed by either ELISA- and Dot-Blot-Assays. In both assays interaction between the ECD of N-cadherin and FGFR-1 was detected. FGFR-1-dsRed-dependent localization of N-cadherin-EGFP in CHO-cells additionally indicated interaction between both proteins. Detailed binding studies revealed no effect of the inhibitory binding peptides HAV und IDPVNGQ on the ECD-interaction of N-cadherin and FGFR-1. Supporting these results was the observation, that in laser tweezer experiments binding of N-

cadherin ECD¹⁻⁵ (immobilized onto microbeads) to cultured PC-12 cells could not be prevented by the inhibitory binding peptides HAV und IDPVNGQ.

In conclusion, this thesis demonstrates for the first time binding of the ECD of N-cadherin to that of FGFR-1. However, the significance of the binding motives HAV und IDPVNGQ for N-cadherin/FGFR- interaction could not be confirmed in competition experiments and remains questionable.

2. Einleitung

2.1. Das Nervensystem

Das Nervensystem des Menschen ist mit über 10^9 Neuronen und 10^{12} Synapsen ein komplexes Netzwerk der interzellulären Kommunikation (siehe Abb. 1). Hierzu bedarf es vielfältiger Prozesse, wie beispielsweise Zellteilung, Zellmigration, gerichtetes Axonwachstum und Synapsenbildung. Aber auch das vollständig entwickelte Gehirn eines Erwachsenen ist durch ständige Gedächtnisleistung und Lernen solchen Prozessen unterworfen (Sanes et al., 1999; Walsh and Doherty, 1997).

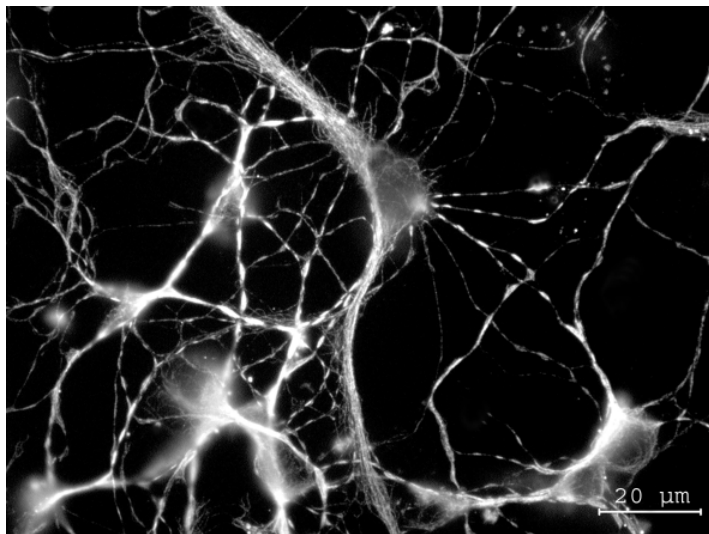


Abb. 1: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von cerebellären Körnerzellen 4 Tage nach Präparation.

Das Sichtbarmachen von Tubulin erfolgte mit einem Cy₃-markiertem Zweitantikörper (Maus).

Während der Entwicklung des Nervensystems legen Neurone durch Axonwachstum eine beachtliche Strecke zurück. Als besonders sensible Struktur befindet sich an der Spitze des Axons der Wachstumskegel. Dieser empfängt mit seinen fingerähnlichen, aktinreichen Filopodien und flachen Lamellipodien mit Hilfe von Rezeptoren, wie zum Beispiel die EPH (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma) Familie der Thyrosinkinase-Rezeptoren oder der Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR) extrazelluläre Reize (Brambilla et Klein, 1995; Orike et Pini 1996). Diese Signale können von anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix als fördernde, inhibierende oder regulierende Proteine abgegeben werden (Skaper et al., 2001; Walsh et Doherty, 1997). Das Neuron beantwortet diese Reize in Form von intrazellulären Signalkaskaden, die eine Veränderung des Zytoskeletts und schließlich ein Axonwachstum bewirken. Dieses wird bezüglich seiner Richtung und Geschwindigkeit kontrolliert (Dunican et al., 2000; Rehder et Kater; 1996).

Mit Hilfe der Rezeptoren ist es dem Neuron möglich ein extrazelluläres Signal in Form eines Proteins in ein intrazelluläres Signal, resultierend in einer Signalkaskade und Veränderungen

des Zytoskeletts, umzusetzen. Als Reaktion findet das auswachsende Axon seinen Zielort und bildet dort Synapsen aus (Gordon-Weeks, 2000).

2.2. Die Struktur der Nervenzelle

Um besser verstehen zu können, wie das Neuron wächst, soll ein kurzer Einblick in dessen Struktur gegeben werden (siehe Abb. 2):

Beim Neuron entspringen vom Zellkörper (Soma), dem biosynthetischen Zentrum der Zelle, das auch den Zellkern enthält, feine Zellverzweigungen (Dendriten). Da die meisten Signaleingänge von anderen Neuronen über diese erfolgen, kann man den Dendritenbaum als die Rezeptorregion des Neurons bezeichnen. Ein langer Zellfortsatz (Axon), der am Axonhügel des Somas entspringt, dient der elektrischen Erregungsleitung zur terminalen Verzweigungsregion der Nervenzelle.

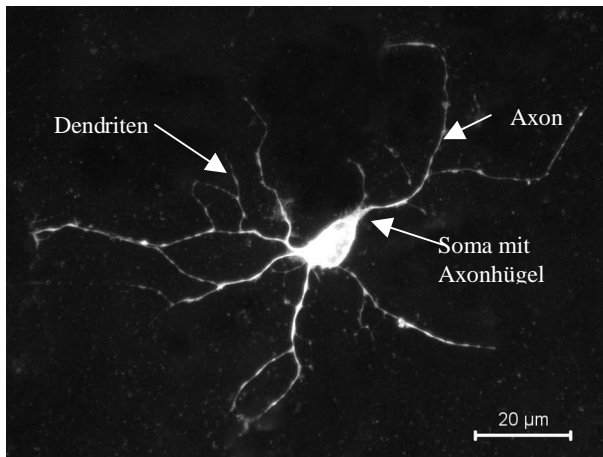


Abb. 2: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tau in einer cerebellären Körnerzelle (Maus) 1 Tag nach Präparation.

Das Sichtbarmachen von Tau erfolgte mit einem Cy₃-markiertem Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Cy₃).

Aus dem Neuron entspringen vom Axonhügel des Zellkörpers (Soma) ausgehend das Axon und feine Zellverzweigungen (Dendriten).

An der Spitze des wachsenden Axons befindet sich der Wachstumskegel. Dieser enthält als Elemente des Zytoskeletts Aktinfilamente und Mikrotubuli. Aktinfilamente befinden sich in der P-Domäne (peripheral domain), folglich in den Filopodien und verleihen diesen durch Polymerisationsauf- und -abbau dynamische Stabilität (siehe Abb. 3). Die Mikrotubuli befinden sich im Axonschaft, in der C-Domäne (central-domain) des Axons. Das Zytoskelett verleiht der Nervenzelle nicht nur Stabilität, sondern auch die Möglichkeit entlang der Mikrotubuli Mitochondrien, neurosekretorische Granula und für den Membranaufbau wichtige Vesikel zu transportieren (Doherty et al., 2000).

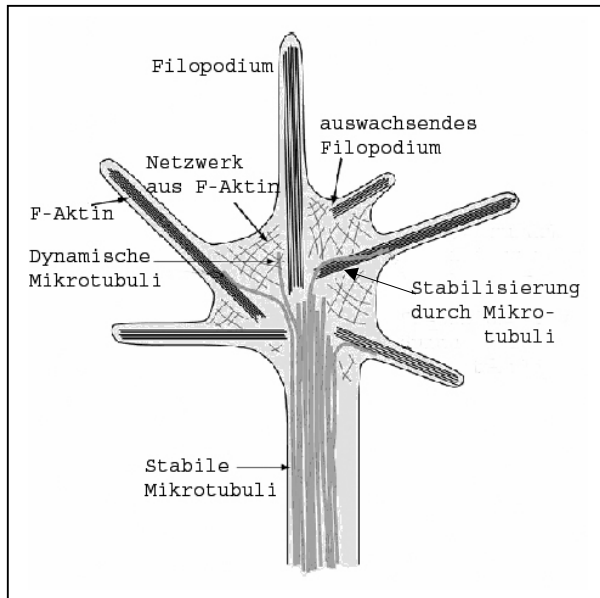


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Wachstumskegels.

Die dynamische Interaktion zwischen Aktinfilamenten (F-Aktin) und Mikrotubuli des Zytoskeletts ermöglicht ein Auswachsen der Axone (modifiziert nach Huot, 2004).

2.3. Signalstoffe

Die auf den Filopodien befindlichen Rezeptoren gelangen in Kontakt mit wachstumsfördernden, -hemmenden und -regulierenden Proteinen (siehe Abb. 4). Dies verursacht über Signalkaskaden eine ständige Veränderung in der Polymerisation des Zytoskeletts und bewirkt ein zielgerichtetes Axonwachstum (Zhou et al., 2003).

Anhand eines Diagramms sind solche Proteine in ihrer entsprechenden Klassifizierung aufgeführt.

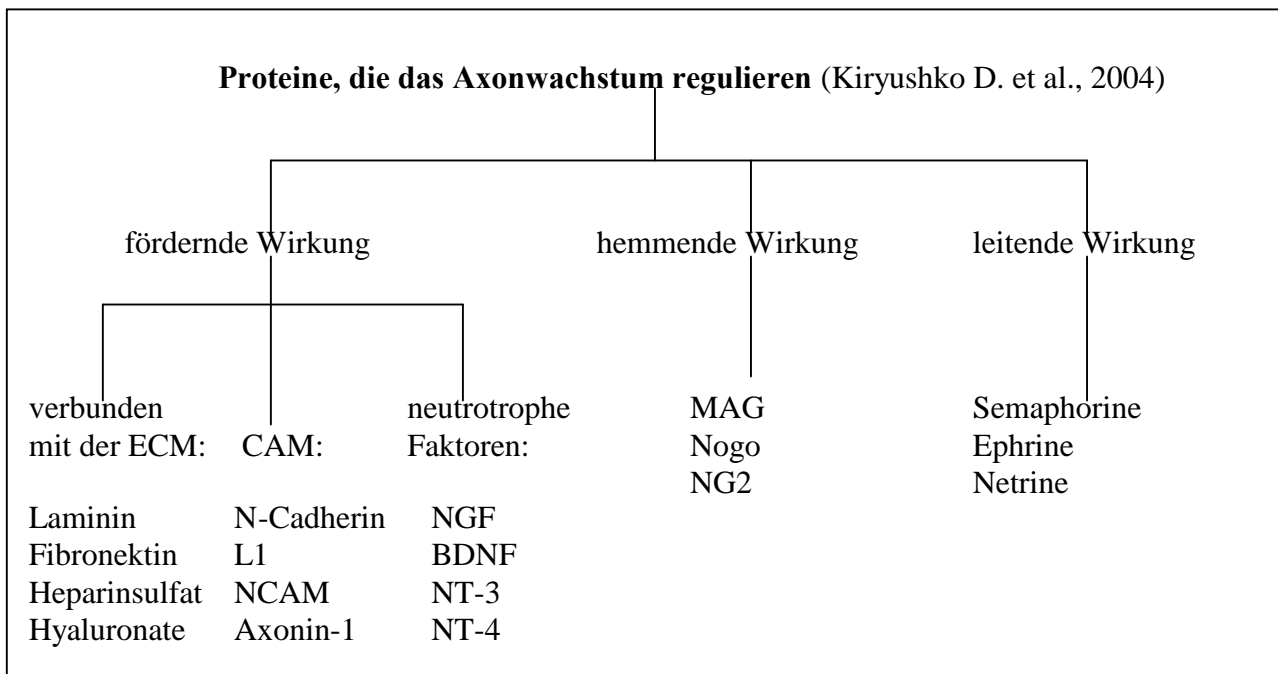


Abb. 4: Schematische Darstellung der Proteine, die das Axonwachstum regulieren, indem sie es fördern, hemmen oder leiten.

Proteine mit fördernder Wirkung können wie folgt eingeteilt werden: Proteine, die mit der extrazellulären Matrix (extracellular matrix, ECM) verbunden sind, Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAM) und neurotrophe Faktoren.

Inhibitoren haben die Aufgabe die Ausbildung der räumlichen Struktur des Nervensystems zu ermöglichen, indem sie ein ungezieltes Auswachsen der Neurone verhindern. Richtungsweisende Proteine steuern die Wachstumsrichtung der Neurone durch zeitlich und räumlich differenzierte Abgabe von Inhibitoren und wachstumsfördernden Stoffen (Kiryushko D. et al., 2004).

2.4. Evolutive Betrachtung des Verhältnisses zwischen Zelladhäsionsmolekülen und Immunglobulinen

Die Mitglieder der Immunglobulinfamilie (Ig) zeigen einen großen Zusammenhang bezüglich ihres strukturellen Aufbaus und ihrer intermolekularen Wechselwirkungen. Sie nehmen Einfluß auf das Immunsystem, die Entwicklung des Nervensystems und das gerichtete Axonwachstum (siehe Punkt 4.6.3.).

Die Ig-Familie, die sich in die drei Hauptgruppen CAM (cell adhesion molecules), RPTP (Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen) und RTK (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) untergliedert, weist in der EZD mindestens eine Ig-Domäne auf (siehe Abb. 5). Dies führt zu der Hypothese, dass Duplikation und Veränderung der limitierten Gene in der Evolution zu der Familie der Immunglobuline mit über 100 Mitgliedern geführt haben könnten (Walsh, Doherty 1997).

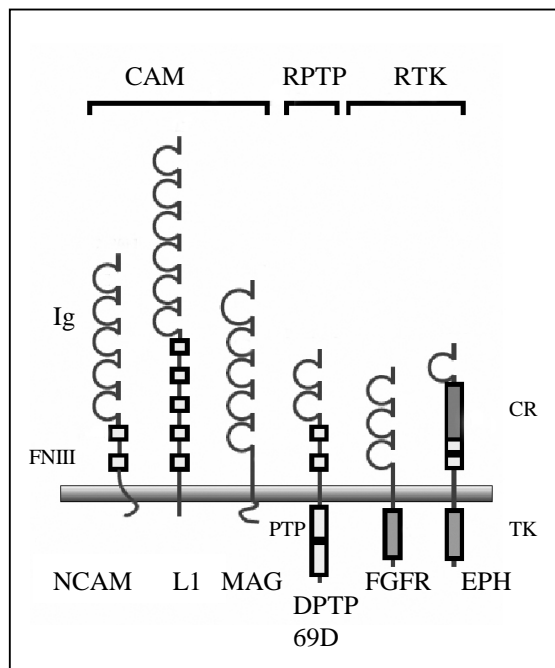


Abb.5: Strukturelle Darstellung der drei Hauptgruppen der Ig-Familie: CAM, RPTP und RTK.

Alle Moleküle werden durch Ig-Domänen charakterisiert.

CAM wie NCAM und L1 enthalten außer MAG (myelin-associated-glycoprotein) noch zusätzlich Fibronectin III-Domänen (FNIII).

RPTP untergliedern sich extrazellulär in Ig- und FNIII-Domänen. Intrazellulär weisen sie als katalytische Domänen PTP (Protein-Tyrosin-Phosphatasen) auf.

RTK werden intrazellulär durch Tyrosinkinase-Domänen (TK) charakterisiert. EPH enthält extrazellulär außer der Ig-Domäne eine cysteinreiche (CR) und zwei FNIII-Domänen.

2.5. Aufgaben von Mitgliedern der CAM-Proteinfamilie

Durch räumlich und zeitlich koordinierte Expression der CAM erfolgen: Regeneration des Gehirns, Neurogenese, gerichtetes Neuritenwachstum, Synaptogenese, Zelladhäsion, -erkennung und -aggregation (Fields and Itoh, 1996; Goodman, 1996).

Die Wirkung von CAM auf das Axonwachstum wurde in zahlreichen Versuchen *in vitro* nachgewiesen (Walsh, Doherty, 1997). CAM wie N-Cadherin, NCAM und L1 erzielen ihren Effekt, indem sie als Adhäsionsmoleküle eine Verbindung zwischen dem Neuron und dem Substrat z.B. 3T3-Zellen ermöglichen (siehe Abb. 6). Aber sie können auch eine Wechselwirkung mit den auf der Oberfläche befindlichen Rezeptoren gewährleisten. Mit Hilfe dieser Proteininteraktion wird ein extrazelluläres in ein intrazelluläres Signal umgesetzt, indem zahlreiche intrazelluläre Signalkaskaden und Interaktionen mit dem Zytoskelett ausgelöst werden (Gumbiner, 1993; Dunican et al., 2000).

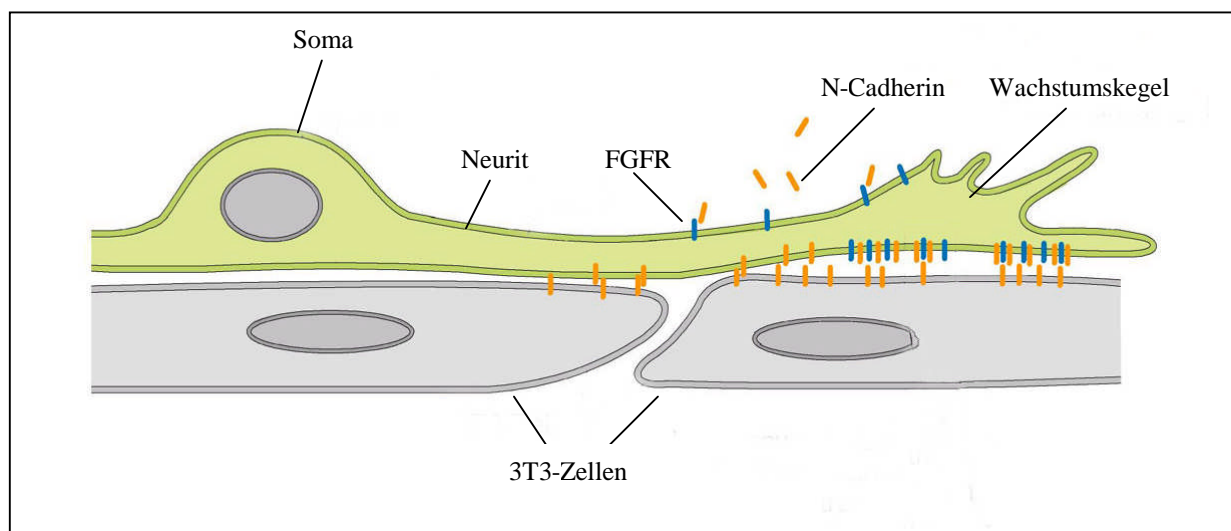


Abb. 6: Schematische Darstellung des Nervenwachstums.

Von transfizierten 3T3-Zellen abgegebenes N-Cadherin, als auch gelöstes N-Cadherin löst in Wechselwirkung mit dem FGFR-1 eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die eine Stimulation des gerichteten Axonwachstums zur Folge hat (modifiziert nach Drenckhahn).

2.6. Klinische Bedeutung der Bindung zwischen FGFR und N-Cadherin

Es wird vermutet, dass die Bindung von N-Cadherin an FGFR ein Überleben von Granulosazellen im Ovar (Trollice et al., 1997), aber auch die selbstständige Bewegungsfähigkeit von bestimmten Krebszellen (Hazan et al., 2000; Nieman et al., 1999) und dadurch die Metastasenbildung fördert.

Obwohl kein direkter Nachweis für die Bindung zwischen CAM und N-Cadherin mit dem FGF-Rezeptor bisher gezeigt werden konnte (Groth et al., 2002), wird angenommen, dass CAM und N-Cadherin das zielgerichtete Axonwachstum bewirken, indem sie den FGF-

Rezeptor aktivieren (Doherty et al. 1997). Durch den Einsatz von N-Cadherin-Antagonisten könnte somit auf therapeutischer Ebene einer Metastasierung von entarteten Zellen entgegengewirkt werden. Agonisten dagegen wären in der Lage ein Überleben von Zellen, ein Axonwachstum bzw. dessen Regeneration zu ermöglichen (Williams et al., 2001). Das Verständnis der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen ist daher ein entscheidender Schritt, um neue Behandlungsmethoden für neurologische Verletzungen, einschließlich Rückenmark-schädigungen entwickeln zu können (Skaper et al., 2001).

Basierend auf diesen Gegebenheiten ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit über Proteinbindungsstudien mit Hilfe eines Bindungsmodells (siehe Abb. 17) die Wechselwirkung zwischen der EZD von FGFR-1 und der EZD von N-Cadherin zu untersuchen.

2.7. Nervenzellen

Für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen FGFR und CAM werden in der Literatur verschiedene neuronale Zellen aufgeführt:

- cerebelläre Körnerzellen, embryonale Hippocampusneurone (Doherty et al., 1992)
- erwachsene DRG Neurone (engl.: dorsal root ganglion; dorsale Spinalganglienzellen) (Harper et al., 1994)
- embryonale Retinalganglien (Brittis et al., 1996)
- PC12-Zellen (Williams et al., 1994).

2.8. Kleinhirn

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden Körnerzellen aus dem Kleinhirn von 5-7 Tage alten Mäusen verwendet. Deshalb soll im folgenden auf das Kleinhirn und seine Zelltypen besonders eingegangen werden.

Zu den zentralen Aufgaben des Kleinhirns gehören Steuerung und Feinabstimmung der Motorik und Statik. Hierzu besitzt es stützmotorische Anteile der Haltung und Bewegung. Zusätzlich unterstützt es die im Großhirn entworfene Zielmotorik. Darüber hinaus ist das Kleinhirn beteiligt an der Stabilisierung der Blickmotorik, der Koordination unbewusster Planung und dem Erlernen von Bewegungsabläufen.

2.8.1. Mikroskopische Anatomie des Kleinhirns

Mikroskopisch betrachtet ist die Kleinhirnrinde nach außen begrenzt durch die Molekularschicht (Stratum moleculare), auf die nach innen die Purkinje-Zellschicht (Stratum purkinjense) und die Körnerzellschicht (Stratum granulosum) folgen (siehe Abb. 7).

Das Stratum moleculare ist die äußerste Rindenschicht und besteht hauptsächlich aus marklosen Nervenfasern wie Stern- und Korbzellen, Parallel- und Kletterfasern und Dendriten von Purkinje- und Golgizellen.

Das Stratum purkinjense stellt die mittlere Zellschicht der Kleinhirnrinde dar. Sie wird charakterisiert durch die größten Zellen des Kleinhirns, den Purkinje-Zellen. Diese sind von Astrozyten, den Bergmann-Gliazellen umgeben. Die Purkinje-Zellen besitzen ein großes Perikaryon, schicken in Richtung Marklager ein langes Axon und in Richtung der Molekularschicht einen großen, sich sehr verzweigenden zwei-dimensionalen Dendritenbaum.

Das Stratum granulosum enthält neben den komplexen Synapsen, die auch als Glomeruli cerebellares bezeichnet werden, 99 % der kortikalen Neurone und ist damit die zellreichste Schicht der Kleinhirnrinde. Diese besteht aus einigen Golgi-Zellen und zum größten Teil aus Körnerzellen. Letztere sind kleine, multipolare Neurone, die mit ihrem Transmitter Glutamat die einzigen erregenden Zellen der Kleinhirnrinde darstellen.

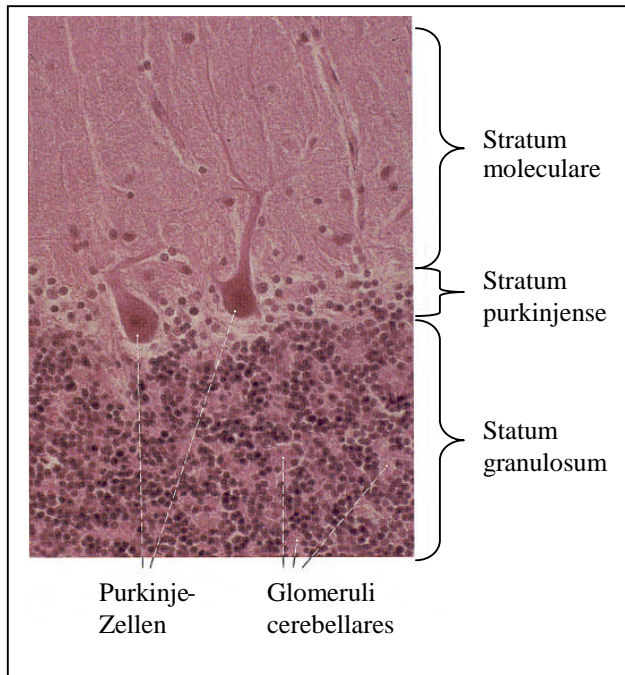


Abb. 7: Querschnitt durch ein Folium (Mensch).

Im Neurophil des Stratum moleculare sind rundliche Zellkerne (meist von Stern- und Korbzellen), im Stratum purkinjense die Zelleiber von zwei Purkinje-Zellen (ihre Dendriten verzweigen sich im Stratum moleculare) und im Stratum granulosum die Zellkerne von dicht stehenden Körnerzellen zu erkennen.

Die zellkernfreien kleinen eosinophilen Areale im Stratum granulosum entsprechen den Glomeruli cerebellares. Vergr. ca. 200fach
(modifiziert nach Benninghoff/Drenckhahn)

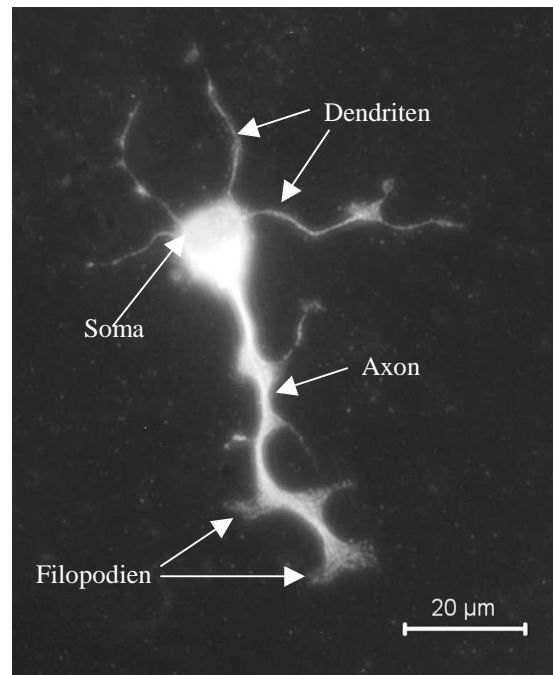


Abb. 8: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tau einer cerebellären Körnerzelle (Maus) 1 Tag nach Präparation.

Das Sichtbarmachen von Tau erfolgte mit Cy₃-markiertem Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Cy₃).

Aus dem Neuron entspringen vom Zellkörper (Soma) ein langer Zellfortsatz (Axon) mit feinen Zellverzweigungen (Dendriten).

Über Filopodien nimmt der Wachstumskegel mit Hilfe von Rezeptoren Kontakt zu seiner Umgebung auf.

3. Cadherine

3.1. Cadherine

Die Zell-Zell-Adhäsion ist ein komplexer Vorgang, bei dem verschiedene Mechanismen und Protein-Protein-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen. Um einen Einblick in die molekularen Ereignisse der Cadherin-vermittelten Zelladhäsion zu gewährleisten, soll zunächst eine kurze Beschreibung der Cadherine erfolgen.

Zahlreiche Glykoproteine der Zelloberfläche wurden als interzelluläre Adhäsionsmoleküle identifiziert. Sie werden laut Benninghoff et Drenckhahn (2003) in vier große Gruppen eingeteilt:

- Cadherine
- CAMs der Immunglobulinsuperfamilie
- Selektine
- Integrine

Die Cadherin-Familie lässt sich nach Gumbiner (2005) in folgende Gruppen unterteilen:

- klassische Cadherine: (siehe unten)
- desmosomale Cadherine: Desmocollin, Desmoglein
- atypische Cadherine: T-Cadherin, LI- Cadherin
- Proto-Cadherine: CNRS (α -Pcdhs), β -Pcdhs, γ -Pcdhs, PAPC, AXPC
- Cadherin-bezogene Signalproteine: FAT, Daschous, Falmingo, RET Tyrosinkinase

3.2. Klassische Cadherine

Die klassischen Cadherine werden laut Tepass et al. (2000) in folgende Untergruppen differenziert:

- Vertebraten-typische Cadherine Klasse I: E (epidermales)-, P (plazentales)-, N (neurales)-, und R (retinales)- Cadherin. Diese Proteine enthalten in der ersten EZD die Aminosäuren HAV (Histidin – Alanin – Valin) als hochkonservierte Sequenz.
- Vertebraten-typisches Cadherin Klasse II: VE (vascular endothelial) Cadherin. Die Sequenz HAV der ersten EZD wurde durch die die Sequenz QAI (Glutamin, Alanin, Isoleucin) ersetzt.
- Ascidien Cadherine
- Nicht-Vertebraten Cadherine: D- (*Drosophila*) Cadherin

Im menschlichen Organismus sind mehr als 80 verschiedene Mitglieder der Cadherinfamilie bekannt. Von diesen wurden mehr als 30 Cadherine im sich entwickelnden menschlichen Gehirn identifiziert. Jedes Cadherin weist ein Expressionsmuster auf, das spezifisch ist und von der Syntheseregion und dem Entwicklungsstand des Organismus determiniert wird (Obst-Pernberg, Redies; 1999).

Klassische Cadherine sind in ihrer Stabilität von Ca^{2+} -Ionen abhängig, weisen bevorzugt homophile Wechselwirkungen auf und sind in fast allen Geweben an der Zelladhäsion beteiligt. Ihre Namensgebung beruht auf dem Gewebe, in dem sie häufig exprimiert werden (Gumbiner, 2005).

3.2.1. Cadherinaufgaben im Embryo und adulten Organismus

Cadherine besitzen im Embryo und adulten Organismus unterschiedliche Funktionen:

- Funktionen während der embryonalen Entwicklung:
 - Morphogenese durch Separieren, Fusionieren und Bewegen verschiedener Gewebeschichten (Takeichi, 1995)
 - Ausbilden von Grenzschichten zu anderen Geweben (Kim et al., 2000; Tepass et al., 2002)
 - Umwandlung der Gewebe in ein anderes Gewebe; z.B. Bildung des Neuralrohrs aus dem Ektoderm (Matsunaga et al., 1988; Geisbrecht et al., 2002)
 - Ausbildung von Synapsen (Uchida et al., 1996)
- Funktionen im adulten Organismus:
 - Kontrolle des ständig wachsenden Gewebes (Hermiston et al., 1996, Tinkle et al., 2004)
 - Regulation der Synapsenbildung und synaptischen Plastizität (Togashi et al., 2002)
 - Stabilisierung des Gewebes durch interzelluläre Interaktionen, Ausbildung von tight und gap junctions (Uchida et al., 1996)
 - Verhinderung der Ausbreitung von Tumorzellen (Derycke et al., 2004)

3.2.2. Aufbau der klassischen Cadherine

Die mRNA der klassischen Cadherine kodiert für folgende Peptidsequenzabschnitte: Am Aminoterminus befindet sich das Signalpeptid, das aus ca. 130 Aminosäuren besteht. Auf dieses folgt eine EZD bestehend aus ca. 600 Aminosäuren, eine Transmembrandomäne und schließlich am Carboxyterminus die aus ca. 150 Aminosäuren bestehende zytoplasmatische Domäne (siehe Abb. 9).

3.2.3. Besonderheiten

Die EZD ist an ihrem Aminoende hoch konserviert und kann in fünf Subdomänen differenziert werden, die jeweils aus ca. 110 Aminosäuren bestehen. Zwischen den einzelnen Subdomänen befinden sich die konservierten Aminosäuresequenzen wie PE (Prolin, Glutaminsäure), LDRE (Leucin, Asparaginsäure, Arginin, Glutaminsäure), DXNDN (Asparaginsäure, beliebige Aminosäure, Asparagin, Asparaginsäure, Asparagin) und DXD (Asparaginsäure, beliebige Aminosäure, Asparaginsäure) (Derycke and Bracke, 2004). In diesem Bereich binden jeweils drei Ca^{2+} -Ionen und bewirken die Bildung eines gertenähnlichen, vor Proteolyse geschützten, stabilen Proteins. Die fünfte Domäne enthält vier konservierte Cysteine. Die Domänendifferenzierung erinnert an Ig-ähnliche Domänen, ist aber nicht mit ihnen identisch (Overduin et al., 1995; Saphiro et al., 1995).

Die zytoplasmatische Domäne ist am höchsten konserviert und kann folgender Maßen charakterisiert werden. An die juxtamembranäre Region bindet p120-Catenin (p120^{ctn}), durch dessen Phosphorylierung die Adhäsion von N-Cadherin beeinflusst werden kann (Derycke et Bracke, 2004, Takeichi, 1990). Im darunterliegenden Bereich der zytoplasmatischen Domäne ist β -Catenin verankert und bindet an α -Catenin. Letzteres kann mit dem Aktin-Zytoskelett wie folgt reagieren; entweder durch direkte Bindung an Aktinfilamente oder indirekt durch Proteine, die an Aktin binden wie Vinculin, α -Actinin und Formin-1. Klassische Cadherine bewirken auf diese Weise über die zytoplasmatische Domäne eine Verankerung am Zytoskelett, aber auch eine Möglichkeit der Signaltransduktion (Gumbiner, 2005).

Die extra- und intrazelluläre Domäne sind als eine funktionelle Einheit zu betrachten, denn nach carboxyterminaler Deletion verlieren Cadherine nicht nur ihre Fähigkeit zur Zell-Zell-Bindung, sondern auch die Möglichkeit mit dem Zytoskelett Bindungen einzugehen (Takeichi, 1990).

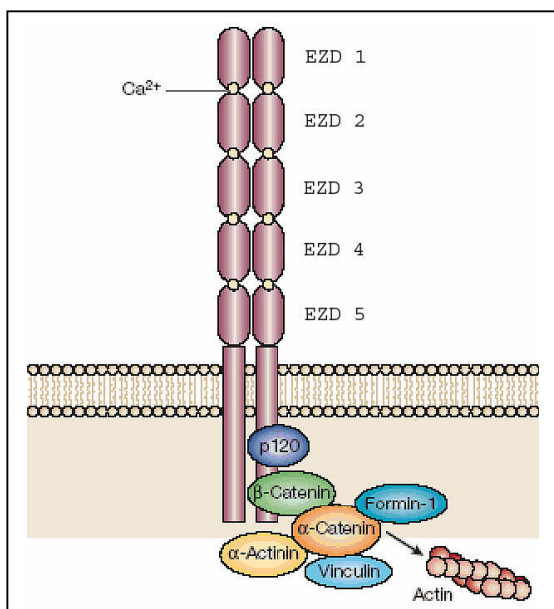


Abb. 9: Schematische Darstellung des Cadherin-Catenin-Komplexes.

Die extrazellulären Domänen (EZD) des klassischen Cadherins bestehen aus fünf Subdomänen, die Ca^{2+} Bindungsstellen aufweisen und über cis-homophile Wechselwirkung miteinander verbunden sind.

Der universale Kern-Catenin-Komplex besteht aus: p120-Catenin, das an der juxtamembranären Region und β -Catenin, das an der distalen Region gebunden ist. β -Catenin steht in Verbindung mit α -Catenin, das an Aktin und aktinbindende Proteine wie Vinculin, α -Aktinin und Formin-1 bindet. (modifiziert nach Gumbiner; 2005)

3.3. Bindung

Cadherine gehen aufgrund höherer Bindungsstabilität bevorzugt mit Zellen des gleichen Cadherintyps über ihre EZD Bindungen ein. Es entstehen starke, homophile Interaktionen. Auch heterophile Bindungen zwischen verschiedenen Cadherin-Typen sind nachgewiesen worden. Ziel der Bindung ist es, Zell-Zell-Kontakte auszubilden.

Die Bindungsspezifität wird von den ersten 113 Aminosäuren der EZD verursacht. In diesem Bereich sind ca. 65 % der Aminosäuren zwischen verschiedenen Cadherinen aufgrund des hohen Konservierungsgrades identisch.

Unter den ersten 113 Aminosäuren der ersten EZD befindet sich das hoch konservierte HAV-Motiv, das für die Bindung wichtig ist. Gibt man zu Cadherinen ein die HAV-Sequenz enthaltendes Peptid, findet keine Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Bindung statt, da die Bindungsstelle durch das Peptid blockiert wird. Basierend auf diesen Beobachtungen wird diskutiert, dass die HAV-Sequenz als Zentrum für Interaktionen in Betracht gezogen werden kann (Takeichi, 1990). Allerdings steht die Aminosäure Alanin nicht für eine Bindung zur Verfügung, da ihre räumliche Orientierung innerhalb des Moleküls liegt und nicht nach außen zeigt (Kamiguchi et Lemmon, 2000).

Typ II-Cadherine enthalten statt HAV die Sequenz QAI (Glutamin, Alanin, Isoleucin). Mutationen innerhalb dieser Sequenzen zeigten keinerlei Einfluß auf die homophile Bindung (Shimoyama et al., 1999; Kitagawa et al., 2000).

Für eine Adhäsionsfunktion wird eine Lateraldimerisierung der EZD am Aminoterminus diskutiert (Saphiro et al., 1995; Briehar et al., 1996, Shan et al, 2000; Angst et al., 2001). Als Monomere zeigen Cadherine eine schwache Adhäsionsaktivität, hingegen ist ihre Bindung als cis-Dimere stark (Yap et al., 1997; Tamura et al., 1998). Die Cadherin-spezifische Bindung zeigt meistens eine homophile, teilweise auch heterophile Interaktion und involviert die EZD 1, 2, 4 und 5. Die EZD 3 hingegen wird für die homophile Bindung nicht in Betracht gezogen (Chappuis-Flament et al., 2001).

Die EZD 1 ist besonders intensiv untersucht worden. Die zweite Aminosäure der EZD 1 Tryptophan 2 (Trp2) ist in den klassischen Cadherinen hoch konserviert (Tamura et al., 1998). Sie greift in eine hydrophobe Tasche des benachbarten Cadherins und bildet aus zwei Monomeren ein trans- oder cis-Dimer (Boggon et al, 2002; Haussinger et al., 2004; Shapiro et al., 1995; Laur et al., 2002; Ozawa, 2002). Harrison et al. (2005) nehmen an, dass die Bindung von Trp2 die Cadherinbindung initiiert; Ca^{2+} -Ionen dagegen regulieren das Gleichgewicht zwischen dimerisierten und monomeren Cadherinen. Bei niedrigen Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen ist Trp2 stärker gebunden als bei physiologischen Konzentrationen; es

überwiegen demzufolge die Dimere (Harrison et al., 2005). Ca^{2+} -Ionen bewirken zusätzlich eine Steifheit des Moleküls und verhindern den Abbau durch Proteasen (Hyafil et al, 1981; Takeichi 1991; Pokutta et al, 1994; Sivasankar et al, 1999).

3.3.1. Synaptisches Bindungsmodell

Gemäß des Modells „Zell-Adhäsionsreißverschluß“ (siehe Abb. 10) erlaubt die schwache homophile Interaktion zwischen den Monomeren eine dynamische Wechselwirkung der Zellen untereinander (Colman, 1997). Wenn benachbarte Zellen aufgrund des Bindungsmotivs erkannt werden, erfolgt eine Umwandlung der ursprünglichen Cadherinmonomere in cis-Dimere (siehe Abb. 10) und ermöglicht so eine höhere Bindungsstärke (Obst-Pernberg, Redies; 1999). Dies gewährleistet eine selektive Zellerkennung (Gumbiner, 2005). Homotypische Cadherin-Cadherin-Wechselwirkung findet man beispielsweise zwischen den Membranen auswachsender Axone und Zellen ihrer Umgebung (Matsunaga et al., 1988; Bixby and Zhang, 1990; Redies and Takeichi, 1993) und in der Verbindung zwischen prä- und postsynaptischer Membranen (Fannon and Colman, 1996; Uchida et al., 1996).

Wenn Neurone verschiedene Cadherine synthetisieren, werden zwischen den unterschiedlichen Cadherinen benachbarter Zellen trans-Dimere ausgebildet. Es entstehen so über Clusterbildung Oligomere.

Zur Zeit werden folgende unterschiedliche Hypothesen für synaptische Cadherin-Cadherin-Wechselwirkungen diskutiert (Obst-Pernberg, Redies; 1999).

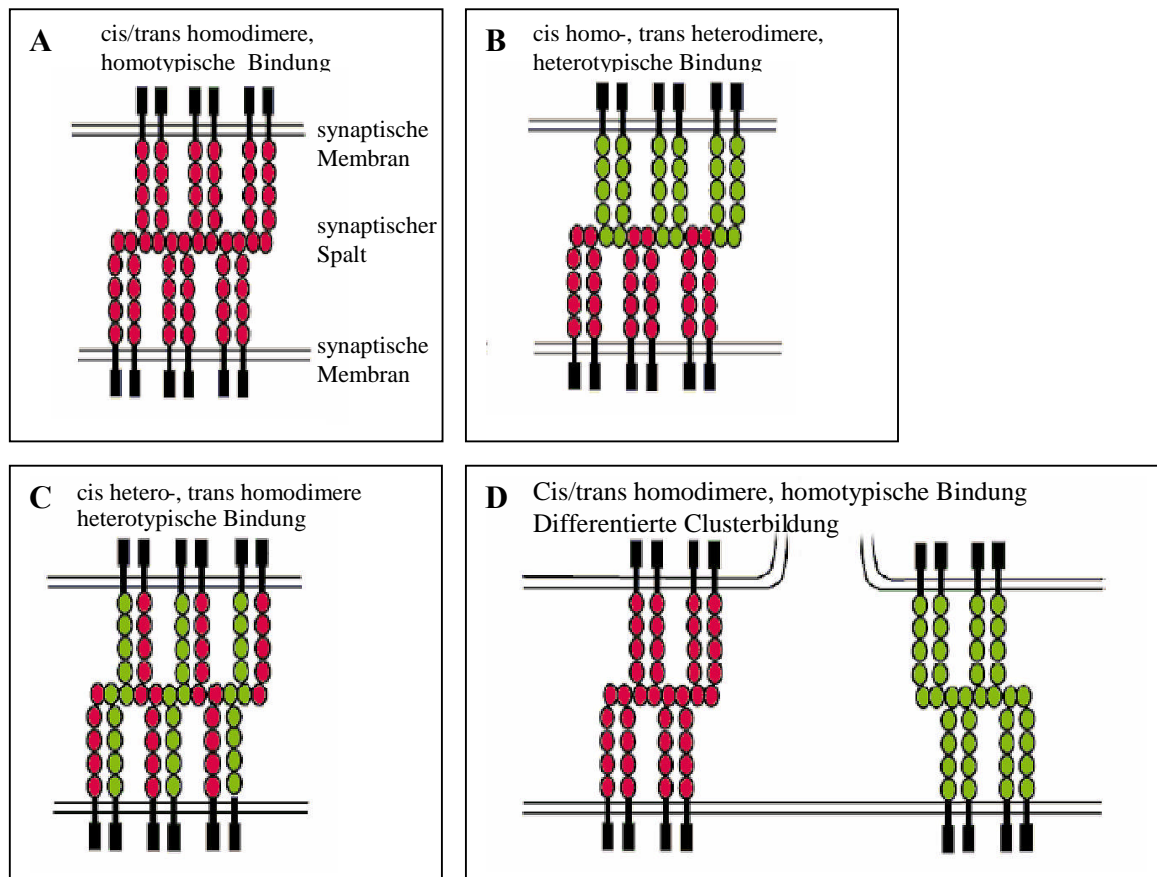


Abb. 10: Schematische Darstellung von möglichen Interaktionen zwischen Cadherinen innerhalb der prä- und postsynaptischen Membran.

A: Wechselwirkung zwischen cis- und trans- Homodimeren unter Ausbildung einer homotypischen Bindung.

B: Wechselwirkung zwischen cis Homo- und trans Heterodimeren unter Ausbildung einer heterotypischen Bindung.

C: Wechselwirkung zwischen cis Hetero- und trans Homodimeren unter Ausbildung einer heterotypischen Bindung.

D: Zwei Neurone, die verschiedene Cadherintypen auf ihrer Synapsenmembran exponieren, binden durch cis und trans Homodimere an verschiedenen Positionen der Membran. Diese homotypische Bindung ermöglicht die Verbindung zwischen verschiedenen Neuronen und stellt eine Möglichkeit dar, wie ein postsynaptisches Neuron von zwei verschiedenen präsynaptischen Neuronen excitatorische und inhibitorische Signale erhalten kann. (modifiziert nach Obst-Pernberg, Redies; 1999)

3.3.2. Modelle der homophilen Cadherinbindung

Um die Zelladhäsion zu verstehen, ist es notwendig unterschiedliche Adhäsionsbindungen zu betrachten. Zur Zeit werden verschiedene Modelle der homophilen cis-Dimerisierung von Cadherinmolekülen diskutiert (siehe Abb. 11).

• **lineares Zippermodell (Reißverschlußmodell):** Kristallstrukturanalysen zeigen, dass die aminoterminalen EZD 1 von N-Cadherin über Tryptophan (Trp2, W) in eine hydrophobe Tasche der EZD 1 eines zweiten N-Cadherin-Moleküls greift und hierdurch zu einer cis-Dimerisierung führt (Tamura et al., 1998). Aus Kristallstrukturanalysen folgern Saphiro et al. (1995), dass die EZD 1 vermittelte, homophile Bindung über die Aminosäuresequenz INSPISGQ (Isoleucin, Asparagin, Prolin, Isoleucin, Serin, Glycin, Glutamin) erfolgt und

direkt der HAVDI-Region (Histidin, Alanin, Valin, Asparginsäure, Isoleucin) eines zweiten N-Cadherin Moleküles gegenüber liegt. Die Aminosäuresequenz HAVDI bindet INPISGQ und bildet durch reziproke Anordnung ein homophiles trans-Dimer. Die EZD 1 von N-Cadherin bildet über die Bildung der cis- und trans-Adhäsionsdimere das Reißverschlußmodell. Die Multivalenz der Bindungen kann zu einer Affinitätssteigerung führen. Als weiteres Bindungsmotiv werden Aminosäuren diskutiert, die das HAV-Motiv umgeben. Allerdings konnte dies in Mutationsstudien nicht bestätigt werden (Renaud-Young, et al., 2002).

- Das **revidierte Modell des linearen Zippermodells** basiert auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Desmosomen und der Kristallstruktur der Ektodomäne von C-Cadherin: Ein Cadherinmonomer dimerisiert über Trp2 nicht in cis, sondern in trans-Stellung. Diese Art der Dimerisierung steht somit im Widerspruch zum Zippermodell (Boggon et al., 2002). Allerdings wird auch angenommen, dass eine Variation von beiden Modellen durch ein hin und her Springen des Trp2 vorliegen könnte, die auf einem Wechsel zwischen cis- und trans-Interaktion beruht (Klingelhofer et al., 2002).

- Die **Darstellung eines x-förmig gekreuzten Dimers** basiert auf der Kristallstruktur von E-Cadherin und elektronenmikroskopischen Untersuchungen von artifiziell multimerisierten E-Cadherin Ektodomänen. Hier wird eine homophile cis-Dimerisierung durch eine Bindung der Ca^{2+} -Bindungsstellen zwischen EZD 1 und EZD 2 initiiert. Indem Trp2 intramolekular in seine eigene hydrophobe Bindungstasche bindet, entsteht eine Konformationsänderung, die eine trans-homophile Bindung zwischen Cadherinen ermöglicht (Pertz et al., 1999).

- Ein **Modell mit intensiver Überlappung** der EZDn beruht auf biophysikalischen und biochemischen Studien und Kraftmessungen zwischen C-Cadherin-Ektodomänen (Chappius-Flament et al., 2001). Die Trans-Interaktion der Trp-vermittelten Cis-Dimere beruht nicht nur auf EZD 1, sondern möglicherweise auch auf den EZDn 2-5, da bei L-CAM (Hühnchen E-Cadherin) die Adhäsion unabhängig von der EZD 1 stattfinden kann (Renaud-Young et al., 2002).

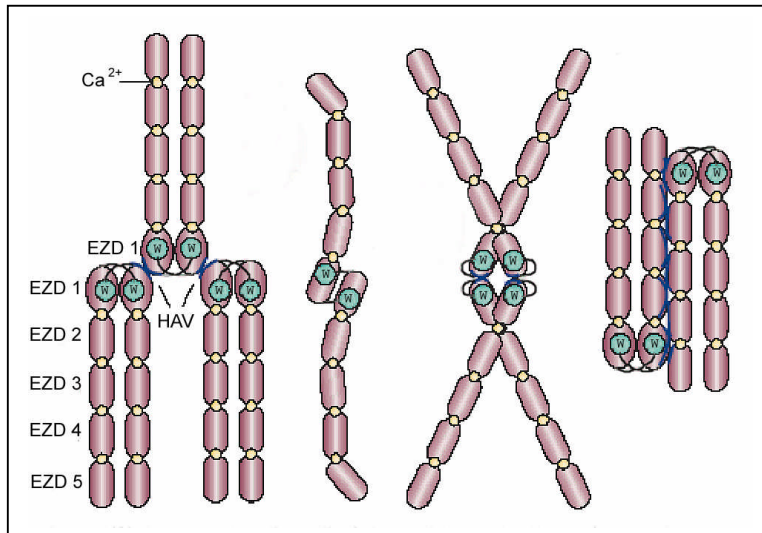


Abb. 11: Schematische Darstellung der verschiedenen Modelle der homophilen Cadherinbindung.

- a: Lineares Zippermodell
- b: Revidiertes Modell des linearen Zippermodells
- c: Modell des x-förmig gekreuzten Dimers
- d: Modell mit intensiver Überlappung

- Ca^{2+} -Bindungsstellen
- w Trp2 in der EZD¹ von N-Cadherin

(modifiziert nach Gumbiner, 2005)

3.4. N-Cadherin (neurales Cadherin)

N-Cadherin (neurales Cadherin) entspricht in seinem Aufbau einem klassischen Cadherin und wurde 1982 von Grunwald als 130 kDa großes Molekül aus der Hühnerretina isoliert.

Es spielt eine bedeutende Rolle in der Embryonalentwicklung, da N-Cadherin im frühen Embryonalstadium im Mesoderm und Notochord gebildet wird. Hingegen ist es im spätem Embryonalstadium im Nervengewebe, Herz, Skelettmuskel und in der Linse nachweisbar (Hatta et al., 1987; Takeichi, 1988).

Im adulten Organismus wird es in Nervengewebe, Retina, Endothelzellen, Fibroblasten, Osteoblasten, Mesothel, Oozyten, Spermatozyten und Sertoli-Zellen gebildet (Derycke and Bracke, 2004).

N-Cadherin defiziente Mäuse sterben im embryonalen Stadium am Tag 9 oder 10, da die Differenzierung einzelner Gewebe wie z. B. das Herz nicht stattfindet (Redies, 2000). N-Cadherin stimuliert über Zell-Zell-Kontakte die Migration und Invasion von Zellen und unterdrückt zusammen mit dem stark exprimierten E-Cadherin in geringer Menge die Krebsbildung (Derycke and Bracke, 2004).

Die potentiellen Bindungsstellen zwischen dem FGFR-1 und N-Cadherin und die daraus resultierenden Folgen werden in den Abschnitten 4.5.4 und 2.6. diskutiert. N-Cadherin geht bevorzugt homophile Bindungen ein; aber es sind auch heterophile Bindungen zwischen N- und R-Cadherin auf Sertoli-Zellen und Spermatozyten bekannt (Shan et al., 2000).

4. Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor **(Fibroblast-growth-factor-receptor; FGFR)**

4.1. Einteilung

FGFR gehören laut einer Einteilung von Ullrich und Schlessinger (1990) der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinase an. Sie sind hoch konserviert, ligandenspezifisch und werden durch gewebespezifische Expression (Powers et al., 2000) der vier verschiedenen FGF-Rezeptor-Gene (FGFR 1-4) und durch alternatives Spleißen innerhalb der für die carboxyterminale Hälfte der Ig III-Domäne kodierenden Kopien gebildet (siehe Punkt 4.4.) (Miki et al., 1992; Chellaiiah et al., 1994).

FGFR sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 55 % bis 72 % identisch (Johnson et Williams, 1993). Raffioni konnte (1999) zeigen, dass der prinzipielle Unterschied zwischen den FGF-Rezeptoren in der Stärke der Tyrosinkinaseaktivität liegt. Das bedeutet, dass die verschiedenen FGFR extrazelluläre Signale in identische intrazelluläre Signalkaskaden mit unterschiedlicher Stärke umwandeln.

Die Störung der FGF-Rezeptorfunktion führt zu pathologischen Ereignissen. So verursachen Mutationen Skelettanomalitäten wie beispielsweise Achondroplasie und Kraniosynostosen (Passos-Bueno; 1999). Eine Fehlregulation auf der Ebene des Spleißens kann zur Entartung von Zellen führen (Valve et al., 2001).

4.2. Gewebespezifische Expression der FGFR 1-4 Gene nach Coumoul et al., 2003

• FGF-Rezeptor-1 Gen

Die Expression erfolgt fast ausschließlich im Mesenchym. FGFR-1 spielt eine wichtige Rolle während früherer Entwicklungsstadien z. B. bei der Mesodermbildung und Zellmigration während der Gastrulation und Organogenese.

• FGF-Rezeptor-2 Gen

Die Expression findet bevorzugt im Epithel während der frühen Gastrulation statt. In der Organogenese und späteren Entwicklung lässt sich FGFR-2 im Epithel und Mesenchym nachweisen.

• FGF-Rezeptor-3 Gen

Die Expression erfolgt während der Osteogenese.

• FGF-Rezeptor-4 Gen

Die Expression erfolgt im Endoderm und glatter Muskulatur. FGFR-4 kontrolliert in Kooperation mit FGFR-3 die postnatale Lungenentwicklung und Leberfunktion.

4.3. FGF-Rezeptoren im Zentralen Nervensystem (ZNS)

Die FGF-Rezeptoren 1-3 werden im ZNS gebildet und binden bevorzugt FGF 2, 8, 15 und 17 (Ford-Perriss et al., 2001). FGFR-1 zeigt eine ubiquitäre Verteilung im ZNS (Coumoul et al., 2003), während FGFR-2 und 3 (Mason et al., 2000) nur in einigen Regionen zu finden sind. FGFR-4 läßt sich dagegen im ZNS überhaupt nicht nachweisen (Weinstein et al., 1998). FGFR-1-3 Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle während der Neurogenese und zeigen dort eine starke Präsenz während der frühen Phasen. FGFR-3 reguliert die Differenzierung von Astro- und Oligodendrozyten (Coumoul et al., 2003).

Da die meisten Untersuchungen bisher mit FGFR-1 durchgeführt wurden (Reuss et al., 2003), wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich FGFR-1 verwendet. Im folgenden soll daher dieser Rezeptor näher erläutert werden.

4.4. Aufbau von FGFR-1

Die Struktur des Rezeptors lässt sich wie folgt beschreiben. Der Aminoterminus enthält eine hydrophobe Signalsequenz, gefolgt von der Ig-ähnlichen Domäne I. Auf diese folgt die „acid-box“ mit acht aufeinander folgenden sauren Aminosäuren Glutamin- und Asparaginsäure (Groth et al., 2002). Auf die „acid-box“ folgt die CAM-homology-domain (CHD) (Doherty et al., 1996) mit dem ¹⁶⁶HAV¹⁶⁸-Motiv und einer Bindungsstelle für Heparin, die eine Interaktion mit der extrazellulären Matrix ermöglicht (Groth et al., 2002). Die Spleißvarianten Ig III a, b und c gewährleisten eine spezifische Ligandenbindung von FGF (Reuss et al., 2003; Friesel et al., 1995).

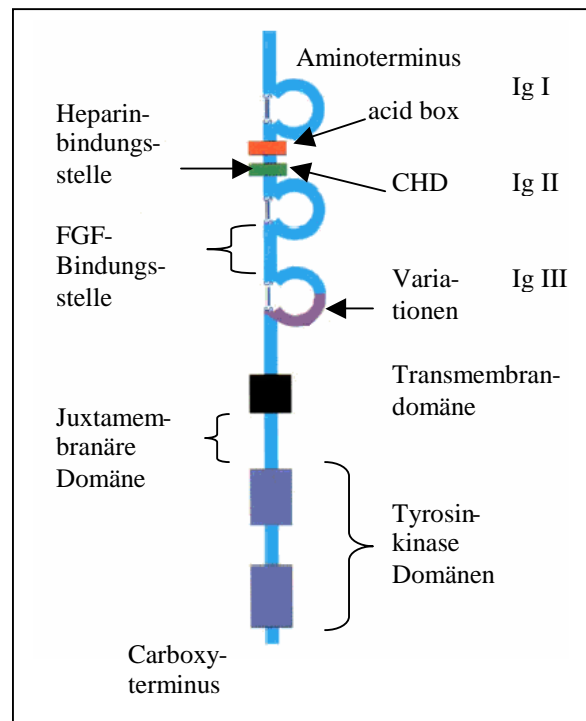


Abb. 12: Domänenstruktur von FGFR-1 (modifiziert nach Green, et al., 1996)

Nach einer hydrophoben Transmembrandomäne schließt sich eine juxtamembranäre Domäne, gefolgt von zwei intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen an. Letztere sind durch eine Interkinasedomäne, bestehend aus 14 Aminosäuren voneinander getrennt und für die Signaltransduktion des Rezeptors verantwortlich.

Die mRNA der vier FGF-Rezeptoren wird unterschiedlich gespleißt, so dass eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren, die entweder membrangebunden oder löslich sind, entsteht. Eine Übersicht dieser Isoformen ist in Abb. 13 dargestellt.

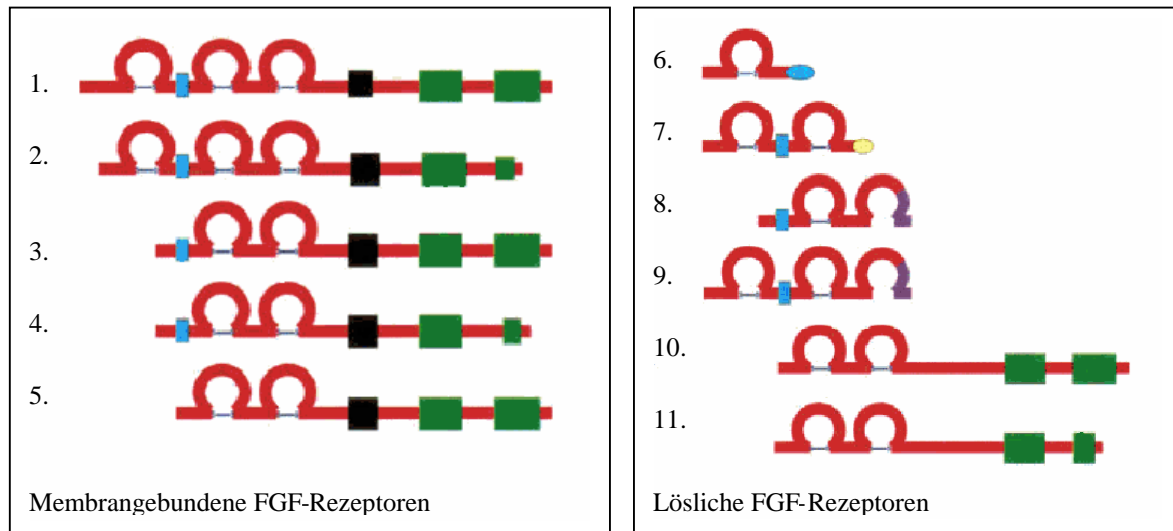


Abb. 13: Alternative Isoformen des FGF-Rezeptors.

Tronkierte Formen unterscheiden sich durch das Fehlen einer oder mehrerer Ig-ähnliche Domänen (3-8, 10, 11), der „acid box“ (5, 10, 11) oder der Transmembran-Domäne (10, 11). Einige Isoformen zeigen einen trunke Carboxyterminus (2, 4, 11). (modifiziert nach Green, 1996)

4.5. Bindungsmodelle des FGF-Rezeptors

Der FGFR dient nicht nur als Rezeptor für FGF, sondern vermittelt auch Effekte von Zelladhäsionsmolekülen wie N-Cadherin, NCAM und L1. Ob die Effekte durch direkte Bindung oder durch indirekte Mechanismen vermittelt werden, ist unbekannt. Im Anschluss sollen die verschiedenen Bindungsmodelle vorgestellt werden.

4.5.1. Bindungsmodell zwischen dem FGF-Rezeptor und den Liganden FGF, Heparin und Heparinsulfatproteoglykane

Die EZD des FGF-Rezeptors interagiert mit verschiedenen FGFs, von denen zur Zeit 23 verschiedene Mitglieder bekannt sind (Groth et al., 2002; Reuss et al., 2003). Die Wechselwirkung zwischen FGFR und FGF spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und bei regenerativen Prozessen aller Säugetiere (Reuss et al., 2003).

FGFs wirken sehr unterschiedlich, zum Beispiel in der Wundheilung, Zellmigration, Differenzierung und Mitogenese. Während der Entwicklung des Nervensystems werden FGF-1 und -2 am häufigsten exprimiert und fördern *in vitro* das Überleben von Neuronen aus dem peripheren und zentralen Nervensystem (Eckenstein et al., 1994). Jedoch sind FGF wie z. B. FGF-3 als Onkogene identifiziert worden (Folkman J., 1985).

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich FGF-2 verwendet. FGF-2 wird auch als basisches FGF bezeichnet. Es verursacht in den Neuronen des Hippocampus ein Auswachsen der Axone, aber nicht der Dendriten. FGF-2 verändert die Morphologie des Wachstumskegels und fördert das Wachstum von Filopodien (Szebenyi et al., 2001). Dies deutet auf eine mögliche Rolle von FGF-2 in der Regulation des verletzungsbedingten Axonwachstums. FGF-2 vermindert den durch Glutamat verursachten neuronalen Zelltod durch Regulation des Glutamatrezeptors (Reuss et al., 2003).

An FGF binden Heparin und Heparinsulfatproteoglykane (HSPG), die sich auf der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix befinden. Auf diese Weise wird FGF vor Proteasen geschützt (Gospodarowicz et Cheng, 1986; Damon et al., 1989). Durch die Bindung von HSPG ist eine indirekte Wirkungskontrolle von FGF möglich (Powers et al., 2000).

In Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium werden unterschiedliche HSPG-Moleküle synthetisiert. Diese sind in der Lage verschiedene FGFs zu binden und die Signaltransduktion zu modifizieren (siehe Punkt 4.6). So bindet beispielsweise HSPG am embryonalen Tag 9 (E9) von Mäusen an FGF-2 und am E11 Tag an FGF-1.

Moscatelli führte 1987 an BHK- (baby hamster kidney) Zellen Bindungsstudien mit FGF-2 durch und fand für FGF-2 zwei Bindungsstellen: Die Bindungsstelle zwischen FGF und dem FGFR-1 mit hoher Bindungsaffinität [Dissoziationskonstante $K_D = 20 \text{ pM}$] und die Bindungsstelle zwischen FGF-2 und Heparin/HSPG mit niedriger Bindungsaffinität [$K_D = 2 \text{ nM}$].

Klagsbrun and Baird entwickelten aufgrund dieser Beobachtungen 1991 folgendes Modell:

Auf der Zelloberfläche befindliche HSPGs binden FGF und reichern den Wachstumsfaktor dort an. Zusätzlich bewirkt die Bindung zwischen FGF und Heparin eine Konformationsänderung von FGF, so dass dieser Komplex in der Lage ist, mit zwei FGFR-Molekülen jeweils zwischen der zweiten und dritten Ig-ähnlichen Domäne eine Bindung einzugehen. Durch die Dimerisierung der FGF-Rezeptoren gelangen die zytoplasmatischen Domänen mit ihren Tyrosinkinase in engen Kontakt, so dass eine gegenseitige Phosphorylierung der Tyrosinreste entlang der zytoplasmatischen Domänen stattfinden kann (Lemmon and Schlessinger; 1994). Der aktivierte Rezeptor löst eine Kaskade in der Zelle aus,

die besonders Einfluss auf deren Differenzierung nimmt (Passos et al., 1999; siehe Punkt 4.7.).

HSPG ist ein wichtiger Faktor für die FGF-FGFR Dimerisierung. Anhand von Bindungsstudien zeigten Spivak-Kroizman et al. (1994), dass der FGFR nur eine Bindungsstelle für FGF aufweist und der FGFR folglich nur dimerisieren kann, wenn zwei FGF-Moleküle binden.

Plotnikov et al. (1999) entwickelten folgendes Bindungsmodell:

Ein einzelnes Molekül HSPG bindet zwei FGF-Moleküle. Jedes FGF-Molekül bindet zwischen der zweiten und dritten Ig-ähnlichen-Domäne von je einem Rezeptor. Der entstandene Komplex wird durch HSPG stabilisiert, das eine Brücke zwischen den FGF-FGFR-Rezeptordimeren bildet.

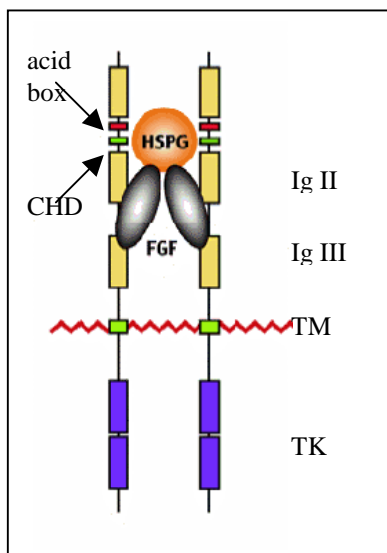


Abb. 14: Möglicher Komplex zwischen FGFR, HSPG und FGF für die Rezeptoraktivierung

2 FGF-Moleküle binden zwischen der 2. (Ig II) und 3. Ig (Ig III)-ähnlichen Domäne von zwei FGFR-Molekülen. HSPG verbindet als Brücke die beiden FGF-FGFR-Monomere und ermöglicht in Folge der Dimerisierung die Aktivierung des Komplexes und so eine Signaltransduktion.

CHD=CAM-Homologie-Domäne mit Heparinbindungsstelle
 TM = Transmembrandomäne
 TK = Tyrosinkinasedomäne
 (modifiziert nach Groth, 2002)

4.5.2. Bindung zwischen dem FGFR und Zelladhäsionsmolekülen (CAM)

Im sich entwickelnden Gehirn werden außer FGF auch andere Bindungspartner gebildet, z.B. HSPG (siehe oben) und möglicherweise auch Zelladhäsionsmoleküle (cell adhesion molecules, CAM) wie L1, NCAM und N-Cadherin (Green et al., 1996). CAM spielen eine wichtige Rolle während der Neurogenese, indem sie Zell-Zell-Interaktionen ermöglichen, wie sie beispielsweise für Zellwanderung, gerichtetes Axonwachstum, synaptische Plastizität und Neuronenregeneration notwendig sind (Doherty et al., 1996; Benson et al., 2000).

Obwohl kein direkter Nachweis für die Bindung zwischen CAM und dem FGFR bisher gezeigt werden konnte (Groth et al., 2002), wird angenommen, dass CAM das zielgerichtete Axonwachstum durch Aktivierung des FGFR stimulieren. Dies wurde durch folgende Versuche gezeigt:

- Antikörper gegen den FGFR inhibieren das durch N-Cadherin, NCAM und L1 verursachte Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen, PC12-Zellen (Williams et al., 1994) und Retinalganglien (Brittis et al., 1996).
- Die Expression des dominant-negativen FGFR in PC12-Zellen und primären Neuronen verhindert eine Reaktion von CAM auf das Axonwachstum (Saffell et al., 1997).
- Eine direkte Aktivierung des FGFR mit basischem FGF (FGF-2) imitiert die Reaktion auf CAM in nicht additiver Weise (Williams et al., 1994).
- EZDn von NCAM-Fc und L1-Fc stimulieren die Phosphorylierung des FGFR in PC12-Zellen (Saffell et al., 1997).
- Inhibierung des FGFR mit dem hoch spezifischen FGF-Rezeptor Antagonisten PD 17304 verursacht keine Stimulation des Axonwachstums durch N-Cadherin und auch nicht durch FGF oder wachstumsstimulierende Peptide (Williams et al., 2001).
- Inhibierung der PLC γ -Kaskade verhindert das durch CAM und FGF stimulierte Neuritenwachstum. Dies führt zu der Annahme, dass sowohl FGF als auch CAM die PLC γ -Signalkaskade benutzen (Doherty and Walsh, 1996).

4.5.3. Definition der CAM-Homologie-Domäne (CHD) und des CHD-Bindungsmotives

Eine mögliche Bindung zwischen FGFR-1 und CAM und den daraus resultierenden Folgen wie gerichtetes Neuritenwachstum und –regeneration wurde erstmals 1996 von Doherty und Walsh bei der Entdeckung der CAM-Homologie-Domäne (CAM-homology-domain = CHD) im FGFR vorgeschlagen. Die CHD konnte durch Einsatz zahlreicher Peptidinhibitoren und dominant negativem FGFR identifiziert werden. Sie befindet sich aminoterminal nach der „acid-box“, erstreckt sich über 20 Aminosäuren und ist als putative CAM-bindende Sequenz (Groth et al., 2002) sowohl innerhalb der verschiedenen FGF-Rezeptoren, als auch zu N-Cadherin, NCAM und L1 stark homolog (Williams et al., 1994; Mason, 1994). In der Annahme, dass HAV die homophile Cadherinadhesion vermittelt (siehe Punkt 3.2.3.), definierten Doherty und Walsh (1996) diese Aminosäuresequenz in FGF-Rezeptoren als CHD und stellten die These auf, dass diese Aminosäuresequenz an CAM bindet.

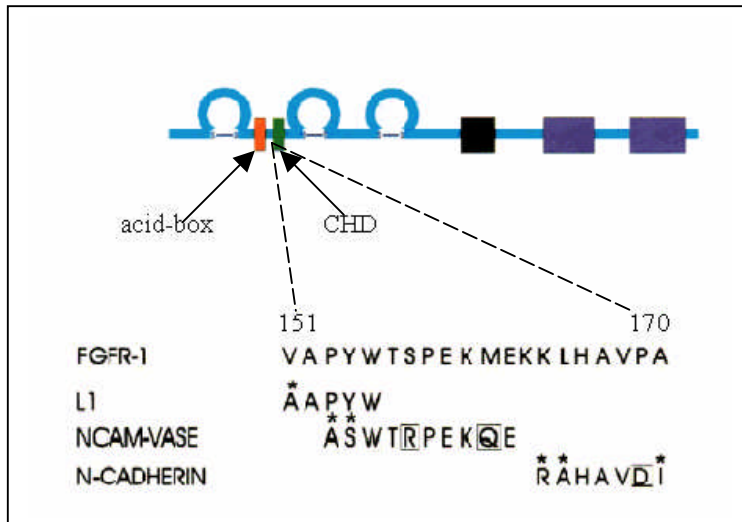


Abb. 15: Schematische Darstellung der CAM-Homologie-Domäne (CHD) im FGFR-1

Aminosäuresequenzvergleich in FGFR-1 (AS 151-170), L1, NCAM und N-Cadherin.

Die Sterne symbolisieren einen konservativen Aminosäureaustausch. Die eingerahmten Aminosäuren zeigen dagegen einen nicht konservativen Austausch (modifiziert nach Doherty et Walsh, 1996).

Genauere Beschreibung der Domänenstruktur von FGFR siehe Abb. 12.

Aus Strukturanalysen von Kristallen der EZD^I und EZD^{II} von N-Cadherin folgern Saphiro et al. (1995), dass die homophile Bindung in der EZD^I von N-Cadherin über die Aminosäuresequenz INSPISG direkt gegenüber dem HAV-Motiv eines zweiten N-Cadherin Moleküls liegt. Eine annähernd identische Sequenz IDPVNGQ befindet sich in der EZD^{IV} von N-Cadherin. Doherty und Walsh (1996) postulierten die Sequenz IDPVNGQ als CHD-Bindungsmotiv, das in trans-Position eine Bindung mit der HAV-Region eines benachbarten Cadherinmoleküls eingeht, die der CHD entspricht.

Sequenzanalysen zeigten, dass das hoch konservierte CHD-Bindungsmotiv mit einer Länge von 15 Aminosäuren außer in N-Cadherin auch in der ersten Fibronectin-Domäne von L1, im VASE Exon (variable alternatively spliced exon) der vierten Ig-ähnlichen Domäne von NCAM und allen vier FGFR zwischen der ersten und zweiten Ig-ähnlichen Domäne vorkommt (Doherty et al., 1992; Saffel et al, 1994).

Es ist anzunehmen, dass für die CHD und das CHD-Bindungsmotiv ursprünglich eine einzelne Sequenz vorlag, aus der die verschiedenen Sequenzen für FGFR, N-Cadherin, L1 und NCAM hervorgegangen sind (siehe Punkt 2.4.). Im Laufe der Evolution ist in Bezug auf das CHD-Bindungsmotiv in N-Cadherin der Aminoterminus (AS 2-8), hingegen in NCAM und L1 (AS 9-15) der Carboxyterminus am Besten erhalten geblieben (Brummendorf et al., 1995).

Peptide, die dem CHD-Bindungsmotiv entsprechen, sind in der Lage die durch NCAM, N-Cadherin und L1 verursachte Stimulation des Axonwachstums zu inhibieren. Dies bestätigt die Vermutung einer Wechselwirkung zwischen der CHD des FGFR und dem CHD-Bindungsmotiv der CAM. Mit Hilfe von Antikörpern wurde gezeigt, dass das CHD-Bindungsmotiv der CAM parallel an die CHD des FGFR bindet (Doherty et al., 1996).

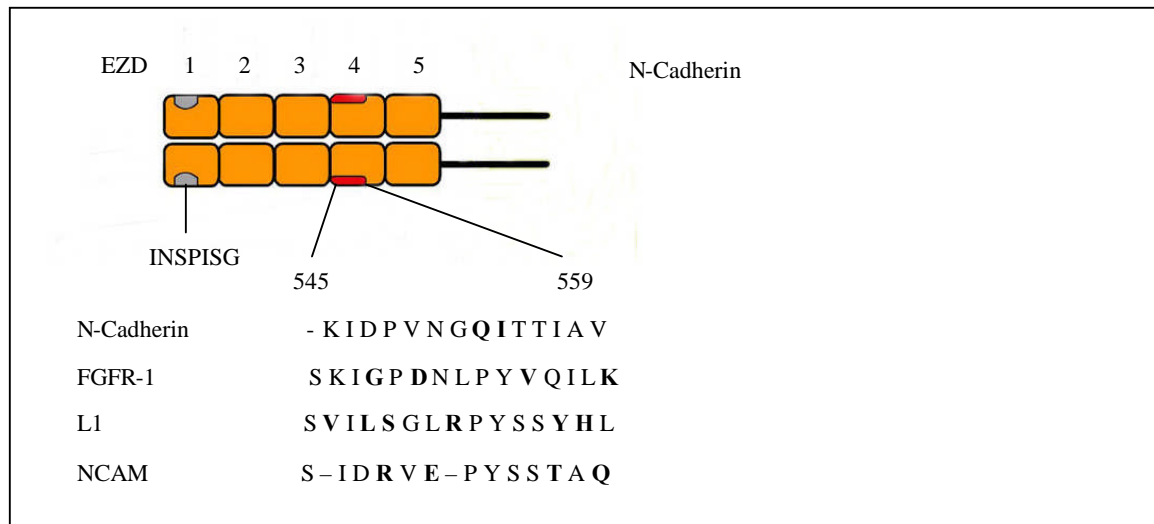


Abb. 16: Schematische Darstellung des CHD-Bindungsmotivs in den EZD von N-Cadherin (AS 545-559), FGFR-1, L1 und NCAM.

Die hochkonservierten Sequenzen werden als CHD-Bindungsmotiv bezeichnet und erstrecken sich über 15 Aminosäuren. Die Aminosäure I (Isoleucin) (AS 547) ist in jeder der vier CHD-Bindungsmotive konserviert, P (Prolin) und Y (Tryptophan) (AS 553, 554) in FGFR-1, L1 und NCAM. Die hervorgehobenen Aminosäuren zeigen einen nicht konservativen Austausch.

4.5.4. Hypothetisches Bindungsmodell über die Rolle von N-Cadherin bei der Aktivierung des FGFR

Aufgrund stereometrischer Daten lässt sich folgendes Bindungsmodell erstellen: N-Cadherin weist in der EZD 1 eine CHD mit der Aminosäuresequenz HAV und zwei nahezu identische CHD-Bindungsmotive auf: INSPISG in EZD 1 und IDPVNGQ in EZD 4.

Shapiro et al. (1995) konnten zeigen, dass die EZD 1 von N-Cadherin zwei verschiedene Kristalldimere bildet. Ein trans- und ein cis-Dimer. Die Aminosäuresequenz HAVDI bindet als CHD das CHD-Bindungsmotiv INSPISG und bildet durch reziproke Anordnung ein homophiles trans-Dimer. Williams et al. (2001) zeigte durch Verwendung von Antikörpern, dass die EZD 4 in N-Cadherin keine homophile Bindung, sondern eine cis-Interaktion mit dem FGFR eingeht.

Mutagenese- und Peptidstudien führten zu der Annahme, dass HAV im FGFR an Cadherine heterophil bindet. CAM könnten über das CHD-Bindungsmotiv mit der CHD des FGF-Rezeptors parallel binden (Doherty et al., 1996). Mit Hilfe von Peptidversuchen wurde geschlossen, dass Sequenzen am Aminoterminus von L1 und NCAM, sowie am Carboxyterminus von N-Cadherin eine Bindung an den FGFR vermitteln könnten (Williams et al, 1994; Doherty et al., 1995).

Cis-dimerisiertes N-Cadherin bindet homophil über die CHD HAV mit dem CHD-Bindungsmotiv INSPISG eines weiteren N-Cadherin cis-Dimers. Durch diese Trans-

4.5.5. Bindungsmodell zwischen FGFR und N-Cadherin nach Kamiguchi und Lemmon

Kamiguchi und Lemmon stellten 2000 ein neues Bindungsmodell vor. Sie untersuchten die dreidimensionale Struktur des N-Cadherin und FGF-Rezeptors und daraus resultierend die CHD. Die für die Bindung zu diskutierenden Aminosäuren Histidin und Valin des HAV-Motives ragen im Gegensatz zu Alanin aus der ersten EZD von N-Cadherin aus dem Molekül heraus (Tamura et al., 1998) und stehen daher als potentieller Bindungspartner zur Verfügung. Im Gegensatz dazu zeigt zwischen der ersten und zweiten Ig-ähnlichen Domäne des FGF-Rezeptors die Aminosäuren Histidin und Valin in das Molekül, während Alanin aus dem Molekül heraus ragt (Plotnikov et al., 1999, Kamiguchi et al., 2000).

Daher kann das HAV-Motiv für N-Cadherin, aber nicht für den FGF-Rezeptor als potentieller Bindungspartner diskutiert werden (Kamiguchi et al., 2000).

Weiterhin zeigen Kamiguchi und Lemmon (2000), dass L1 nicht wie FGF in der Lage ist, den FGF-Rezeptor zu dimerisieren und eine Signalkaskade auszulösen. Die für L1 zu diskutierende Bindungsregion AAPYW zeigt in das Molekül hinein (Bateman A, et al., 1996) und steht daher nicht als Bindungsmotiv für andere Proteine zur Verfügung (Kamiguchi et al., 2000).

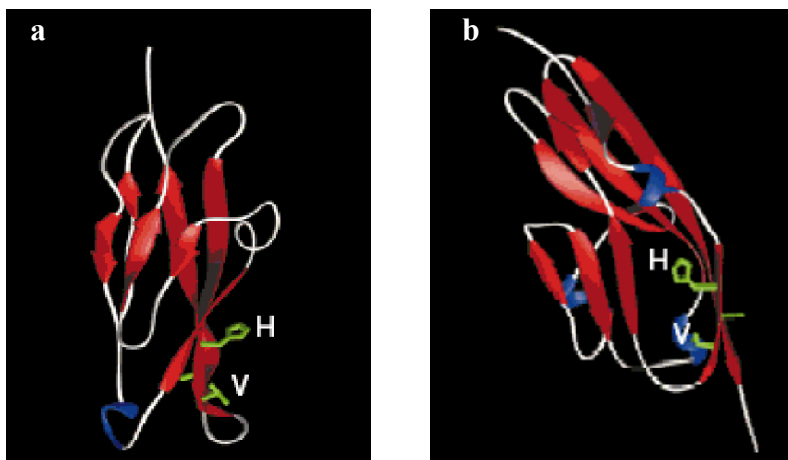


Abb. 18: Bändermodelle zur Strukturdarstellung des HAV-Motivs in N-Cadherin und FGFR-1

Die β -Faltblattstrukturen sind in rot und die α -Helixes in blau dargestellt.

a: Aus der ersten EZD von N-Cadherin ragen die Aminosäuren H und V (grün) heraus und ermöglichen eine homophile Bindung; A zeigt in das Molekül hinein.

b: In der zweiten EZD von FGFR-1 zeigen die Aminosäuren H und V (grün) der CHD in das Molekül hinein und stehen im Gegensatz zu a nicht für eine Bindung zur Verfügung.

(modifiziert nach Kamiguchi et Lemmon, 2000).

4.6. Signaltransduktion

Nach einer Ligandenbindung an den FGF-Rezeptor muss das Signal über die Plasmamembran in das Innere der Zelle gelangen, um über eine Signaltransduktionskaskade zu einer biologischen Antwort innerhalb der Zelle zu führen (Groth et al., 2002).

Der FGFR ist zunächst ein inaktives Monomer, das an das Oligomer HSPG-FGF bindet und daraufhin homodimerisiert (Schlessinger et al., 2000). Durch die Dimerisierung gelangen die zytoplasmatischen Domänen mit ihren Tyrosinkinasen in engen Kontakt, so dass eine gegenseitige Phosphorylierung der Tyrosinreste entlang der zytoplasmatischen Domänen stattfinden kann.

Als Substrate für die Phosphorylierung stehen sieben Tyrosin-Reste in der zytoplasmatischen Domäne des FGFR-1 zur Verfügung: Tyr⁴⁶³, Tyr⁵⁸³, Tyr⁵⁸⁵, Tyr⁶⁵³, Tyr⁶⁵⁴, Tyr⁷³⁰, Tyr⁷⁶⁶. Tyr⁶⁵³ und Tyr⁶⁵⁴ sind für die katalytische Aktivierung des aktivierten FGFRs und die Signaltransduktion wichtig (Mohammadi et al., 1996). Tyr⁷⁶⁶ ist für die Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) notwendig, da es die SH2-Domäne (Src-homology 2) der PLC γ bindet (Mohammadi et al., 1991).

Für FGFR werden zwei Signaltransduktionswege diskutiert: Signaltransduktion durch Phospholipase C γ (PLC γ) bzw. die Mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) Kaskade. Diese werden in Abhängigkeit des Rezeptors unterschiedlich stark aktiviert (Green et al., 1996).

4.6.1. Signaltransduktion durch Phospholipase C γ (PLC γ)

Die carboxyterminale Region des FGFR ist involviert in die PLC γ -Signalkaskade. Die SH2-Gruppe von PLC γ bindet an phosphoryliertes Tyr⁷⁶⁶ des FGFRs und löst damit die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP₂) zu Inositol-1, 4, 5- Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus (Forman-Kay et al., 1999; Dhalluin et al, 2000). IP₃ bewirkt eine Ca²⁺-Ionen-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Groth et al., 2002), während DAG die Proteinkinase C δ (PKC δ) aktiviert, aber auch über die DAG-Lipase zu Arachidonsäure umgebaut wird, die ein Öffnen der N- und L- Ca²⁺-Kanäle bewirkt (Doherty et al., 1994). Die einströmenden Ca²⁺-Ionen bleiben mit Hilfe von Membranpumpen auf dem Plasmalemmabereich beschränkt. Daher ist eine erhöhte Ca²⁺-Ionenkonzentration nur kurz unterhalb der Membranoberfläche und nicht im Inneren der Zelle messbar (Doherty et al., 2000).

Arachidonsäure kann als Sollwert das Axonwachstum positiv und negativ kontrollieren. In niedriger Konzentration bewirkt es über die Ca^{2+} -Kanäle ein verstärktes, in hoher ein vermindertes Axonwachstum (Huang et al., 1992).

Am Wachstumskegel des Axons befindliche Lamellipodien und Filopodien reagieren auf die lokale Veränderung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration sensitiv. Daher kommt es zur Ausbildung von neuen Filopodien (Lau et al., 1999) und einem zielgerichteten Axonwachstum (Zheng, 2000).

Die aktivierte Proteinkinase $\text{PKC}\delta$ ist in der Lage die MAP-Kinase-Signalkaskade unabhängig von Ras zu aktivieren, indem sie die Serin/Threonin-Kinase Raf durch Phosphorylierung aktiviert (Ueda et al., 1996). Die Aktivierung von $\text{PKC}\delta$ führt aber auch zu einem schnellen Wachstum der distalen Mikrotubuli in der F-Aktin-reichen peripheren Zone des Wachstumskegels. $\text{PKC}\delta$ kann daher als ein Regulator des Axonwachstums angesehen werden (Skaper et al., 2001).

Setzt man $\text{PLC}\gamma$ Inhibitoren ein, bleibt das Axonwachstum, das durch CAM und FGF verursacht wird, aus. Dies lässt den Rückschluß zu, daß diese Liganden den $\text{PLC}\gamma$ Signalweg gemeinsam benutzen.

FGF, L1, N-Cadherin und NCAM bewirken die Stimulation des gerichteten Axonwachstums nicht nur über $\text{PLC}\gamma$, sondern auch über die Aktivierung von Ras/MAPK-Signalkaskade (Kolkova K., et al., 2000).

4.6.2. Signaltransduktion durch Ras/MAPK (Mitogen activated protein kinase)

Die Ras/MAPK-Signaltransduktion ist eine andere wichtige Signalkaskade, die durch die Aktivierung des FGFR-1 verursacht wird (Groth et al., 2002).

Die Rezeptordimerisierung führt zu einer Interaktion der Aminosäuren 407-433 in der juxtamembranären Region des FGFRs mit dem EGF-Rezeptor Substrat 2 α (FRS2 α) (Kouhara et al., 1997). FRS2 α wird daraufhin durch Phosphorylierung aktiviert, interagiert mit Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2; Wachstumsfaktorrezeptor-gebundenes Protein 2) und letzteres anschließend mit Sos (engl.: son of sevenless). Die daraufhin erzielte Bindung von Sos an RAS bewirkt dessen Konformationsänderung, die zu einem Austausch von GDP gegen GTP führt. RAS-GTP aktiviert die Serin/Threonin-Kinasen RAF, MEK und die MAP-Kinase ERK. Diese transloziert in den Zellkern und erreicht über Phosphorylierung von Mitgliedern der Ets-Familie die Aktivierung der Promotorregion und damit die Transkription von verschiedenen durch FGF gesteuerte Gene (Sternberg and Alberola-Ila, 1998). Die Aktivierung der RAS/MAPK-Signalkaskade wirkt auf die Transkription und somit auf

Proteine, die eine Proliferation, Differenzierung und Wachstum bewirken können (Thisse et al., 2005).

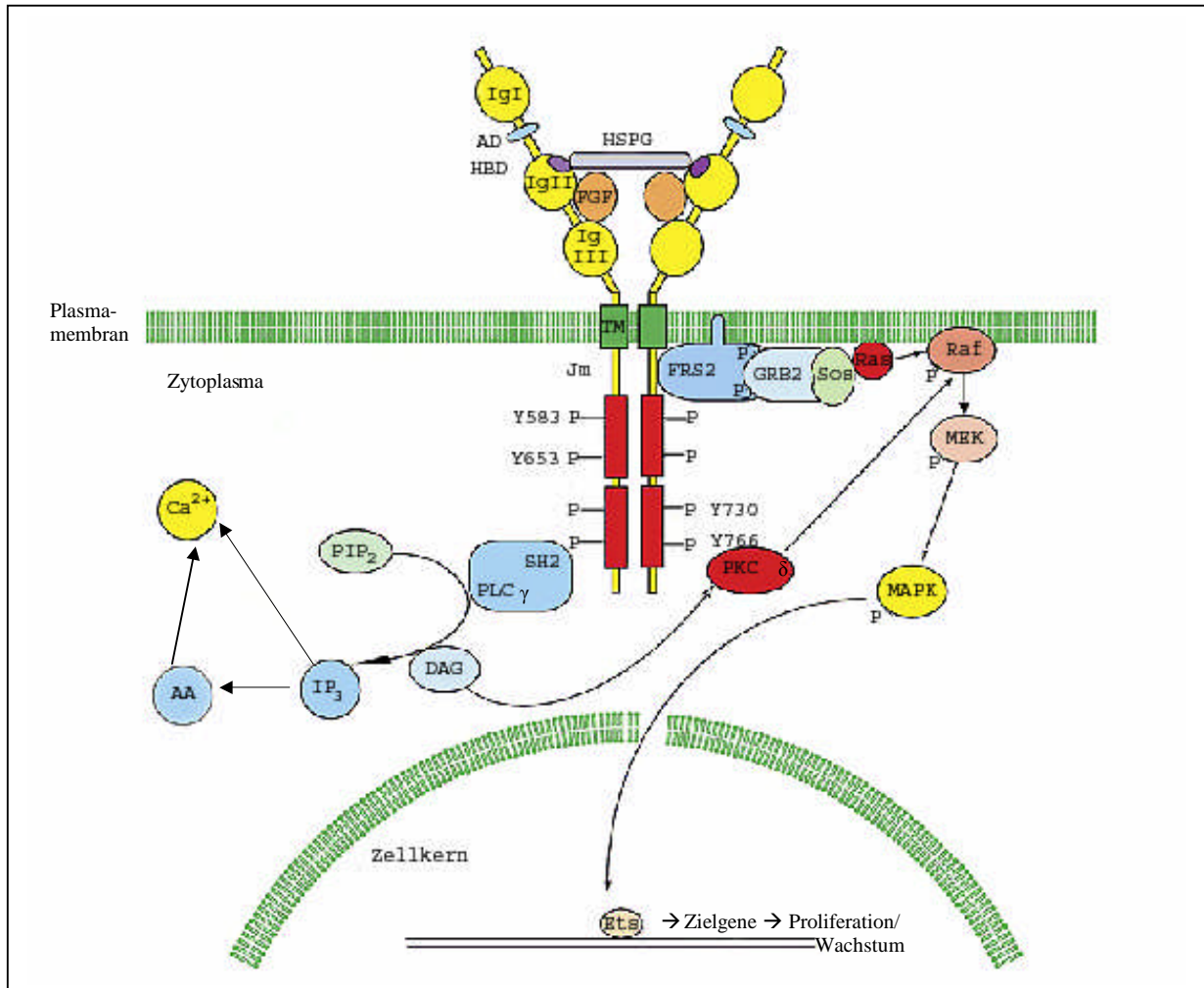


Abb. 19: Schematische Darstellung der Signaltransduktionskaskade ausgelöst durch die Aktivierung des FGF-Rezeptors mit Hilfe von FGF.

Der FGFR kann extrazellulär in die drei Ig-ähnlichen Domänen Ig I, II und III untergliedert werden. Ig I und II werden durch die acid-box (AD) getrennt. Auf die Ig III folgt eine einzelne Transmembran-(TM), eine Juxtamembran-(Jm) und zwei Kinase-Domänen (KD), die von einer Interkinase-Domäne (IKD) unterbrochen werden. FGF ist an HSPG gebunden. Dieses dimerisiert über HSPG die FGFRen und führt über eine Phosphorylierung spezifischer Tyrosine zur Auslösung von zwei unterschiedlichen Signalkaskaden: PLC γ und Ras/MAP-Kinase.

Die Phosphorylierungsstellen sind durch P gekennzeichnet. (modifiziert nach Thisse, 2005).

4.6.3. Diskussion der Signalkaskaden

FGF, NGF, N-Cadherin, NCAM, L1 und Laminin sind über Vermittlung des MAP-Kinase-Weges in der Lage ein Axonwachstum zu verursachen (Kolkova K. et al., 2000; Schmid RF et al., 2000; Perron JC et al., 1999; Dimitropoulou A. et al., 2000). Durch den Einsatz des Dominant negativen FGF-Rezeptors (DnFGFR) kann ein durch CAM ausgelöstes Axonwachstum von Nervenzellen verhindert werden.

In zahlreichen Studien mit Peptidinhibitoren und unterschiedlichen pharmakologischen Reagenzien konnten PLC γ , DAG-Lipase und Ca²⁺-Kanäle als wichtig für das durch CAM verursachte Axonwachstum ermittelt werden. Doherty und Walsh schlugen (1996) vor, dass der FGFR mit L1, NCAM und N-Cadherin interagiert, aber nicht mit anderen CAM oder Integrinen.

Gemäß den Strukturmodellen von Kamiguchi und Lemmon (2000) binden CAM nicht über die CHD an den FGFR, sondern verursachen Signalkaskaden, die in der Signalgebung weiter distal liegen oder stimulieren andere Rezeptoren, die das Axonwachstum verursachen.

4.7. Verhinderung der Eigendimerisierung

Um eine Eigendimerisierung des FGFRs und eine daraus resultierende Signalkaskade zu vermeiden, werden folgende zwei Theorien diskutiert:

Kan et al. (1996) zeigten, dass zweiwertige Kationen und HSPG die Dimerisierung und folglich die Aktivierung des FGFRs verhindern können. Als verantwortliche Sequenz wurde der Bereich zwischen der Ig-ähnlichen Domäne II und III mit den Aminosäuren Glu¹⁶⁰ bis Lys¹⁷⁶ identifiziert. Dieser Effekt kann durch FGF aufgehoben werden.

Plotnikov et al. (1999) führten eine Alternative an: Die zwischen der ersten und zweiten Ig-ähnlichen Domäne liegende „acid-box“ interagiert mit der basischen Region der zweiten Ig-ähnlichen Domäne und verhindert eine Bindung zu HSPG. FGF kann die Inhibierung aufheben und eine FGFR-Dimerisierung mit anschließender Signalkaskade auslösen. Allerdings ist zu beachten, dass Isoformen, die keine „acid-box“ enthalten, keine Besonderheiten in ihrem Dimerisierungsverhalten zeigen.

5. Material

5. 1. Reagenzien und Versuchsmaterialien

Alle Chemikalien entsprachen dem höchst möglichen Reinheitsgrad und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acrylamid, reinst	Serva, Heidelberg
Acrylamidlösung, 40 %	Roth, Karlsruhe
Adenosin	Sigma, Deisenhofen
Agarose	GIBCO BRL, Eggenstein
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva, Heidelberg
AraC (Cytosine-arabinofuranoside/HCl)	Sigma, Deisenhofen
Aspartat	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Bacto-Trypton	GIB BRL, Eggenstein
Bacto-Yeast	Applicam, Damstadt
BME-Medium	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	BD Biosciences, Heidelberg
Bovine FGF basic	R & D, Wiesbaden
Bradford-Reagenz	Roth, Karlsruhe
BSA (Bovine Serum Albumin) (Rinderserumalbumin)	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
Cytidin	Sigma, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
DTT (Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
DMP (Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid)	Pierce, Rockford
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
D-Glukose	Applicam, Damstadt
λ-DNA Eco 911	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	Sigma, Deisenhofen
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf-Hamburg
EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe

Essentielle Aminosäuren (100 x)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fc Fragment ChromPure Human IgG	Dianova, Hamburg
FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin
FCS Ig reduziert	Biochrom, Berlin
Genitacin (G418)	PAA, Cölbe
GeneRuler™ 1000bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Gentamycinsulfat	Sigma, Deisenhofen
Glukose	AppliChem, Darmstadt
Glutamat	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Guanosin	Sigma, Deisenhofen
HBSS (Hanks gepufferte Salzmischung)	AppliChem, Darmstadt
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Applicam, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Applicam, Darmstadt
Kanamycin	ICN Biomedicals Inc, Aurora
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol, reinst	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	privat
Natriumacetat	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
NGS (Normal goat serum)	Sigma, Deisenhofen
Biotin	Pierce, Rockford
NPG (N-propyl-gallat)	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	AppliChem, Darmstadt
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Serva, Heidelberg
TEMED (N',N',N',N',-Tetramethylethylen-diamin)	Roth, Karlsruhe
Penicillin	Sigma, Deisenhofen

Peptide	Davids, Regensburg
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Proteaseinhibitoren (Aprotinin; Leupeptin, Pepstatin)	AppliChem, Darmstadt
Protein- A-Mikroperlen	Dynaol, Oslo
Protein-A Agarose	Oncogene, Darmstadt
Rotiphenol	Carl Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
Thymidin	Sigma, Deisenhofen
Tris	AppliChem, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-Inhibitor	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Merck, Darmstadt
Uridin	Sigma, Deisenhofen

5.2. Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Zellutrans; Roth Karlsruhe
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
ELISA; 96 well Platte	Nunc, Dänemark
Fotolaborchemikalien	Kodak, Paris
Frischhaltefolie	Dow, Midland
Gasflammer	Gasi; Schütt, Göttingen
Gel Blotting Filterpapier	Whatman, Middlesex
Glaswaren	Schott, Wertheim
Handschuhe	Kimberly-Clark, Mainz
Kryoröhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Mäuse 129S1/svImJ	Charles River, Welmington
Nitrylhandschuhe	Ansell Protective Products, Coshocton
Nitrocellulosemembran	Amersham, Braunschweig
Papier	Kimwipes; Kimberly-Clark, Mainz
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Menasha

Petrischalen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Plastikpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikreaktionsgefäße (div. Größen)	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhrchen (div. Größen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Polaroidfilme	Polaroid, Enschede
Protein-A-Mikroperlen	Dynal, Oslo
Protein-A-Agarose	Oncogene, Darmstadt
Fritten	Mo Bi Tec, Göttingen
Spritzen	B Braun, Melsungen
Röntgenfilme	Amersham Biosciences, Buckinghamshire
Sterilfilter	Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (T25, T75) und Platten (96 well, 12 well, 6 well, Petrischalen)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

5.3. Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav, Oberschleißheim
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Blot-Kammer	Sigma, Deisenhofen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Digitalkamera	Powershot A75, Canon, Tokio
Elektrophoresekammern für	Spezialanfertigung der Fa.
Polyacrylamid-Minigele	Noras, Würzburg
FACS (Fluorescence activated cell sorter)	Digital vantage, Becton
Feinwaage AB 104	Dickinson, Heidelberg
Folienschweißgerät	METTLER TOLDEO GmbH, Gießen
Gefrierschrank	handelsübliche Haushaltsware
Gelkammern	Heraeus, Hanau
	GIBCO BRL, Keutz

Heizwasserbad	Haake Messtechnik, Karlsruhe
Kühlzentrifuge, Model J2-21	Beckman, München (JA-17/JS-13 Rotor)
Kühlwasserbad	Lauda, Lauda
Magnetrührer	Janke & Kunkel, Staufen
Mikrowelle	Moulinex, Leipzig
Mikroskope:	
• Fluoreszenz-Mikroskop	Axioskop 2 mot plus; Zeiss Hamburg
• Konfokales UV Laserscanning- mikroskop (Zeiss LSM 510)	Zeiss, Hamburg
Netzgeräte	GIBCO BRL, Keutz
PCR-Thermocycler	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Hanna-Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	LKB Biochrom Ultraspec II; Pharmacia Biosystems, Freiburg
Schüttler	Unimax 2010; Heidolph, Schwabach
Spektrophotometer	LKB bromma, Muskegon
Sterilisator	Heraeus, Hanau
Thermoblock	Liebisch, Bielefeld
UV-Tisch mit UV-Kontaktlampe	Vetter GmbH, Wiesloch Chroma 43 (Mittelwelle 302)
Vakuumsaugpumpe	Heinse Ziller, Würzburg
Vortex-Gerät	Bender & Hobein AG, Zürich
Vakoklav Dampfsterilisator Typ 500	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Waage	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen/Rotoren	Tischzentrifuge 5415C; Eppendorf, Hamburg 5804 R; Eppendorf, Hamburg SorvallRC5B und SorvallRC5B Plus mit Rotoren GSA und SS-34;

L-80 Ultrazenrtifuge mit Rotoren;
Beckmann, München
SW 55 Ti und 50.2 Ti

5.4. Stammlösungen

Verwendete Endkonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
Aprotinin	100 µl/100 ml
Bromphenolblau	400 µl/20 ml
Ethidiumbromid	1 µg/ml
Genitacin, G 418	1,2 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Leupeptin	50 µl/100 ml
NHS-Biotin	1:10 molarer Überschuß zum biotinylierenden Protein
p-Nitrophenylphosphat	48 µl/12 ml
Penicillin	50 U/l
Pepstatin	70 µl/100 ml
Streptomycin	50 U/l

Stammlösung:

100 mg/ml in Aqua dem. steril filtriert
1 mg/ml in Aqua dem. steril filtriert
10 mg/ml
10 mg/ml
50 µg/ml
50 mg/ml in Aqua dem. steril filtriert
1 mg/ml in Aqua dem. steril filtriert
10 mg/ml DMSO
1 mg/ml Aqua dem.
12,87 g/ml in PBS, pH 5,5
1 mg/ml DMSO
6,01 g/ml in PBS, pH 5,5

Die Ethidiumbromidlösung wurde bei +4°C, die übrigen Lösungen bei – 20°C gelagert.

Die Zugabe der Antibiotika erfolgte jeweils nach dem Autoklavieren und Abkühlen des LB-Mediums, beim Giessen der Agarplatten oder Sterilfiltrieren des Zellkulturmediums.

5.5. Puffer und Lösungen

Häufig verwendete Puffer und Lösungen, die selbst angesetzt wurden:

Agaroselösung: 0,8 % Agarose in 1 x TBE aufkochen	BSA/NGS: 3 % BSA 1 % NGS in PBS
Blotpuffer: 25 mM Tris/HCl 195 mM Glycin 20 % Methanol 0,1 % SDS in Aqua dem.	Coomassie-Lösung: 2,5 g Coomassie Brilliant Blau G 250 454 ml Isopropanol 92 ml Eisessig Aqua dem. ad 1 l
Coumarinsäure: 90 mM Coumarinsäure in DMSO	Dig 3 - Puffer 12,11 g Tris 5,84 g NaCl ad 1 l Aqua dem. pH 9,5 einstellen und autoklavieren
DNA-Auftragspuffer: 30 % Glycerin 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol LM: Ampuwa	ECL-Lösung I: 1 mL Luminol 0,44 ml Coumarinsäure 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 Aqua dem. ad 100 ml
ECL-Lösung II: 64 µl 30 % H ₂ O ₂ 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5 Aqua dem. ad 100 ml	Elektrophoresepuffer 5x: 10 g SDS 144 g Glycin 30 g Tris/HCl H ₂ O ad 2 l Vor Gebrauch mit Aqua dem. 1:5 verdünnen
F-Marker (λ-Phagenmarker) 10 µl λ-DNA Eco 911 160 µl TE 15 µl DNA-Auftragspuffer (6x) in 5 µl portionieren	Formalin: 2 g Paraformaldehyd 100 ml PBS pH 8, erwärmen bis die Lösung klar ist (max. 3 Wochen lang verwendbar)
Lysis-Puffer: 6,9 g NaH ₂ PO ₄ 17,54 g NaCl 0,68 g Imidazol ad 1 l Aqua dem. pH 8	Luminol : 250 mM 3-Aminophtalhydrazid in DMSO
NPG: 60 % Glycerin in PBS 1,5 % N-Propylgallat	5 x PBS: 400,3 g NaCl 10 g KCl 65,3 g Na ₂ HPO ₄ Aqua dem. ad 10 l Vor Gebrauch mit Aqua dem. 1:5 verdünnen
PBS-Tween: 1,0 g Tween 20 1 l PBS	Ponceau-Lösung: 5 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure Aqua dem. ad 1 l

Ponceau-Lösung: 5 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure Aqua dem. ad 1 l	3 x Probenpuffer (für Proteine): 0,454 g Tris 1,2 g SDS 7,56 g Glycerin, pH 6,0 400 µl Bromphenolblau Aqua dem. ad 20 ml ± 30 mg DTT
6 x Probenpuffer (für DNA): 0,2 ml 100 mM EDTA, pH 8,0 10 g Glycerin 30 mg Bromphenolblau 50 mg Xylencyanol Ampuwa ad 20 ml	SDS-Sammelgel: 3,1 ml Aqua dem. 0,6 ml 30 % Acrylamid 1,3 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 50 µl 10 % SDS 15 µl APS 7,4 µl TEMED
SDS-Trenngel 7,5%: 4,05 ml Aqua dem. 3,35 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 Tris/HCl, pH 8,8 100 µl 10 % SDS 30 µl APS 15 µl TEMED	SDS-Trenngel 10 %: 4,05 ml Aqua dem. 3,35 ml 30 % Acrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,1 ml SDS (10 %) 60 µl APS 30 µl TEMED
SLL-Marker: 30 µl GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder 60 µl TE 20 µl DNA-Auftragspuffer (6x) in 3 µl portionieren	10 x TBE: 50 mM Tris/HCl 50 mM Borsäure 2,5 mM EDTA LM: Aqua dem.
TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA pH 8,0 in Aqua dem.	Trypsin: 0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS

NCAM-Mix:

100 mM Natriumpyruvat LM: Ampuwa
600 mg Glutamat
600 mg Aspartat
ad 100 ml Ampuwa
70 mg Adenosin
70 mg Guanosin
70 mg Cytidin
70 mg Uridin
24 mg Thymidin
ad 200 ml Ampuwa

Die einzelnen Lösungen des NCAM-Mix wurden zusammengegeben, sterilfiltriert, zu jeweils 20 ml portioniert, bei -20 °C tiefgefroren, bei Bedarf aufgetaut und dem geeigneten Medium zugefügt.

Lösungen für Körnerzellpräparation

Die angegebenen Reagentien wurden im entsprechenden Lösungsmittel gelöst und ihre Sterilität durch Filtration mittels eines Rotrandfilters (Porendurchmesser 0,2µm) erreicht. Die Lösungen wurden wie folgt hergestellt und bei -20°C eingefroren – Ausnahme bei Medium: 4°C:

<p><u>AcaC (Cytosine-arabinofuranoside/HCl):</u> AraC 1,4 mg Kaliumchlorid-Lösung 80 µl BME-Medium ad 5ml Portioniert je 500 µl</p>	<p><u>Calciumchlorid-Lösung:</u> Calciumchlorid x 2 H₂O 0,16 g Ampuwa ad 10 ml Portioniert je 1 ml</p>
<p><u>Gentamycin-Lösung:</u> Gentamycinsulfat 100 mg Ampuwa ad 10 ml Portioniert je 1 ml</p>	<p><u>Glutamin:</u> 200 mM in Ampuwa</p>
<p><u>Kaliumchlorid-Lösung:</u> Kaliumchlorid 0,9 g BME-Medium ad 10 ml Portioniert je 1 ml</p>	<p><u>Krebs-Ringer 10x:</u> Kaliumchlorid 0,373 g Natriumchlorid 7,013 g Kaliumdihydrogenphosphat 0,163 g Natriumhydrogencarbonat 2,1 g D-Glukose 2,523 g Phenolrot Spatelspitze Ampuwa ad 100 ml Portioniert in 30 ml Portionen</p>
<p><u>Lösung Calcium:</u> Magnesiumsulfat-Lösung 400 µl Calciumchlorid-Lösung 60 µl Lösung 1 50 ml Portioniert je 6 ml</p>	<p><u>Lösung 1:</u> Krebs-Lösung 10 x 30 ml BSA 0,9 g Magnesiumsulfat-Lösung 2,4 ml Ampuwa ad 300 ml Portioniert je 15 ml</p>
<p><u>Lösung Inhibitor:</u> DNase I 3,6 mg Trypsin Inhibitor 23,4 mg Magnesiumsulfat-Lösung 450 µl Lösung 1 45 ml Portioniert je 5 ml</p>	<p><u>Lösung T:</u> Trypsin 12,5 mg Lösung 1 50 ml Portioniert je 7 ml</p>
<p><u>Lösung verdünnt:</u> Lösung 1 42 ml Lösung Inhibitor 8 ml Portioniert je 7 ml</p>	<p><u>Medium:</u> FCS 2,5 ml Glutamin-Lösung 0,5 ml Gentamycin-Lösung 0,5 ml KCl-Lösung 0,4125 ml BME 43,2 ml</p>
<p><u>Magnesiumsulfat-Lösung:</u> Magnesiumsulfat x 7 H₂O 0,382 g Ampuwa ad 10 ml</p>	<p><u>Poly-L-Lysin:</u> Poly-L-Lysin 2 mg Ampuwa ad 200 ml Portioniert je 50 ml</p>

5.6. Molekulargewichtsstandards für DNA und Proteine

Um die Länge der DNA/Protein-Fragmente analysieren zu können, wurden geeignete Längenstandards mit definierten Fragmentlängen eingesetzt. Diese wurden parallel zur bestimmenden Probe aufgetragen. Während der Elektrophorese trennen sich die DNA/Protein-Moleküle und der Längenstandard auf. Die DNA/Protein-Fragmente können in ihrer Größe bestimmt werden.

Für kleine DNA-Fragmente (≤ 1000 bp) wurde der GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder, für größere Fragmente (≥ 1000 bp) der Eco 911 hydrolysierte Lambda-Phage-DNA-Marker verwendet. Als Marker, der sowohl große, als auch kleine Fragmente enthält, ist der Mass Ruler™ anzusehen.

- F-Marker (Lambda-Phage-DNA-Marker) in bp:

8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702

- Mass Ruler™ DNA Ladder, Mix, ready-to-use in bp:

5 μ l des Mengenstandards enthalten:

DNA-Größe (bp)	DNA-Menge (ng)	DNA-Größe (bp)	DNA-Menge (ng)
10000	50	2500	13
8000	40	2000	10
6000	30	1500	8
5000	25	1031	50
4000	20	900	45
3000	15	800	40

- PPL-Marker (Prestained protein ladder) in kDa

180, 130, 100, 73, 54, 50, 35, 24, 16, 10

- SLL-Marker (GeneRuler™ 1000 bp DNA Ladder) in bp:

1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

5.7. Gebrauchsfertige Systeme

DNA Extraktion Kit	Fermentas
Effectene™ Transfection Reagenz	Quiagen, Hilden
Expand High Fidelity™ PCR System	Roche, Mannheim
Fusion-Blue Competent Cells	Novagen, San Diego
In-Fusion™ Dry-Down PCR Cloning Kit	Clontech, Heidelberg
Nucleospin Plasmid Minipräp	Macherey Nagel, Düren
pGEM-T Vector System	Promega, Mannheim
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
Titan™ One Tube RT-PCR System	Boehringer, Mannheim

5.8. Enzyme und Substrate

ATP (0,25 ml, 100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP Set (4 x 25 µmol, 100mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
iProof High fidelity DNA-Polymerase	Biorad, Philadelphia
Pfu-Polymerase (2,5 u/µl, 100 u)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phusion™ DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt,a.M.
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNAse Inhibitor (40u/µl, 1.000u)	Boehringer, Mannheim
T4 DNA-Ligase (3u/µl, 100 u)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase (PNK) (10 u/µl, 500U)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

5.9. Medien und Platten für die Kultivierung von Bakterien

Die Medien wurden wie folgt hergestellt:

LB-Medium	10 g Casein-Hydrolysat (Bacto-Tryptone) 5 g Hefeextrakt (Bacto-Yeast) 10 g NaCl ad 1 l mit H ₂ O pH 7,5; autoklavieren
LB-Plattenmedium	wie LB-Medium, aber vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter Medium einwiegen; nach dem Autoklavieren abkühlen, nach Bedarf und entsprechend der Resistenz des eingesetzten Plasmids Antibiotikum zusetzen und gießen.

5.10. Bakterienstämme

Die DH5 α -Bakterien wurden von der Firma Invitrogen, Carlsbad bezogen und wiesen folgenden Genotyp auf: supE44 Δ lacU169 (Φ 80lacZ Δ M15) hsdR17recA1 endA1 gyrA96thi-1 relA1 (Hanahan, 1983).

5.11. Vektoren und Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Vektoren eingesetzt:

Vektor	Größe (bp)	Resistenz (pro-, eukaryontisch)
pDsRed Monomer-C1 (Clontech, Heidelberg)	4700	Kanamycin, Neomycin
pEGFP-N3 (Clontech, Heidelberg)	4700	Kanamycin, Neomycin
pEV Masayuki Amagai (KeloMedical School, Tokyo, Japan)	3000	Ampicillin
pGEMT® (Promega, Mannheim)	3003	Ampicillin

5.11.1. pDsRed-Monomer-C1-Vektor

Der pDsRed-Monomer-C1 ist ein eukaryontischer Expressionsvektor und kodiert für eine optimierte Variante des Wildtyp-DsRed, das eine helle Fluoreszenz und höhere Expression in Säugerzellen erzeugt (Anregungsmaximum = 558 nm; Emissionsmaximum = 585 nm).

In die MCS (Multiple Cloning Site) inserierte cDNA des pDsRed exprimiert das Fusionsprotein mit aminoterminalen DsRed. Da das Fluoreszenzsignal bereits 12-16 Stunden nach der Transfektion detektierbar ist, können transient transfizierte Zellen bereits nach diesem Zeitraum untersucht werden.

5.11.2. pEGFP-N3-Vektor

Der pEGFP-N3-Vektor ist ein eukaryontischer Expressionsvektor und kodiert für eine optimierte Variante des Wildtyp-GFPs, die eine helle Fluoreszenz und höhere Expression in Säugerzellen erzeugt (Anregungsmaximum = 488 nm; Emissionsmaximum = 507 nm).

In die MCS inserierte cDNA des pEGFP-N3 exprimiert das Fusionsprotein mit carboxyterminalem GFP. Durch die Neomycin-Resistenz wird eine stabile Expression des Fusionsproteins in eukaryontischen Zellen gewährleistet. Bei Proteinen, die für Bindungsstudien verwendet wurden, wurde die GFP-Translation durch ein davorgeschaltetes Stop-Codon verhindert.

5.11.3. pGEM-T®-Vektor

Der pGEM-T®-Vektor wurde zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten verwendet. Ihm liegt ein mit EcoR V geschnittener pGM®-5Zf(+)-Vektor zugrunde, an den 3`-terminal ein Thymidin (T) angehängt wurde. Die 3`-T Überhänge an den Schnittenden ermöglichen eine effektive Ligation des PCR-Produktes in den Vektor. Um dies zu gewährleisten, wurde für die Generierung der PCR-Produkte eine thermostabile Polymease verwendet, die ein Adenin an das 3`-Ende hinzufügt.

5.11.4. pEV-mod-Dsg-1 EZD^{I-V}-Fc-His

Als Plasmid wurde pEV-mod-Dsg-1-EZD^{I-V}-Fc-His verwendet. Es enthält ausgehend vom Aminoterminus die cDNA, die für die Dsg-1 (Desmoglein-1) EZDn, den Fc-Teil des humanen Ig G und die 6 Histidine kodiert.

Das Plasmid wurde freundlicher Weise von Professor Masayuki Amagai (KeloMedical School, Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt.

5.12. Oligonukleotide

Für die Amplifizierung und Sequenzierung wurden folgende Oligonukleotide von MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellt. Die Stammkonzentration betrug 100 pmol/µl.

5.12.1. Oligonukleotide für die DNA-Synthese

- FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His-pEV

FGFR-1-fwd	5´ cgagatctgcatgtggggctggaagtgc 3´
FGFR-1-rev	ggctcgagctccaggtagagcggtgag

- FGFR-1_(mut) EZD^{I-III}-Fc-His- pEGFP-N3

FGFR180-fwd	gtctctcctggtccacct
FGFR-1 _(mut) 550-fwd	gaccatgacgcgggcgctgccaagacggtgaag
FGFR-1 _(mut) 550-rev	gcccgctcatggtctttcttctccatttctctgg
FGFR-1 _(mut) 560-fwd	cgggcgctgccaagacggtgaag
FGFR-1 _(mut) 560-rev	cgctatggtctttcttctccatttctctggg
FGFR1129-rev	ccagaacggtcaacctgca

- FGFR-1-DsRed

FGFR-1-DsRed-fwd	cgctagcgcctaccgggcatgtggggctggaagtgc
FGFR-1-DsRed-rev	catggtggcgaccgggcgccgtttgagtcactgttg

- Fc-His-pEGFP-N3
 - Fc-fw gcgctaccggactcagatctccgcatggagc
 - ccaaatcttgacaaaac
 - Fc-rev gatcccgggcccgcggtacctca
- N-Cad-EZD^{I-III}-Fc-His- pEGFP-N3
 - N-Cad-EZD^{I-III}-Fc-His-fw cgagatctccgcatgtcgcggatagcggga
 - N-Cad-EZD^{I-III}-Fc-His-rev ggctcgagaataactgtcacagacacagt
- N-Cad-EZD^{I-V}-Fc-His-pEGFP N3
 - N-Cad-EZD^{I-V}-fw cgagatctccgcatgtcgcggatagcggga
 - N-Cad-EZD^{I-V}-rev ggctcgagcctgtccacgtccgtgcagtc
- N-Cad-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His-pEGFR-N3
 - N-Cad-EZD^{I-III}-L^{III}-fw gcgctaccggactcagatctcc
 - N-Cad-EZD^{I-III}-L^{III}-rev acaggtctccgcctcaggatttggggcaaaataagg
 - N-Cad-EZD^V-fw gaggcggagacctgtgaaactcc
 - N-Cad-EZD^V-rev cgttgtcattgatatacaaaactttcacacgcagg
 - N-Cad-EZD^V-rev (neu) ccctcaggtgttacctcaagagg
 - N-Cad-EZ-L^{IV}-V-L^V-Fc-fw tgatatcaatgacaacgcc
 - N-Cad-EZD^V-L^{IV+V}-Fc-rev ccgggcccgcggtacctcaatg
- N-Cad-pEGFP-N3
 - N-Cad-pEGFP-N3-fw cgcgggccccgggatcgccatgtgccgatagcgggagc
 - N-Cad-pEGFP-N3-rev tggtggc gatggatccgtcgtcaccaccgccgtac

5.12.2. Oligonukleotide für die DNA-Sequenzierung

- Fc-His-pEGFP-N3
 - pEGFP-N3-fw Standardprimer von MWG
 - pEGFP-N3-rev Standardprimer von MWG
- FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His-pEV
 - Fc844-rev gagttcaggtgctgggcac
 - Vector-fw gccattgtaatgagacgcac
- FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His-pEGFP-N3
 - FGFR-1-1001-fw gagttaataccaccgac
 - Fc844-rev gagttcaggtgctgggcac
 - pEGFP-N3-fw Standardprimer von MWG
 - pEGFP-N3-rev Standardprimer von MWG

- FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His-pEGFP-N3

FGFR180-fwd	gtctctcctggccacct
Fc844-rev	gagttcaggtgctgggcac
FGFR866-fwd	gcagcaatgtggagttc
FGFR1001-fwd	gagttaataaccaccgac
pEGFP-N3-fwd	Standardprimer von MWG
pEGFP-N3-rev	Standardprimer von MWG
- FGFR-1_(mut) EZD^{I-III}-Fc-His-pEGFP-N3 (RT-PCR)

FGFR1-fwd	cgagatctgcatgtggggctggaagtgc
FGFR1-rev	ggctcgagctccaggtagagcggtag
- FGFR-DsRed

DsRed-Mono-fwd	ggggggaggtctatataagc
DsRed-Mono-rev	cctcgatctcgaagtagtgg
- N-Cad-EZD^{I-III}-Fc-His-pEGFP-N3

Fc844-rev	gagttcaggtgctgggcac
N-Cad1097-fwd	caatgttattgacatgaatg
N-Cad1799-rev	ggctcgagaataactgtcacagacacagt
pEGFP-N3-fwd	Standardprimer von MWG
pEGFP-N3-rev	Standardprimer von MWG
- N-Cad-EZD^{I-V}-Fc-His-pEGFP-N3

Fc844-rev	gagttcaggtgctgggcac
N-Cad-EZD ^{I-V} -rev	ggctcgagcctgtccacgtc cgt gca gtc
N-Cad2294-fwd	caaccggcttaatggtg
pEGFP-N3-fwd	Standardprimer von MWG
pEGFP-N3-rev	Standardprimer von MWG
- N-Cad-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His-pEGFP-N3

Fc844-rev	gagttcaggtgctgggcac
N-Cad1484-fwd	caagtgccattagctaaagg
N-Cad2025-rev	taagggaagatcaaacgcg
pEGFP-N3-fwd	Standardprimer von MWG
pEGFP-N3-rev	Standardprimer von MWG
- N-Cad-pEGFP-N3

pEGFP-N3-fwd	Standardprimer von MWG
pEGFP-N3-rev	Standardprimer von MWG

- pEGMT Zwischenklonierungen

pEGMT-199-rev

gtgaggataacaatttc

pEGMT-2912-fwd

gcaaggcgattaagttgg

5.12.3. Auskunft und Bezeichnung verwendeter cDNAs

In dieser Arbeit verwendete Vektoren kodierten für folgende cDNA-Sequenzen:

- Cadherin-2-mRNA (Maus), vollständige cDNA: BC022107
- Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor-1-mRNA (Maus), lange Isoform, vollständige cDNA: U22324
- Immunglobulin schwere Kette mRNA (Mensch), vollständige cDNA: BC041037

5.13. Antikörper

Folgende Antikörper wurden verwendet:

5.13.1. Primärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Antigen	Typ	Herkunft	Western-blot	Fluoreszenz
a-chicken N-Cadherin	R&D, Wiesbaden	N-Cadherin	monoklonal	Ratte	1:1000	
a-N-Cadherin	David Colman, USA	N-Cadherin	polyklonal	Kaninchen		1:100
a-Fibroblast-Growth-Factor-Receptor-1 (FGFR-1)	Sigma, Deisenhofen	FGFR-1	polyklonal	Kaninchen	1:1000	
a-tau	Sigma, Deisenhofen	tau	polyklonal	Kaninchen		1:100
a- β -tubulin	Sigma, Deisenhofen	tubulin	monoklonal	Maus		1 :100

5.13.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Quelle	Markierung	Westernblot	Fluoreszenz	Elisa
Ziege-anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg	Peroxidase/Cy ₃	1:3000	1:600	
Ziege-anti-Maus	Dianova, Hamburg	Peroxidase/Cy ₃		1:600	
Ziege-anti-Mensch Fc γ Fragment	Dianova, Hamburg	Peroxidase/Cy ₃ Alkalische Phosphatase	1:10000	1:600	1:1500
Ziege-anti-Ratte	Dianova, Hamburg	Peroxidase/Cy ₃	1:3000		

5.13.3. Biotinbindendes Protein

Bezeichnung	Quelle	Markierung	Westernblot
Streptavidin	Dianova, Hamburg	Alkalische Phosphatase	1:1500

5.14. Analyseprogramme

Folgende Internetseiten wurden zur Literatursuche und Analyse von Nukleotidsequenzen verwendet:

MWG (<https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl>)

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

BLAST 2 sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>)

ExpASy translate tool (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>).

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=Limits&DB=PubMed>)

5.15. Statistik

Eine statistische Auswertung war bei der Untersuchung des Axonwachstums von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe von verschiedenen Kalium-, FCS-, Protein- und Peptidkonzentrationen notwendig. Mit Hilfe des Programms Spot-Advances wurden die Axone vermessen. Anschließend erfolgte über Microsoft ExcelTM die Berechnung folgender Werte:

- Mittelwert
- Standardabweichung
- Standardabweichung des Mittelwertes
- statistische Signifikanz ($p < 0,05$)

6. Methoden

6.1. Molekularbiologie

6.1.1. Bakterien

6.1.1.1. Bakterienkulturen und Plattenkulturen von Bakterien

In der Mikrowelle wurde fester LB Agar vorsichtig durch Aufkochen verflüssigt und anschließend zum Abkühlen in ein 50° C warmes Wasserbad gestellt. Nach Zufügen des Antibiotikums wurde der LB Agar in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gegossen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung der Platten erfolgte in Plastiktüten eingepackt bei 4°C. Plattenkulturen ermöglichten die Isolation von Einzelkolonien, die zur Animpfung von Flüssigkulturen dienten. Einzelklone erhielt man entweder durch fraktioniertes Ausstreichen einer Flüssigkultur oder aus einer Glycerinkultur. Die ausgestrichenen Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Bei Bedarf wurden so erhaltene Einzelklone mit einem Zahnstocher isoliert und in 5 ml einer Flüssigkultur vermehrt. Um die beimpften Platten vor Pilz- und Bakterienbefall zu schützen wurden sie mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

6.1.1.2. Flüssigkulturen von Bakterien

Flüssigkulturen wurden durch Übertragung einer Einzelkolonie mit Hilfe einer Impföse oder eines Zahnstochers in 5 ml LB-Medium angesetzt und in Abhängigkeit der Resistenz des Plasmides mit dem entsprechenden Antibiotikum versehen. Die Kleinkultur wurde über Nacht bei 37°C auf einem Drehrad in sterilen Reagenzgläsern inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie zur Gewinnung von Plasmid-DNA verwendet.

6.1.1.3. Lagerung von Bakterien

Um Bakterien langfristig zu lagern, wurden Glycerinkulturen angelegt. 1 ml Flüssigkultur wurde mit 250 µl autoklaviertem Glycerin 85 % (V/V) in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte bei –80°C.

6.1.2. Methoden zum Umgang mit DNA

6.1.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Um die DNA entsprechend ihrer Fragmentgröße auftrennen zu können, verwendet man als Standardmethode die Gelelektrophorese (Johnson, 1977). Aufgrund der negativen Ladung der Phosphatreste wandern die Nukleinsäuren bei alkalischem pH in einem elektrischen Feld zur Anode. Da die Fragmente in Abhängigkeit zu ihrer Größe unterschiedliche Strecken gleichzeitig zurücklegen, ist eine Auftrennung möglich. Zusätzlich wird elektrophoretisch wandernde DNA von Verunreinigungen (Proteine und Salze) befreit. Dies ermöglicht eine bessere Ausgangsbedingung für die weitere Verarbeitung solcher DNA-Fragmente in daran anschließenden Reaktionen wie Ligationen, Restriktionen und Amplifikationen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer 0,8 und 1,5 %igen Agarose-Lösung gearbeitet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1 x TBE Puffer gelöst, auf ca. 50°C abgekühlt und im Wärmeschrank gelagert, um ein Erstarren der Lösung zu verhindern. In einem Gelschlitten mit Probenkamm wurde die Agarose gegossen, nach ihrem Erstarren der Kamm entfernt und der Schlitten in eine mit 1 x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis von 1: 6 mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Durch das Glycerin erhöht sich die Dichte der Probe, die so auf den Boden der Tasche sinkt. Die in der Probe erhaltenen Farbstoffe (Bromphenolblau und Xylencyanol) ermöglicht es, die Laufstrecke der DNA grob abzuschätzen. Entsprechend der Fragmentgröße der aufzutrennenden DNA wurde ein Größenmarker (F-/SLL-Marker) aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug zu Beginn 80 V und konnte bis zu 120 V gesteigert werden.

Zum Sichtbarmachen der DNA wurden die Gele in eine Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml Aqua dest.) gegeben. Ethidiumbromid bindet an die DNA, absorbiert UV-Licht bei 302-366 nm und emittiert Licht im orangen Bereich (590 nm). Die Intensität des emittierten Lichtes ist direkt proportional zu der DNA-Menge. Daher kann mit Hilfe eines geeigneten Mengenmarkers die DNA-Menge durch Vergleich der Banden mit Banden bekannter Konstrukte grob abgeschätzt werden (siehe Punkt 5.6.).

Das Gel wurde daher auf einen UV-Transilluminator gelegt, fotografiert und DNA-Banden gegebenenfalls ausgeschnitten und daran anschließend aus dem Gel eluiert (siehe Punkt 6.1.2.3.).

6.1.2.2. Plasmid-Minpräparation

Die Plasmid-Minpräparation wurden mit Hilfe des Fertigkits Nucleospin Marchery-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Je 2 ml einer 5 ml Übernachtskultur wurden in einem Eppendorf-Gefäß bei 11000 x g 30 sek lang zentrifugiert. Das am Boden des Gefäßes gebildete Bakteriensediment wurde mit 250 µl der Lösung A 1 resuspendiert. Zu der gesammelten Bakteriensuspension wurden 250 µl Lösung A2 zugesetzt und vorsichtig durch invertieren gemischt, um die Bakterien alkalisch zu lysieren. Diese Lyse durfte fünf Minuten nicht überschreiten und wurde durch Zugabe von 300 µl Lösung A3 terminiert. Durch diese pH-Neutralisierung entstand ein weißer Niederschlag aus Proteinpräzipitaten, chromosomaler DNA und anderen Zellbestandteilen. Die anschließende Zentrifugation bei 11000 x g für 10 min trennte das Präzipitat von der DNA-haltigen Lösung. Der Überstand wurde in ein NucleoSpin Plasmid Gefäß überführt, das in ein 2 ml Auffanggefäß platziert worden war. Bei der anschließenden Zentrifugation (1 min, 11000 x g) wurde die DNA an das silicathaltige Säulenmaterial gebunden und der dabei entstehende Durchfluß verworfen. Das Säulenmaterial wurde mit 500 µl auf 50°C erhitzte Lösung AW und 600 µl Lösung A4 gewaschen und jeweils 1 min bei 11000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial durch eine weitere Zentrifugation von 2 min und 11000 x getrocknet. Um die DNA zu eluieren, wurden 50 µl autoklaviertes Ampuwa auf die Säule pipettiert, nach der Inkubation von 1 min für 2 min 11000 x g zentrifugiert und das Eluat in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen, in das zuvor die Nucleospin Säule platziert worden war.

6.1.2.3. DNA-Gelextraktion

Aus einem präparativen Gel wurden die zu eluierenden DNA-Banden nach entsprechender Ethidiumbromidanfärbung (Punkt 6.1.2.1.) mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten. Die DNA-Gelextraktion erfolgte mit Hilfe eines DNA-Extraktionskits (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) nach Anleitung des Herstellers. In 2 ml Eppendorfgefäße wurde die DNA enthaltende Agarose gegeben, gewogen und sukzessive mit dem 4,5 fachen Gewichtsvolumen der Bindelösung und mit ½ Volumenanteil TBE-Konversionspuffer versehen. Zum Auflösen der Agarose wurde das Gemisch in einem 55° C warmen Wasserbad unter mehrmaligem Schütteln erwärmt. Anschließend wurden 5 µl Silikat-Puder zugegeben und der Ansatz unter mehrmaligem Vortexen 5 min bei 55°C inkubiert. Die Suspension wurde 5 sek lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Sediment mit 3 x 500 µl eiskaltem Waschpuffer resuspendiert, kurz zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Daran anschließend wurde das Sediment 10-15 min luftgetrocknet und in 50 µl autoklaviertem

Ampuwa aufgenommen. Das Eluat enthielt die DNA und konnte durch Zentrifugation vom Silikat-Puder getrennt und anschließend in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert werden. Zur Kontrolle und gegebenenfalls zur Bestimmung der Quantität wurden 3 µl der DNA zusammen mit einem Größen- und Mengenmarker auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe Punkt 5.6.) oder eine Absorptionsmessung durchgeführt (siehe Punkt 6.1.2.4.).

6.1.2.4. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch Absorptionsmessungen im UV-Bereich bei 260 nm bestimmt. Eine Quarzküvette mit 500 µl Ampuwa wurde als Nullwert verwendet. Als Richtwert für die Konzentrationsbestimmung gilt für DNA: 1 OD_{260 nm} entspricht 50 µg/ml.

Eine Alternative zur photometrischen Bestimmung ist der Einsatz eines Größen-Markers auf einem Agarosegel. 3 µl der zu bestimmenden DNA wurden parallel zu einem Größen-Marker (Mass Ruler™ DNA Ladder) aufgetragen. Dieser konnte nicht nur zum Abschätzen der Fragmentgröße, sondern auch zur annähernden Konzentrationsbestimmung eingesetzt werden, da die Intensität der Banden einen Rückschluss auf die DNA-Konzentration zuläßt.

6.1.2.5. Oligonukleotide

Die zur Sequenzierung und PCR eingesetzten Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit frisch autoklaviertem Wasser in einer Ausgangskonzentration von 100 pmol/µl gelöst. Diese Stammlösung wurde durch Verdünnen mit Wasser auf 10 pmol/µl eingestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Punkt 5.12. angegeben.

6.1.2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR; polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die spezifische *in vitro*-Amplifikation von DNA und RNA (Saiki et al., 1985). Ein zentrales Element dieser Reaktion ist eine thermostabile DNA-Polymerase, die ihre optimale Enzymaktivität bei 72°C besitzt. Mit Hilfe des Enzyms und zweier gegenläufiger, sequenzspezifischer Oligonukleotide werden wenige DNA-Kopien exponentiell vermehrt.

Die Reaktion gliedert sich in repetitive Schritte: DNA-Denaturierungen (Initiation), DNA-Oligonukleotid-Hybridisierungen (Annealing) und Oligonukleotidkettenverlängerung (Elongation). Ein Zyklus wurde bis zu 30 mal wiederholt. Die Annealing-Temperatur kann

mit einer Formel unter Berücksichtigung der Basenzusammensetzung der Oligonukleotide grob berechnet werden:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 2 \text{ (Suggs et al., 1981)}$$

Die zur DNA-Synthese benötigte Zeit während des Annealings berechnet sich nach der Kapazität der verwendeten Polymerase:

Für Pfu: 500 Nukleotide/min + 30 sec

Für Phusion und Inphusion: 1000 Nukleotide/30 sec

An ihrem 5'Ende können sich Erkennungssequenzen für Hexanukleotid-spezifische Restriktionsenzyme oder Nukleotide zum Einfügen einer Mutation befinden. Diese Basen wurden bei der Berechnung der Oligonukleotid-Schmelztemperatur nicht berücksichtigt.

Ein typisches PCR-Mastermix bestand aus 5-10 ng DNA, je 1 µl 10 mM dNTP, Primer 5' und 3' und wurde mit autoklaviertem Ampuwa zu einem Gesamtvolumen von 50 µl ergänzt.

In Abhängigkeit des zu synthetisierenden Produktes wurden unterschiedliche DNA-Polymerasen mit entsprechenden Puffern und PCR-Protokollen eingesetzt.

6.1.2.6.1. Pfu-Polymerase

Die Pfu-Polymerase besitzt im Gegensatz zur Taq-Polymerase ein effizientes Korrektursystem (proof-reading system), um die Einführung von DNA-Mutationen zu minimieren. Sie wird aus dem E. coli *Pyrococcus furiosus* isoliert.

Protokoll für die Pfu-Polymerase

Eingesetzt bei der Synthese der Klone:

- pEGFP-N3-FGFR-EZD^{I-III}-Fc-His:
- pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His:
- pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His:

Initiation:	95°C	2 min
Denaturierung :	95°C	30 sec
Annealing:	Primer-spezifisch	30 sec
Kettenverlängerung:	72°C	Produkt-spezifisch
terminierende Kettenverlängerung:	72°C	5 min
10 x Puffer mit Magnesiumsulfat	5 µl	
Pfu (2,5 units/µl):	0,5 µl	

6.1.2.6.2. Expand High Fidelity PCR System

Eine Enzymmischung aus Taq DNA Polymerase und Tgo DNA Polymerase ermöglicht auf der einen Seite durch Korrekturlesen eine Mutationsminimierung und auf der anderen Seite an dem 3'-DNA-Ende die Synthese eines dT-Überhangs, der eine Zwischenklonierung des Amplifikats in den pGMT®-Vektor ermöglicht. Um zu überprüfen, ob die Ligation in den pGMT®-Vektor stattfand, wurde das „blue-white screening“ verwendet (siehe Punkt 6.1.4.).

Protokoll für das Expand High Fidelity PCR System

Eingesetzt zur Zwischenklonierung der N-Cad-EZD^{I-III}-c-DNA in pGMT®.

Initiation:	95°C	2 min
Denaturierung:	95°C	30 sec
Annealing:	Primer-spezifisch	30 sec
Kettenverlängerung:	72°C	Produkt-spezifisch
terminierende Kettenverlängerung:	72°C	5 min
10 x Puffer mit Magnesiumchlorid:	5 µl	
Enzymmix (3,5 units/µl):	0,5 µl	

6.1.2.6.3. Phusion und Inphusion-Polymerase

Eine neu entwickelte thermostabile DNA-Polymerase mit großen Vorteilen ist die Inphusion Polymerase. Eine *Pyrococcus*-ähnliche Polymerase mit hohem Korrektursystem gewährleistet wie Pfu eine Vermeidung von Mutationen; eine DNA-bindende Domäne ermöglicht eine Fusion des Enzyms mit der DNA und garantiert so das lückenlose Amplifizieren sekundärstrukturhaltiger DNA.

Protokoll für die Phusion-Polymerase und Inphusion-Polymerase

Eingesetzt bei der Synthese der Vektoren:

- pEGFP-N3-Fc-His
- pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His
- pDsRed-C1-FGFR-1
- pEGFP-N3-N-Cadherin EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His
- pEGFP-N3-N-Cadherin

Initiation:	98°C	30 sec
Denaturierung:	98°C	10 sec
Annealing:	Produkt-spezifisch	30 sec
Kettenverlängerung:	72°C	Produkt-spezifisch
Letzte Kettenverlängerung:	72°C	5 min
10 x GC-Puffer:	10 µl	
Phusion-Polymerase (2 u/µl):	0,25 µl	

6.1.2.6.4. Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Ziel der RT-PCR ist es mit reverser Transkription aus einzelsträngiger RNA DNA zu gewinnen. Diese kann über eine daran anschließende PCR vervielfältigt und molekularbiologisch weiterverwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um die Mutation der mit pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His transfizierten Zelllinie zu überprüfen (siehe Punkt 7.1.1.1.3).

Die Gewinnung der RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen Hilden) nach Angaben des Herstellers. Eine T25 Flasche mit konfluentem Zellrasen wurde wie in Punkt 6.2.3. beschrieben trypsinisiert, der Verdau durch Mediumzugabe gestoppt und die so erhaltenen Zellen in einem 15 ml Greiner-Röhrchen bei 900 rpm 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 2 ml PBS gewaschen und zum Aufschließen der Zellen über Nacht bei – 20°C tiefgefroren. Am nächsten Tag wurde die aufgetaute Suspension zur Lysis der Zellen mit 350 µl RLT Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol (100 %) versetzt und 20 x durch eine 1 ml Einmalspritze gezogen, um mit Hilfe der Scherkräfte die Zellen zu zerstören und die RNA freizusetzen. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 350 µl Ethanol 70 %. Der Überstand des Homogenats wurde auf eine Säule, die sich in einem 2 ml Gefäß befand, pipettiert und kurz zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule nacheinander mit 700 µl RW1 Puffer, 2 x mit 500 µl RPE Puffer gewaschen und der dabei entstehende Durchfluss verworfen. Nach einer 1 minütigen Zentrifugation wurde das Gefäß durch ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß ersetzt und die RNA durch Zugabe von 40 µl autoklaviertem Wasser und einer Zentrifugation von 1 min eluiert. Aus dem Eluat wurden 5 µl für den RT-PCR Ansatz (siehe Master Mix 1) verwendet.

Hierzu wurde das TitanTM One Tube RT-PCR System (Boehringer-Mannheim) verwendet.

Protokoll für die RT-PCR

Master Mix 1:

dNTP 10 mM:	1,0 µl
Primer vorwärts (20 pMol):	1,0 µl
Primer rückwärts (20 pMol):	1,0 µl
DTT (0,1 M):	2,5 µl
RNase Inhibitor:	0,25 µl
Autoklaviertes Ampuwa:	14,25 µl
RNA:	5 µl

Master Mix 2:

PCR-Puffer mit Mg ²⁺ :	10 µl
Enzymmix:	1 µl
Autoklaviertes Ampuwa:	14 µl

Die Mischung aus Master Mix 1, 2 und RNA ergaben insgesamt 50 µl. Die RT-PCR hatte folgendes Temperaturprofil.

Reverse Transkription:	50°C	30 min
Initiation:	94°C	2 min
Denaturierung:	94°C	10 sec
Annealing:	56°C	30 sec
Kettenverlängerung:	68°C	1 min
terminierende Kettenverlängerung:	68°C	7 min

} 25 x

6.1.2.7. Restriktionsanalyse von DNA

Die analytische Restriktionsanalyse wurde in einem Ansatzvolumen von 10-20 µl durchgeführt. Die eingesetzte Enzymmenge betrug nicht mehr als 1/10 des Restriktionsansatzes, um den inhibierenden Effekt des darin enthaltenen Glycerins auf die Enzymaktivität zu vermeiden. Restriktionsenzyme erkennen palindromische Sequenzen, die 4-8 bp lang und in der Lage sind DNA gerade oder in überhängenden Einzelsträngen zu schneiden. Es entstehen dementsprechend „blunt ends“ und „sticky ends“.

In einen Restriktionsansatz von 10 µl wurden 2-3 µg DNA, 3-5 U/µg DNA des benötigten Enzyms, 1 µl des vom Hersteller angegebenen 10fach Puffers gegeben und anschließend mit sterilem Ampuwa zum gewünschten Volumen ergänzt. Die Inkubationsdauer betrug 2 Stunden bei 37°C. Der Restriktionserfolg wurde mittels anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft. Falls ein DNA Fragment für daran anschließende Ligations- bzw. Rekombinationsreaktionen benötigt wurde, erfolgte ein entsprechender präparativer Restriktionsverdau mit daran folgender Gel-Elektrophorese und DNA-Eluierung.

Die in der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Enzym	Erkennungssequenz
AgeI (=BshTI)	A↓CCGGT
BamHI	G↓GATCC
Bgl II	A↓GATCT
Dpn I	GA↓(CH ₃)TC
Kpn I	GGTAC↓C
Pst I	CTGCA↓G
Pvu II	CAG↓CTG
Xho I	C↓TCGAG

Tabelle 1:
verwendete Restriktionsenzyme mit
entsprechender Erkennungssequenz

6.1.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer T4-Ligase (Fermentas, St. Leon, Roth) miteinander verknüpft. Auf diese Weise ist es möglich ein DNA-Fragment in einen linearisierten Vektor einzubauen. Um eine Religation des linearisierten Plasmids zu verhindern, wurde der Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt. Ein Ligationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

100 ng linearisierter Vektor
 1 µl 10 x Ligase Puffer
 1 µl T4-DNA-Ligase (3units/µl)
 300 ng DNA-Fragment
 10 µl Endvolumen

Der Ligationsansatz inkubierte bei 16°C über Nacht im Wasserbad.

Um ein Amplifikat ligieren zu können, musste es zuvor an dessen glatten 5`-Ende phosphoryliert werden. Daher wurden 200-300 ng Amplifikat, 1,5 µl ATP (100 mM), 1 µl 10 x Puffer und 1,5 µl Polynukleotidkinase (PNK) mit sterilisiertem Ampuwa auf ein Endvolumen von 10 µl ergänzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung (65 °C und 20 min) im Wasserbad wurde mit dem DNA-Fragment unter Zugabe von 0,5 µl ATP und 1 µl T4-Ligase über Nacht bei 16 °C eine Ligation durchgeführt.

6.1.2.9. Rekombination

Im Vergleich zur Ligation weist die Rekombination weniger Arbeitsschritte auf und benötigt daher einen geringeren Zeitaufwand. Die PCR-Primer wurden so konzipiert, dass sie zu dem Vektor und zu der zu amplifizierenden DNA komplementäre Sequenzen enthielten. Daher musste nur noch der Vektor und nicht mehr das Insert durch Restriktionsverdau vorbereitet werden.

Als Fixgröße wurde für das Insert eine Menge von 100 ng festgelegt. In einem molaren Verhältnis von 2:1 wurden das Insert und der Vektor in einem Gesamtvolumen von 10 µl in ein Eppendorfgefäß zusammenpipettiert, das bereits den entsprechenden Rekombinationsmix enthält. Dieser Enzymmix entsprach einer fertigen Mischung des BD InFusion™ PCR Klonierungs-Kits (Clontech, Heidelberg). Im Anschluss an die Rekombination im Wasserbad bei 42°C über 30 sec., wurden dem Ansatz 40 µl TE-Puffer zugegeben und dieser vorsichtig gemischt. Daraus wurden 2,5 µl DNA zu 30 µl kompetenten *E. coli* Zellen gegeben. Die Hitzeschocktransformation erfolgte wie unter 6.1.3. beschrieben. Dabei wurden statt 900 µl LB-Medium 450 µl SOC-Medium verwendet.

Mit Hilfe der Rekombination wurden die DNA-Klone pDsRed-FGFR, pEGFP-N3-Fc-His, pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His und pEGFP-N3-N-Cadherin erstellt.

6.1.3. Hitzeschocktransformation

Für Transformationen wurden MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells verwendet, die bei -80°C in 50 µl Aliquots gelagert wurden. Pro Transformationsansatz wurde 1 Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 1/5 des Ligationsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock, indem der Ansatz für 45 sec. in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten und anschließend wieder für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37°C im Rotationsinkubator (200 rpm). Anschließend folgte eine 1 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und das Verwerfen von 700 µl des Überstandes. Im verbleibenden Volumen wurden die Bakterien resuspendiert, auf eine LB-Agarplatte entsprechend der Antibiotikaresistenz des eingesetzten Plasmids ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde von gewachsenen Kolonien Flüssigkulturen zur Plasmidpräparation angeimpft (siehe Punkt 6.1.1.1.; Punkt 6.1.2.2.).

6.1.4. Blue-white-screening

Eine erfolgreiche Ligation zwischen dem Insert und dem pGMT®-Vektor wurde mit Hilfe des „blue-white-screenings“ überprüft. Der pGMT®-Vektor ist in der Lage mit Hilfe des Enzyms β -Galaktosidase den Zucker X-Gal zu spalten. Wird ein Insert in den Vektor eingebaut, ist diese Fähigkeit nicht mehr gewährleistet, da das Gen für die β -Galaktosidase unterbrochen wird und nicht mehr translatiert werden kann. Bakterienkolonien mit funktionsfähiger β -Galaktosidase erscheinen demnach auf einer X-Gal enthaltenen Platte blau, diejenigen ohne diese enzymatische Fähigkeit sind weiß.

Daher wurden nur weiße Kolonien einer DNA-Minipräparation unterworfen (siehe Punkt 6.1.2.2.) und die daraus gewonnene Plasmid DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen analysiert (siehe Punkt 6.1.2.7.).

6.1.5. Analyse positiver Klone durch Sequenzierung

Als positiv indentifizierte Plasmid-DNA wurde im Anschluß an die Restriktionsanalyse in Gegenwart spezifischer Primer sequenziert. Hierzu wurden pro Sequenzierprimer 2 μ g Plasmid-DNA im Heizblock bei 65° C eingetrocknet und zur Sequenzierung zu MWG-Biotech AG geschickt (<https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl>). 10 μ l (10 pmol/ μ l) von MWG bereitgestellte Primer wurden dem Sequenzierungsauftrag beigelegt. Die Analyse größerer DNA-Fragmente erfolgte durch überlappende Sequenzierung. Die erhaltene Sequenz konnte mit Hilfe der Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> mit anderen Sequenzen verglichen, identifiziert und auf Mutationen überprüft werden.

Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind unter Punkt 5.12.2. aufgeführt.

6.2. Zellkultur

6.2.1. Sterilisierung von Glasmaterialien und Lösungen

Glasmaterialien wurden in trockener Hitze bei 180-200°C über einen Zeitraum von 4 Stunden sterilisiert. Lösungen und Nährmedien wurden in feuchter Hitze bei 2 bar/120°C autoklaviert. Thermolabile Lösungen wurden durch Sterilfiltration (Porengröße des Filters 0,2 μ m) von Keimen befreit.

6.2.2. Nährmedien

Die Kulturzellen wurden in dem für sie geeigneten Kulturmedium in Kulturflaschen der Größe T 25 bzw. T 75 bei 37°C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlendioxid gehalten. Die Wildtyp-CHO-Zellen und transfizierten CHO-Zellen wurden in α MEM-Medium (α modified

Eagles medium) mit 10 % FCS (fetales Kälberserum) und 50 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Endothelzellen, die NCAM in den Überstand sezernierten, wurden in GMEM-Medium (Glasgow modified Eagle medium) mit 10 % FCS, 1 % essentieller Aminosäurelösung, 20 ml NCAM-Mix (siehe 5.5) und 50 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

PC12-Zellen (Phaeochromocytom-Zellen) wurden in DMEM-Medium (Dulbeccos modified Eagles medium) mit 10 % Pferdeserum, 5 % FCS, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin und 110 mg Pyruvat/500 ml Medium kultiviert.

Endothelzellen, die L1 in den Überstand sezernierten, wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS und 50 U/ml Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Das Medium wurde jeweils als Pulver in Ampuwa gelöst, durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat gepuffert (pH 7,5), steril filtriert und über Monate bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurden 450 ml des Mediums mit 10 % FCS und mit je 50 U/ml Penicillin-G/Streptomycin supplementiert.

Cerebelläre Körnerzellen wurden in BME-Medium kultiviert. Die Supplementierung dieses Mediums ist unter Punkt 5.5. aufgeführt.

6.2.3. Standardzellkultur

Um Zellen kultivieren zu können, bedarf es unterschiedlicher Kulturgefäße. In dieser Arbeit verwendete Gefäße sind auf Seite 59 aufgeführt. CHO-Zellen wurden bei 90-100 %iger Konfluenz je nach Bedarf in einem Verhältnis von 1:20 bis 1:50 gesplittet und zur Kultivierung in T 25 Flaschen in dem für sie geeignetem Medium gehalten. Bei stabil transfizierten CHO-Zellen erfolgte eine Zugabe von 40 µl G418/ml. Wurde für Versuche eine abweichende Zellzahl benötigt, erfolgte die Aussaat auf Deckgläschen in Petrischalen (Durchmesser 2,5 cm), in 96 oder 6 well-Platten und T 75 Flaschen. PC12-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:3-1:5 gesplittet. Bei ihnen wurde darauf geachtet, dass kein konfluenter Zellrasen entstand, da sich die Zellen bereits vor dem Abtrypsinieren von der Flasche lösen. Daher erfolgte das Splitten schon bei einer Zelldichte von ca. 80 %.

Zum Splitten der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin von der Flasche gelöst. Der Verdau der Zellen in Gegenwart von Trypsin wurde durch Mediumzugabe verhindert. Die gut resuspendierten Zellen wurden auf die entsprechenden Gefäße im geeigneten Verhältnis aufgeteilt. Diese Vorgehensweise wurde zwei bis drei Mal pro Woche

wiederholt. Die Morphologie und Konfluenz der Zellen wurde stets im Phasenkontrastmikroskop beurteilt.

Kulturgefäß	Grundfläche	Mediummenge	Trypsinmenge
96 Well	0,32 cm ²	200 µl	50 µl
12 Well	3,83 cm ²	1 ml	300 µl
6 Well	9,4 cm ²	2 ml bzw. 3 ml	500 µl
T 25	25 cm ²	5 ml bzw. 10 ml	1,5 ml
T 75	75 cm ²	10 ml bzw. 20 ml	3 ml

Tabelle 2: Angabe der verwendeten Kulturgefäße unter Angabe der Grundfläche und davon abhängigen Medium- und Trypsinmenge.

6.2.4. Cerebelläre Körnerzellkultur

Körnerzellen gehören zu den Neuronen, die sich als letzte im ZNS differenzieren. Da ihre Reifung erst nach der Geburt abgeschlossen wird, wurden diese Zellen aus dem Kleinhirn von 5-6 Tage alten Mäusen oder 7-8 Tage alten Ratten isoliert. Durch Zugabe von Arabinosid C 24 h nach der Präparation kann eine unerwünschte Proliferation von nicht neuronalen Zellen wie beispielsweise Fibroblasten und ein Überleben der Purkinje-Neurone verhindert werden. Die so hergestellten Kulturen bestanden aus einigen GABAergen Interneuronen, Astrozyten und zu mehr als 90 % aus Körnerzellen.

Körnerzellen beginnen ihren Entwicklungsprozess 1-2 Tage nach der Präparation durch Axon- und Dendritenbildung und sind in weniger als einer Woche vollständig differenziert. Je länger die Zellen kultiviert werden, desto höher ist die Apoptose. Letztere kann durch eine ansteigende Kaliumionenkonzentration von 5 mM auf 25 mM verringert werden. Es wird angenommen, dass der depolarisierende Effekt auf die Neuronenzellmembran *in vivo* das erste Innervieren der Körnerzellen mit glutamatergen Moosfasern imitiert (Carafoli et al., 1999).

In der folgenden Präparationsmethode wurden Lösungen verwendet, die unter Punkt 5.5. aufgeführt sind. Die cerebellären Körnerzellen wurden nach folgendem Protokoll isoliert:

5 Mäuse wurden mit einer Schere geköpft und ihre Köpfe mit 70 %igem Isopropanol besprüht, um eine Kontamination der Kultur mit Pilzen und Bakterien zu verhindern. Anschließend erfolgte die Entfernung des Fells, der Kalotte und die Entnahme des Kleinhirns. Dieses wurde sofort zur Versorgung der Zellen in 5 ml der Lösung 1 gegeben. Um

Verunreinigungen der Körnerzellkultur durch meningale Zellen zu verhindern, wurden unter dem Lichtmikroskop die Meningen mit Hilfe einer Pinzette entfernt.

Unter der Sterilbank wurden die Kleinhirne mit einem Skalpell zerhackt, in die restlichen 10 ml der Lösung 1 gegeben und 3 min lang bei 900 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 7 ml Trypsinlösung aufgenommen und in eine Petrischale mit einem Durchmesser von 6 cm überführt. Der darauf folgende Gewebeverdaу erfolgte 13 min lang im Brutschrank unter gelegentlichem Schütteln. Unter Zugabe von 7 ml der Lösung „Verdünnt“ wurde der Verdaу gestoppt. Anschließend wurde die Gewebesuspension in ein 15 ml Greiner Röhrchen pipettiert und 3 min lang bei 900 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet mit 2 ml Inhibitorlösung aufgenommen und durch 25 x Auf- und Abziehen in einer Pasteurpipette zerkleinert. Eine Trennung zwischen dem verbleibenden Gewebe und den in feiner Suspension befindlichen Nervenzellen erfolgte durch 10 min Sedimentation. Die Körnerzellsuspension wurde vom Sediment abpipettiert und in 3 ml Lösung „Calcium“ gegeben. Das zurückbleibende Gewebesediment wurde mit 2 ml Inhibitorlösung versehen und wiederum 25 Mal durch die Pasteurpipette pipettiert. Nach einer weiteren Sedimentation von 10 min wurde der Überstand zu der bereits erhaltenen Körnerzellsuspension gegeben. Um die Nervenzellen zu erhalten, erfolgte 10 min lang eine Zentrifugation von 900 rpm. Nach Verwerfen des Überstandes konnten die Nervenzellen in Medium aufgenommen, in einer Zelldichte von 250.000 Zellen/cm² ausgesät und in den Brutschrank gestellt werden.

Um das Verhalten von Körnerzellen in Gegenwart ausgewählter Proteine zu untersuchen, wurde das zu analysierende Protein in einer Konzentration von 5 ng/ml zu den Kulturzellen in eine Petrischale (Durchmesser 3 cm) mit vier Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 1 min lang mit eiskaltem Methanol fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie wie unter Punkt 6.4.1. beschrieben behandelt.

6.2.5. Poly-L-Lysin behandelte Deckgläschen

Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm wurden in Alufolie verpackt im Sterilisator über 4 h bei 180°C sterilisiert. Vier Deckgläschen wurden in eine Petrischale mit 3 cm Durchmesser gegeben und anschließend mit einer Poly-L-Lysin Lösung (1mg/100ml Ampuwa) bedeckt. Diese konnte nach einer Beschichtungszeit von 30 min entfernt werden. Da Poly-L-Lysin cytotoxisch ist, wurden die Deckgläschen 3 x 5 min mit PBS gewaschen.

6.2.6. Kryokonservierung von Zellen

Stabil transfizierte Zelllinien können bei längerer Kultivierung und höherer Passagenzahl ihren Charakter beispielsweise durch Veränderung ihres Genoms und ihrer Morphologie verändern. Um diesen Veränderungen vorzubeugen, ist es sinnvoll, zu Beginn der Zelllinienentstehung möglichst viele Zellen einzufrieren, um bei Bedarf auf niedrigere Passagenzahlen zurückgreifen zu können.

6.2.7. Einfrieren von Zellen

Die Kulturzellen wurden wie unter Punkt 6.2.3. beschrieben von der Kulturflasche abgelöst und bei Raumtemperatur 5 min lang bei 900 rpm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde pro Kryoröhrchen mit 800 µl 10 % FCS/10 % DMSO versetztem Kulturmedium versehen, über 2 Tage lang in eine Einfrierbox bei – 80°C zwischengelagert und schließlich in flüssigem Stickstoff bis zur Wiederverwendung aufbewahrt. Aus einer T 75 Flasche konnten drei, aus einer T 25 konnte ein Kryoröhrchen gewonnen werden. Um zu kontrollieren, ob das Einfrieren der Zellen gelungen war, wurde von jeder Einfriercharge vor dem Lagern in flüssigem Stickstoff ein Kryoröhrchen zur Probe aufgetaut.

6.2.8. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde in das Kryoröhrchen vorsichtig Medium pipettiert und die aufgetauten Zellen in ein mit 10 ml Medium gefülltes Greinerröhrchen gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 900 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml Medium aufgenommen, in einer mit Medium gefüllten T 25 Flasche resuspendiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden die toten Zellen durch Mediumwechsel entfernt. Wichtig ist es beim Auftauen der Zellen zügig zu arbeiten, um das zelltoxische Einwirken von DMSO auf die Zellen zu vermeiden.

6.2.9. Transiente Transfektionen von Zellen

Transiente Transfektionen adhärenter Zellen wurden mit EffecteneTM (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bei einer Dichte von 70-80 % nach folgendem Schema transfiziert: 1 µg DNA (~10 µl DNA einer Plasmid-DNA-Minipräparation) wurden mit 150 µl EC-Puffer und 16 µl Enhancer versehen. Der Ansatz wurde durch kurzes Vortexen gemischt, abzentrifugiert und 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Effektene zugegeben, durch kurzes Vortexen gemischt, abzentrifugiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde von den zu transfizierenden Zellen das Medium entfernt. Anschließend wurden sie mit 5 ml PBS gespült und mit 1.6 ml frischem Medium versehen. Nach der Inkubationszeit wurden zum Reaktionsansatz 600 µl Medium gegeben. Dieses Gemisch wurde auf die Zellen pipettiert, vermischt und anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Kodierte das zur Transfektion eingesetzte Plasmid für ein GFP oder DsRed-Fusionsprotein, konnte am nächsten Tag die Effizienz der Transfektion anhand der Anzahl GFP- bzw. DsRed-fluoreszierender Zellen analysiert werden.

Da das eingetetzte pEGFP-N3 mit Ausnahme des Klons pEGFP-N3 N-Cadherin vor dem zu kodierenden GFP ein Stopcodon besitzt, konnte das GFP nicht gebildet und somit keine Fluoreszenzanalyse bzw. keine Selektionierung mit dem FACS (Fluoreszenz activated cell sorter) Gerät stattfinden (siehe Punkt 6.2.10.). Um dennoch einen Einsatz des FACS Gerätes zu ermöglichen, fand eine Kotransfektion mit dem zu transfizierenden Plasmid und einem kodierungsfähigen pEGFP-N3 im Verhältnis 1:10 statt.

6.2.10. Generierung von stabilen Zellklonen

Im Gegensatz zu transient transfizierten Zellklonen besitzen stabile Zellklone das transfizierte Plasmid nicht extrachromosomal, sondern integriert im Genom. Es bleibt daher auch bei Zellteilungen erhalten. Es entsteht eine Zelllinie, die das gewünschte Produkt kontinuierlich exprimiert. In dieser Arbeit wurden stabile Zellklone hergestellt, die das gewünschte Protein ausschließlich in das Medium sezernierten.

Um eine stabile Zelllinie zu erhalten wurden CHO-Zellen wie unter Punkt 6.2.9. beschrieben transfiziert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 40 µl/ml des Antibiotikums Genitocin (G418), um die nicht transfizierten Zellen, die keine Antibiotikumresistenz besitzen, abtöten zu können. Da die Entfernung der nicht transfizierten Zellen nicht vollständig möglich war, wurden die Zellen von dem 6-Well auf eine T 25-Flasche gesplittet und anschließend eine Verdünnung errechnet, die pro 96-Well einer Zelle entsprach. Diese Methode wurde nur bei den Zelllinien pEGFP-N3-N-Cadherin E^{ZD^{I-V}}-Fc-His und pEGFP-N3-FGFR-E^{ZD^{I-III}}-Fc-His durchgeführt, da in diesen Fällen keine Kotransfektion vorgenommen worden war.

Dagegen wurden Zelllinien pEGFP-N3-N-Cadherin-E^{ZD^{I-III}}-Fc-His, pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-E^{ZD^{I-III}}-Fc-His, pEGFP-N3-N-Cadherin-E^{ZD^{I-III+V+V}+L^{III+IV+V}}-Fc-His und pEGFP-N3-Fc-His durch Kotransfektionen der entsprechenden Expressionskonstrukte mit pEGFP-N3 und präparativem FACS erhalten.

Zeigten diese Einzelklone im Fluoreszenzmikroskop eine durchgehende Fluoreszenz, wurden sie auf 6-Well-Platten umgesetzt und bezüglich ihrer Expression des gewünschten Produktes mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Immunoblot analysiert.

Falls kein Klon eine durchgehende Fluoreszenz aufwies, wurden mehrere Klone mit hoher Fluoreszenz und Produktivität ermittelt, über mehrere Wochen in Kultur gehalten und weiterhin mit Hilfe eines Zellschabers nach folgendem Prinzip vorselektioniert: In eine T 175 Petrischale wurden Zellen im Verhältnis 1:30 ausgesät und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Nicht transfizierte Zellen wurden unter sterilen Bedingungen von grün leuchtenden Zellkloninseln mit Hilfe eines Zellschabers so gut wie möglich entfernt. Anschließend wurde auf den verbleibenden Zellklon ein steriler Ring (Durchmesser 0,5 cm) gelegt, der Zellklon wie unter Punkt 6.2.3. beschrieben abtrypsiniert und in eine 6-Well-Platte überführt. Der Klon wurde mit Hilfe des FACS selektioniert und seine Konfluenz und Produktivität mittels Fluoreszenz und Immunoblot untersucht. Diese Methode wurde insbesondere bei der Zelllinie pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His angewendet.

Der Klon mit der besten Expressionsrate wurde schließlich kryokonserviert.

6.2.11. Herstellung eines Zelllysats

Für die Herstellung eines Zelllysates wurden die Zellen eines 6-Well mit PBS gewaschen, mit 150 µl Probenpuffer versehen, mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Das Lysat wurde 5 min. lang zusammen mit einer Spatelspitze DTT bei 90°C im Thermocycler aufgeköcht und anschließend die Expression des gewünschten Proteins im Immunoblot untersucht.

6.3. Biochemie

6.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können entsprechend ihres Molekulargewichtes mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert werden, indem sie in Gegenwart eines Überschusses an Natriumdodecylsulfat (Sodium-DodecylSulfat, SDS) und Denaturierungsreagenzien elektrophoretisch ladungseinheitlich werden. Das negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine, kompensiert ihre positive Ladung und führt dazu, dass nach Anlegung einer Spannung die Proteine mit konstanter Ladung/Masseneinheit zur Anode wandern. Das Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde von Laemmli (1970) beschrieben.

Zwischen zwei Glasplatten, die voneinander durch 1 mm große Abstandhalter getrennt und in eine Halterung eingespannt waren, wurde ein Flachbettgel, das aus einem Sammel- und

Trenngel bestand, gegossen. Die Polymerisierung der Gele wurde durch Ammoniumpersulfat (APS) und durch Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Bei Proteinen mit einem hohen Molekulargewicht wurde ein 7,5 %iges, bei Proteinen mit einem niedrigen Molekulargewicht ein 10 %iges Trenngel gegossen. Nach dessen Polymerisation folgte das 5 %ige Sammelgel, in das zur Formung der Taschen ein Taschenkamm eingesetzt wurde. Nach Polymerisation des Geles wurde der Kamm entfernt. Es konnten die Proben, die im Verhältnis von 1:3 mit dreifach konzentriertem Probenpuffer und Dithiothreitol (DTT) versehen und zuvor 5 min lang bei 90° C im Thermocycler aufgeköcht worden waren, in die Taschen pipettiert werden. Damit die Probe in die Tasche sinkt, enthält der Probenpuffer zur Erhöhung der Dichte Glycerin. Das visuelle Verfolgen des Auftrags- und Elektrophoreseprozesses erleichterte der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff Bromophenolblau. Um das Zuordnen der Proteinbanden zu ermöglichen, wurde prinzipiell ein Größenmarker mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Elektrophoresepuffer, im Sammelgel bei einer Spannung von 80 V, im Trenngel bis zu 150 V. Sie war beendet, wenn die durch den Puffer markierte Lauffront (Bromophenolblaubande) aus dem Gel herausgelaufen war. Anschließend erfolgte eine Anfärbung der Proteine durch Coomassie oder einen Immunoblot.

6.3.2. Färben eines SDS-Gels mit Coomassie® Brilliant Blau

In saurer Lösung werden alle Proteine positiv geladen, fixiert und an den Farbstoff Coomassie® Brilliant Blau gebunden. Mit dieser Färbemethode lassen sich Proteine ab einer Menge von 100 µg nachweisen.

Daher wurde im Anschluß an die Elektrophorese das Sammelgel verworfen und das verbleibende Trenngel für 30 min in Coomassie® Brilliant Blau gelegt. Nach Entfernen der Farbstofflösung wurde es zum Entfärben in Wasser, das mehrmals gewechselt wurde, über einen Zeitraum von mehreren Tagen gegeben. Anschließend wurde das Gel zur Dokumentation zwischen zwei Lagen Einmachfolie luftblasenfrei zum Trocknen aufgespannt.

6.3.3. Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf eine Nitrocellulosemembran (Immunoblot, Westernblot)

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel mit Hilfe eines halbtrockenen Elektrobrotverfahrens auf eine absorbierende Nitrocellulosemembran transferriert (Kyhse-Anderson, 1984).

Hierbei wurde das Gel luftblasenfrei im Blotpuffer auf eine Nitrocellulosemembran positioniert und unterhalb des Gels und oberhalb der Membran drei Lagen von gleichgroßen

Filterpapieren gelegt. Anschließend wurde alles so in eine Blotkammer gelegt, dass sich das Gel auf der Kathodenseite und die Nitrocellulose auf der Anodenseite befand. Da der Proteintransfer in Richtung Anode erfolgte, gelangten die Proteine über einen Zeitraum von 1,5 h bei einer Stromstärke von 42 mA, entsprechend 0,8 mA pro cm², auf die Nitrocellulosemembran. Um die einzelnen Laufspuren mit ihren Proteinen voneinander unterscheiden zu können, wurde die Nitrocellulose nach vollendetem Transfer 2 min in Ponceau-Lösung gegeben und anschließend vorsichtig mit demineralisiertem Wasser entfärbt. Die Spuren konnten mit Bleistift nummeriert und gegebenenfalls mit dem Skalpell voneinander getrennt werden.

Aufbau einer Blotkammer

Graphitdeckel der Laufkammer (Kathode)

3 Filterpapiere

SDS-Polyacrylamidgel

Nitrocellulosemembran

3 Filterpapiere

Graphitboden der Laufkammer (Anode)

6.3.4. Westernblot-Analyse

Mit Hilfe der Westernblot-Analyse können durch Einsatz von spezifischen Antikörpern Proteine auf der Nitrocellulosemembran nachgewiesen werden. Die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe konnten in Gegenwart eines entsprechenden POX-markierten 2. Antikörpers durch die Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrates und durch Anfärbung eines Röntgenfilms visualisiert werden. Um zu verhindern, dass der Primärantikörper an unspezifische Bindungsstellen bindet, wurde die Nitrocellulose zuvor über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden mit 5 % Magermilchpulver in PBS+0,05 % Tween 20 blockiert. Die anschließende Inkubation des Primärantikörpers, der in 5 % Magermilchpulver und PBS+0,05 % Tween 20 gelöst war, erfolgte über Nacht bei 4°C und Rotation (200 rpm). Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 min in PBS+0,05 % Tween 20 gewaschen. Anschließend folgte über einen Zeitraum von 45 min die Inkubation des Sekundärantikörpers, der in 5 % Magermilchpulver in PBS+0,05 % Tween 20 gelöst war. Der Sekundärantikörper ist gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und an eine Peroxidase gekoppelt. Nachdem 3 x 5 min mit PBS+0,05 % Tween 20 gewaschen worden war, konnte mit Hilfe von ECL- (enhance chemiluminescence) Lösungen die Detektion nach folgendem Prinzip

erfolgen: In eine 1:1 Mischung der beiden ECL-Lösungen wurde die Nitrocellulose 1 min eingetaucht, auf eine Röntgenfilmkassette gegeben, mit Klarsichtfolie überdeckt, an den Ecken markiert und schließlich mit einem Röntgenfilm abgedeckt. Die Exposition erfolgte über eine Zeitspanne von wenigen Sekunden bis zu 20 min. Der Film wurde 1 min in den Entwickler getaucht, kurz mit Wasser abgespült und anschließend in ein Fixierbad gegeben. Um das Molekulargewicht der einzelnen Banden feststellen zu können, wurde der Größenmarker auf den fertig entwickelten Röntgenfilm übertragen.

6.3.5. Dot-Blot-Analyse

Für Proteinbindungsstudien wurde der Dot-Blot verwendet. Eine Nitrocellulosemembran wurde kurz in PBS eingetaucht und auf die Unterseite eines Filtrationsapparates gelegt. In die auf der Oberseite der Apparatur befindlichen runden Aussparungen wurde ein zu untersuchender Proteinbindungspartner, der in einem geeigneten Puffer gelöst worden war, auf die Nitrocellulosemembran getropft und anschließend die Apparatur fest verschlossen. Auf der Unterseite der Blotkammer wurde eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen und durch den verursachten Unterdruck die Probe auf die Nitrocellulosemembran übertragen. Um zu gewährleisten, dass alles Protein auf der Nitrocellulose immobilisiert worden war, wurde anschließend 3 x mit 200 µl HBSS gewaschen und das Protein mit Ponceau-Lösung angefärbt. Die Entfärbung des Blots erfolgte durch Waschen in PBS. Anschließend erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden eine Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 %iger Magermilch gelöst in PBS 0,05% Tween 20. Der mobile Ligand (pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His/pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio}/pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio}) wurde in einer 5 %igen Magermilchlösung in der Konzentration $c = 10 \mu\text{g/ml}$ gelöst. Die Nitrocellulosemembran wurde in eine Folie eingeschweist, mit der entsprechenden Proteinlösung überschichtet und für 2 Stunden bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Entfernung des nicht gebundenen Proteins erfolgte durch kurzes Eintauchen der Nitrocellulosemembran in PBS. Die Wahl des Primär- und Sekundärantikörpers richtete sich nach der Art des mobilen Bindungspartners. Die Inkubation des Antikörpers und der anschließende Protokollverlauf erfolgte wie unter Punkt 6.3.4. beschrieben.

6.3.6. Proteinaufreinigung

Proteine, die in dieser Arbeit generiert wurden, bestanden aus einer EZD des entsprechenden Membranproteins, auf die der Fc-Teil des humanen IgGs und eine Hexahistidin-Gruppe folgt. Um zu verhindern, dass Immunglobuline aus dem Serum von Protein-A gebunden werden, wuchsen die stabil transfizierten CHO-Zellen in einem Medium auf, dessen Serum Immunglobulin reduziert war. Die Zellen wurden auf T 175 Petrischalen ausgesät, über einen Zeitraum von 3 Tagen im Brutschrank kultiviert, ihr Mediumüberstand gesammelt und für einen weiteren Tag mit frischem Medium versorgt. Die beiden Mediumfraktionen wurden jeweils mit folgenden Proteaseinhibitoren pro 100 ml versehen: 100 µl Aprotinin, 70 µl Pepstatin, 50 µl Leupeptin. Anschließend wurde das Medium zuerst 5 min bei 900 rpm bei Raumtemperatur und darauf folgend mit 10 min bei 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert.

Die Proteinaufreinigung erfolgte mit Hilfe der Protein A-Affinitätschromatographie. Die Aufreinigung mit Hilfe der NTA-Nickelsäule wurde nicht durchgeführt.

6.3.7. Protein-A-Affinitätschromatographie

Protein-A stammt aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus*. Die Aufreinigung über Protein-A ist möglich, da sich der Fc-Teil im leicht alkalischen Milieu des Mediums reversibel an Protein A bindet und sich diese Bindung bei pH-Erniedrigung löst.

Die Protein-A-Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe einer Säule durchgeführt. Diese bestand aus einer 2,5 ml Spritze, in die 1 ml Protein A-Agarose gefüllt war. Um ein Auslaufen zu verhindern, wurde die Spritze über- und unterhalb der Agarose mit einer Fritte verschlossen. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml HBSS äquilibriert und mit ca. 1 l des gesammelten Mediums beladen. Der Durchfluss wurde auf verbleibende Reste des aufzureinigenden Proteins mit Hilfe des Immunoblots untersucht. Da das gesamte Protein von der Protein-A-Agarose gebunden werden konnte, wurde der Durchfluss verworfen. Um die Protein A-Agarose von Medium zu befreien, wurde sequentiell mit 20 ml HBSS gespült und mit 3x1 ml 20 mM Natriumcitrat-Lösung pH 5 gewaschen. Schließlich erfolgte die Elution des Fusionsproteins, indem 8 x 0,5 µl 20 mM Natriumcitrat-Lösung pH 2,4 auf die Säule gegeben wurde. Das Eluat wurde jeweils in 1 bzw. 0,5 ml Aliquots aufgefangen, vorsichtig mit 7 bzw. 15 µl 2 M Natriumcarbonat-Lösung neutralisiert und der pH mittels eines Lackmuspapiers überprüft. Falls der pH-Wert zu basisch geraten war, wurde dies durch Zugabe von 1 N HCl ausgeglichen. Anschließend wurden die Proben so schnell wie möglich wie unter Punkt 6.3.9. beschrieben dialysiert.

6.3.8. Gewinnung von Proteinen durch Lyse der CHO Zellen

Dieses Verfahren wurde bei der Fc-Zelllinie angewendet, da diese das Protein nicht in das Medium sezerniert. Die Zellen wurden auf 10 Petrischalen mit einer Grundfläche von 9,4 cm² ausgesät und 3 Tage lang im Brutschrank inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde das Medium entfernt, die Zellen 2 x mit PBS gespült und mit Hilfe eines Zellschabers in 500 µl Lysepuffer + 0,05 % Tween 20 pro 10⁷ aufgenommen und in 2 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert. Das Aufschließen der Zellen erfolgte durch repetitives Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei Raumtemperatur. Nach dem dritten Auftauen wurden die Zellen 10 min. lang bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde, um eine möglichst quantitative Bindung an Protein A zu gewährleisten, 7 x über eine Protein-A-Säule gegeben. Das Eluieren des Ig-Proteins erfolgte wie unter Punkt 6.3.7. beschrieben.

6.3.9. Dialyse

Die Dialyseschläuche mit einem Ausschlussmolekulargewicht von 8.000-10.000 wurden in einem Becherglas mit demineralisiertem Wasser und einer Spatelspitze EDTA in der Mikrowelle aufgekocht. Um überschüssiges EDTA zu entfernen, wurden die Schläuche anschließend nur mit demineralisiertem Wasser aufgekocht. Der in der Länge geteilte Schlauch konnte in eine Mikrodialyse eingespannt werden, in deren unteren Bereich der Puffer HBSS vorlag. In die oberen Vertiefungen, d.h. auf den Dialyseschlauch wurden die zu dialysierenden Proben pipettiert. Eine ständige Verteilung des Puffers wurde durch einen Rührfisch gewährleistet. Mit Hilfe einer Spritze wurde HBSS im Abstand von je einer Stunde mindestens 3 Mal ausgetauscht. Anschließend erfolgt eine Dialyse über Nacht. Die Dialyse erfolgte durchgehend bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde die dialysierte Proteinlösung aus der Mikrodialyse pipettiert, in Eppendorfgefäße aliquotiert, auf Degradation und Identität durch Coomassie-Anfärbung und Immunoblot-Analyse untersucht und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford wie unter Punkt 6.3.10. beschrieben bestimmt.

6.3.10. Bradford-Analyse

Das Prinzip der Proteinkonzentrationbestimmung nach Bradford (1976) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums (von 465 nm auf 595 nm) verursacht durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie Blau an die Proteine in saurer Lösung (Bradford

Reagenz, Roth Karlsruhe). Dabei ist die Zunahme der Absorption photometrisch bei 595 nm im Bereich von 0,1-1,0 mg proportional zur Proteinkonzentration. Mit Hilfe eines Proteinstandards (BSA 0,1-1,0 mg/ml HBSS), konnten die Konzentrationen der dialysierten Proteinlösung bestimmt werden. Hierzu wurden 10 µl der Proteinlösung mit 1 ml Bradford Reagenz vermischt und nach einer Inkubationszeit von 10 min die Absorption bei 595 nm gemessen.

6.3.11. Biotinylierung

Um bei Bindungsstudien den Einsatz von mehreren Antikörpern und die daraus folgende Fehlerspannbreite zu vermeiden, wurde ein Proteinbindungspartner biotinyliert.

Wie bereits unter Punkt 6.3.9. beschrieben, wurde der Dialyseschlauch in die Mikrodialyseapparatur eingespannt und die Proben eingefüllt. Bei der Biotinylierung wurde statt HBSS als Puffer 25 mM Borsäure pH 8,5 verwendet. Nach jeweils einer Stunde wurde der Puffer drei Mal gewechselt und in die zu dialysierende Probe ein 10-fach molarer Überschuß von NHS-Biotin gegeben. Nach zwei Stunden folgte erneut ein Pufferwechsel und eine weitere NHS-Biotin Zugabe. Die Reaktion wurde nach 2 Stunden durch Zugabe von 10 µl gesättigter Glycinlösung gestoppt und über Nacht als Dialysepuffer HBSS eingesetzt. Dialysierte Proteine wurden auf Menge, Degradation und Biotinylierungseffizienz mit Hilfe des Bradford- und Immunoblot-Assays untersucht und anschließend in Aliquots bei -20°C tiefgefroren. Das Biotin konnte durch Bindung von Peroxidase-markiertem Streptavidin (1:1500) durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden (siehe Punkt 6.3.3.).

6.3.12. Beschichtung von Protein-A-Mikroperlen

10 µl einer Lösung von Protein-A beschichteten Polystyrenmikroperlen (Durchmesser 2,8 µm) wurden 3 x mit 100 µl 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) in einem Eppendorf Gefäß gewaschen. Im Anschluss an den Waschschrift wurde das Gefäß in einen Magnethalter gestellt und die Flüssigkeit konnte von den an der Gefäßwand magnetisch haftenden Perlen abpipettiert werden. Anschließend wurden die Mikroperlen zusammen mit 100 µl 0,5 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) und 10 µg des zu beschichtenden Proteins über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad bei 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die so beschichteten Perlen 3 x mit 0,1 M Natriumphosphatlösung (pH 8,1) und 3 x 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) umgepuffert, 45 min in 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) und mit 0,54 mg DMP bei RT auf einem Drehrad inkubiert. DMP diente als Quervernetzer zwischen Protein A und dem Fc-Teil des entsprechenden Fusionsproteins. Anschließend wurden die Mikroperlen 2 x mit 100 µl 0,2 M

Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen und für 2 Stunden auf dem Drehrad inkubiert, um restliche Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurden die Mikroperlen 3 x 5 min mit HBSS gewaschen und in HBSS bei 4°C auf dem Drehrad bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Perlen waren maximal 2 Wochen in Gebrauch, da nach diesem Zeitpunkt die Möglichkeit des Bakterienbefalls und der Proteindegradierung zu groß war.

6.3.13. Beschichtung von Epoxyagaroseperlen

0,1 g Epoxyagaroseperlen wurden zum Quellen über einen Zeitraum von 5 min. in 1 ml 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat aufgenommen. Das Waschen der Perlen erfolgte jeweils über 5 min. mit 1 ml 1 M Ammoniumsulfat/0,1 M Natriumborat pH 8,0. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Perlen in 100 µl Ammoniumsulfat/0,1 M Natriumborat pH 8,0 aufgenommen.

Für die Beschichtung der Perlen wurden 40 µg Fusionsprotein pro 100 µl Perlen benötigt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei 4°C und 200 rpm und am nächsten Tag bei RT über 2 h inkubiert. Das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl einer 1 M Ethanolaminlösung pH 8,0 in PBS über einen Zeitraum von 1 h bei RT. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde das Pelett in jeweils 4 x 1 ml HBSS gewaschen und schließlich zum Gebrauch in 100 µl HBSS aufgenommen und schließlich bei 4°C gelagert.

6.3.14. Beschichtung von CNBr-aktivierten Perlen

Der Vorteil der Epoxyperlen und CNBr-aktivierten Perlen gegenüber den Protein-A Perlen ist die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem zu beschichtendem Fusionsprotein und der Perle.

0,2 g gefriergetrocknetes Puder wurden in einer 3 ml Spritze gegeben und oben sowie unten durch eine Fritte begrenzt. Das Säulenmaterial wurde mit 40 ml 1 mM HCl gewaschen. Anschließend wurden die Perlen in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit 1 mM HCl überführt und ein weiteres Mal für 5 min bei 200 rpm und RT gewaschen. Auf 0,1 g Perlen folgte eine Beschichtung mit 500 µg Fusionsprotein. Zu der Mischung wurden 500 µl Kopplungspuffer gegeben. Die Kopplung des Proteins an die Perlen erfolgte bei 4°C unter 200 rpm und über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte nach Absinken der Perlen durch Sedimentation und Entfernung des Überstandes ein Blockieren der freien Bindungsstellen durch Inkubation der Perlen in Gegenwart von 0,2 M Glycinlösung pH 8,0 bei RT und 4 h. Nach Überführen der Perlen in die Spritze, die bereits zum Quellen benutzt wurde, wurde 5 x abwechselnd mit je 20 ml Kopplungspuffer (0,2 M Natriumhydrogencarbonat, 0,5 M Natriumchlorid; pH 8,3) und

Natriumacetat-Lösung (0,1 M Natriumacetat, 0,5 M Natriumchlorid; pH 4,0 eingestellt mit Essigsäure) gewaschen. Anschließend wurden die Perlen zusammen mit HBSS und 0,01 % Natriumazid in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und bei 4°C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurden die Perlen mit 1,5 ml HBSS/0,5 % BSA gewaschen.

6.3.15. ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

Der ELISA-Test kann zur Bestimmung der Bindungsstärke zwischen Proteinen eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit diente er für Bindungsstudien zwischen den Proteinen N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His.

Der ELISA erfolgte nach folgendem Schema:

0,5 µg des zu untersuchenden immobilisierenden Proteins wurden in 100 µl 50 mM Natriumhydrogencarbonat-Lösung pH 9,8 gelöst und in jeweils eine Vertiefung einer 96-well Polystyrenplatte gegeben. Um bei der Auswertung des Versuches einen Mittelwert erhalten zu können, wurden pro Platte 7 Reihen mit jeweils 3 wells mit dem zu untersuchenden immobilisierenden Protein bedeckt. Die anschließende Oberflächenbeschichtung erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler. Für das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen, wurde nach Entfernen der Proteinlösung in jede Vertiefung eine 5 %ige BSA Lösung in HBSS für 90 min bei RT gegeben. Anschließend wurde 10 x mit 200 µl HBSS gewaschen. Die mobilen Proteine lagen gelöst in 100 µl HBSS + 1 % BSA vor. Ihre Zugabe erfolgte nach folgendem Schema: in die oberste Reihe wurde pro Vertiefung die maximale Menge gegeben: 6 µg. Anschließend erfolgte eine Proteinzugabe in absteigender Konzentration: 4 µg, 2 µg, 1 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg und 0,0625 µg. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler wurden die Proteine entfernt und die Platte mit 3 x 100 µl HBSS + 1% BSA Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift für 5 min bei RT.

Pro Vertiefung wurden 100 µl Streptavidin_{AP} (Alkalische Phosphatase) in einer Verdünnung von 1:1000 in HBSS über einen Zeitraum von 30 min bei RT verwendet. Nach Entfernen des Antikörpers erfolgte ein 5 minütiges Waschen mit 2 x 100 µl HBSS/1% BSA. Um eine potentiell schwache Bindung zwischen den Bindungspartnern nicht zu stören, wurde die Waschlösung auf 4°C abgekühlt. Da das für die ELISA-Reaktion notwendige Substrat in Dig 3 Puffer gelöst wurde, erfolgte der letzte Waschschrift 5 min lang mit 100 µl Dig 3 Puffer pro Vertiefung.

Die ELISA-Reaktion ist eine magnesiumabhängige Enzymreaktion. 48 µl der Substratlösung wurden in 12 ml Dig 3-Puffer und 50 mM Magnesiumchlorid x 6 H₂O gelöst. Unmittelbar vor Messbeginn wurde die Waschlösung entfernt und 100 µl der frisch vorbereiteten Lösung in

jede zu untersuchende Vertiefung pipettiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 405 und 450 nm. Die in den Untersuchungen gewonnenen Absorptionsveränderungen wurden entsprechend der Funktion $B(x) = B_{\max}(1 - e^{-k_B x})$ graphisch dargestellt. Zur Bestimmung der Stärke der Wechselwirkung (sogenannte apparente Dissoziationskonstante- K_D) wurde die Konzentration bestimmt, bei der der immobile Ligand zum mobilen Liganden eine halbmaximale Bindung zeigte.

6.4. Mikroskopie

6.4.1. Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen in Petrischalen auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm ausgesät. Die konfluenten Zellen wurden 10 min. lang mit 2 % Formalin (in PBS) fixiert, daran anschließend 3 x 5 min mit PBS gewaschen und 5 min. mit 0,1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Alternativ wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol für 1 min fixiert und permeabilisiert. Nachdem die Deckgläschen mit PBS gewaschen worden waren, wurden sie aus den Petrischalen genommen und auf Objektträger gelegt. Diese befanden sich in einer Kammer, deren Boden mit feuchten Tüchern ausgelegt worden war. Das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch Zugabe von BSA/NGS für 30 min. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit dem Primärantikörper (siehe 5.13.1.) bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit dem entsprechend spezifischen und markierten Sekundärantikörper (siehe 5.13.2.) 45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Vor und nach der Inkubation erfolgte 3 x ein Waschen mit PBS. Um die Salze zu entfernen, wurden die Deckgläschen kurz in destilliertes Wasser getaucht, an Papier abgetupft und mit der Zellseite nach unten in NPG eingebettet.

Als Negativkontrolle wurden Immunfluoreszenzen in Abwesenheit des Primärantikörpers durchgeführt. In allen Fällen wurde keine unspezifische Fluoreszenz beobachtet.

6.4.2. Laserpinzette

Seit einigen Jahren wird in den Biowissenschaften die Laserpinzette vermehrt eingesetzt (Ashkin et al., 1970).

Die Technik der Laserpinzette beruht auf folgendem Prinzip: Ein Strahl eines Infrarotlasers ($\lambda=1064$ nm) wird in ein Mikroskopobjektiv gelenkt und von diesem in die Objektebene fokussiert. Mit Hilfe dieses Laserstrahls ist es möglich kleine Partikel wie beispielsweise Mikroperlen einzufangen und zu bewegen, da diese aufgrund ihres elektrischen Dipols in einem Lichtgradienten immer in die Region mit der höchsten Lichtintensität wandern. Mit

Hilfe dieses Prinzips bleiben sie unter Voraussetzung der freien Beweglichkeit auch bei Bewegung des Lasers oder der Unterlage immer im Laserstrahl. Mit Hilfe einer Videokamera wird die Bewegung der laserfokussierten Mikroperlen auf einem Bildschirm visualisiert.

An der Laserpinzette wurde die Haftung von Mikroperlen, die mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His und Fc beschichtet waren, an PC12-Zellen untersucht.

6.4.2.1. Messungen mit der Laser-Pinzette

PC12-Zellen wurden auf sterile runde Deckgläschen (Durchmesser 22 mm) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die Deckgläschen auf einen Metallobjektträger mit passgenauer Fräsung gelegt, der eine Betrachtung des Deckglases in Ölimmersion von unten erlaubte. Die Zellen wurden mit 200 µl dekomplementiertem DMEM-Medium bedeckt und mit 10 µl Mikroperlen-Suspension, die mit dem zu untersuchenden Protein beschichtet waren, versehen. Eine 30 minütige Inkubation ermöglichte ein Absinken der Perlen auf die Zellen. Anschließend wurden die Mikroperlen durch Verschieben der Kulturschale in einen Laserstrahl positioniert. Nicht gebundene oder schwach gebundene Mikroperlen wurden am Fokus eingefangen und verschoben. Dagegen konnten Perlen, die eine feste Verbindung mit Zellen eingingen, nicht mit Hilfe des Lasers bewegt werden. Die Bindungseigenschaften konnten durch den prozentualen Anteil der Perlen, die sich bei einer definierten Laserleistung von 42 mW nicht von der Zelloberfläche bewegten quantifiziert werden.

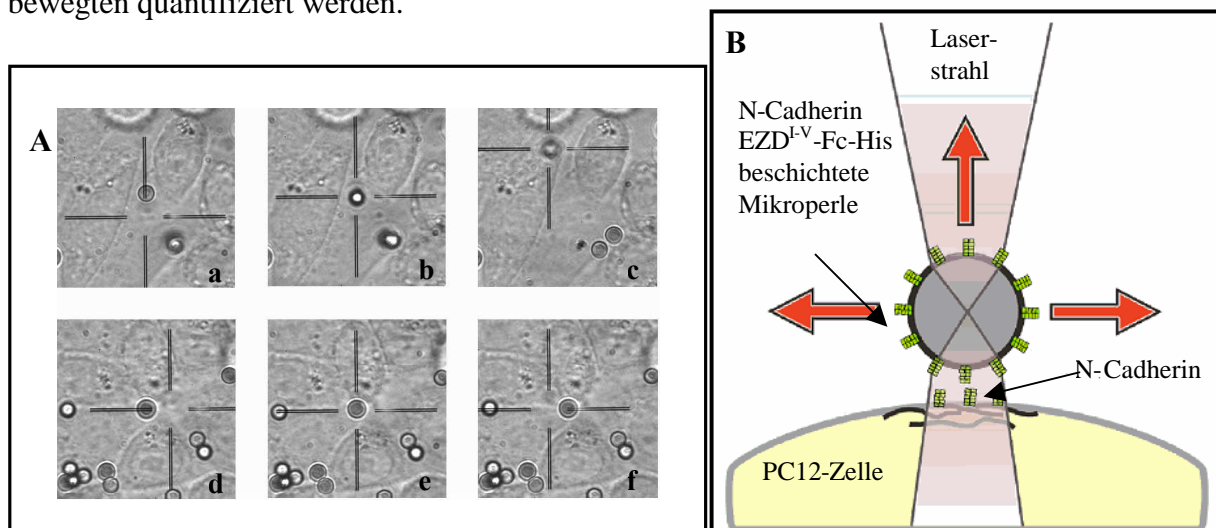


Abb. 20: Prinzip der Laserpinzette

A: Zwei Bildfolgen einer Messung mit der Laserpinzette: In der oberen Reihe (a-c) wird eine lose Perle in Bild b vom Laserstrahl erfasst und mit nach oben gezogen. Die untere Reihe (d-f) zeigt eine gebundene Perle, die an ihrem Platz bleibt, als der Laserstrahl versucht, diese aus dem Fokus zu bewegen.

B: Eine N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichtete Mikroperle im Fokus eines Laserstrahls haftet an N-Cadherin der Zelloberfläche von PC12-Zellen.

7. Schematische Darstellung von N-Cadherin und FGFR-1 spezifischen Expressionsvektoren

7.1 Generierung von pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His

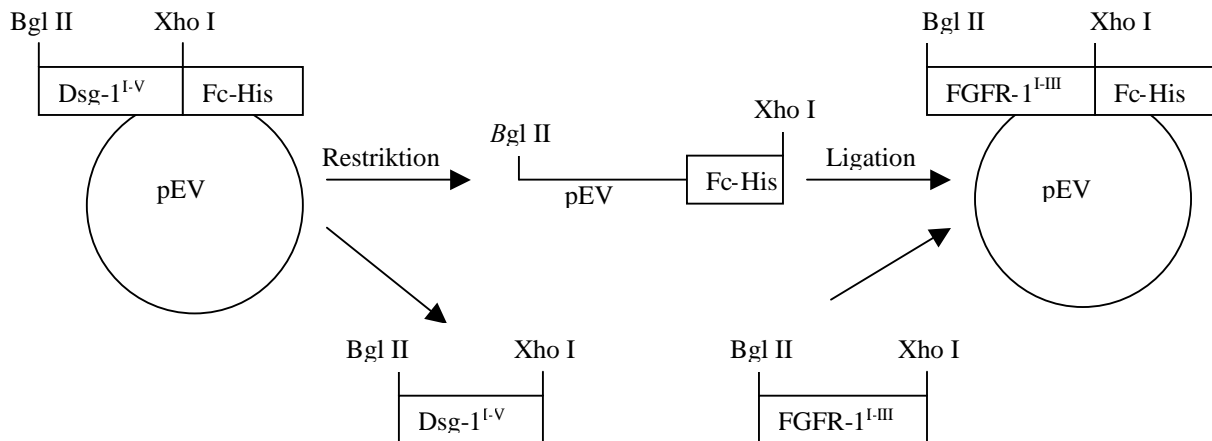


Abb. 21: Generierung von pEV-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His:

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Xho I wurde die Dsg-1-cDNA aus pEV-mod-Dsg-1-EZD^{I-V}-Fc-His entfernt. Die für FGFR-1-EZD^{I-III} kodierende cDNA wurde aus FGFR-1-full length Maus mit Hilfe einer PCR amplifiziert, mit Bgl II und Xho I behandelt und zusammen mit dem gleichermaßen Bgl II und Xho I behandelten Vektor pEV-Fc-His ligiert. Der hieraus entstandene Vektor wurde pEV-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His genannt.

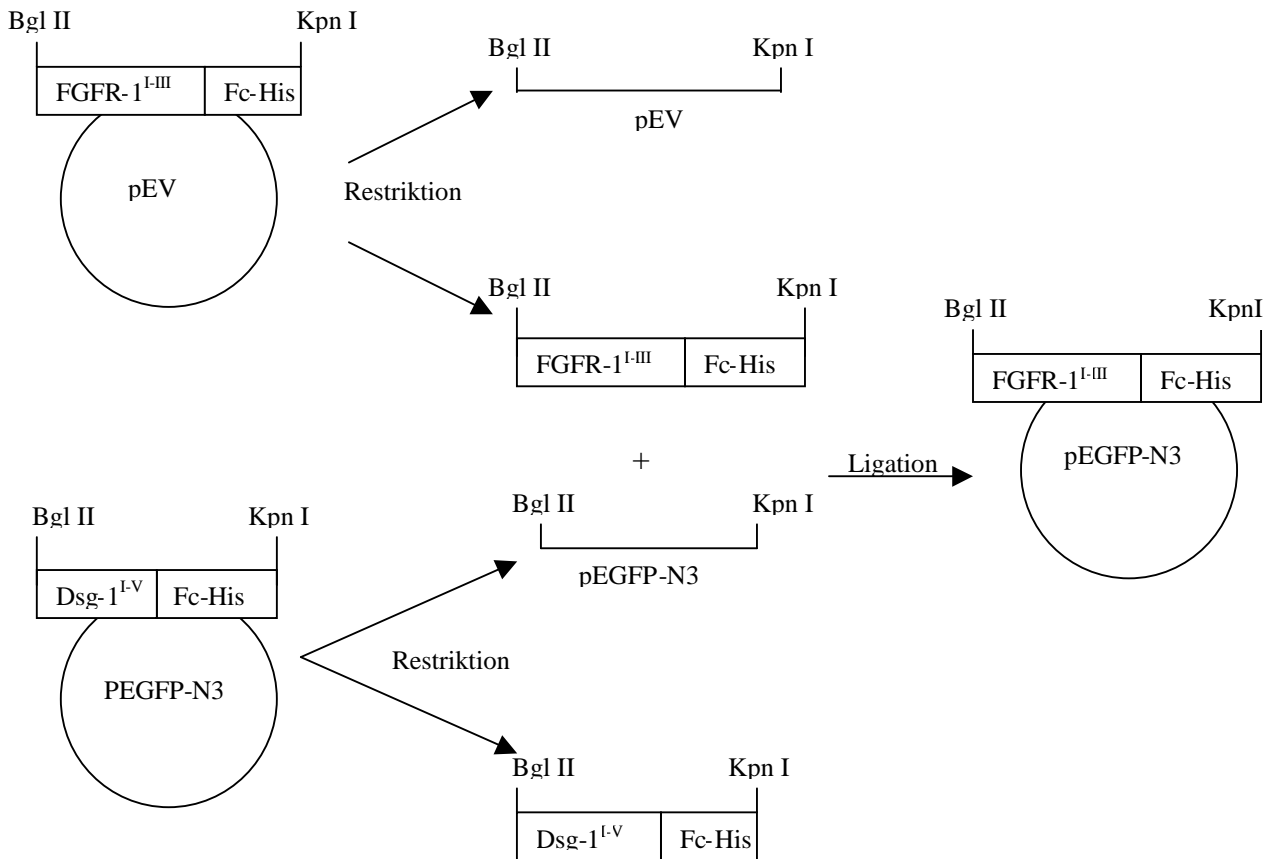


Abb. 22: Generierung von pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His:

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Kpn I wurden die FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His-cDNA aus pEV-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His- und die Dsg-1-Fc-His-cDNA aus pEGFP-N3-Dsg-1-EZD^{I-V}-Fc-His entfernt. Die FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His-cDNA zusammen mit dem Bgl II/Kpn I behandeltem pEGFP-N3 ergaben nach Ligation den Expressionsvektor pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His.

7.2. Generierung von pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His

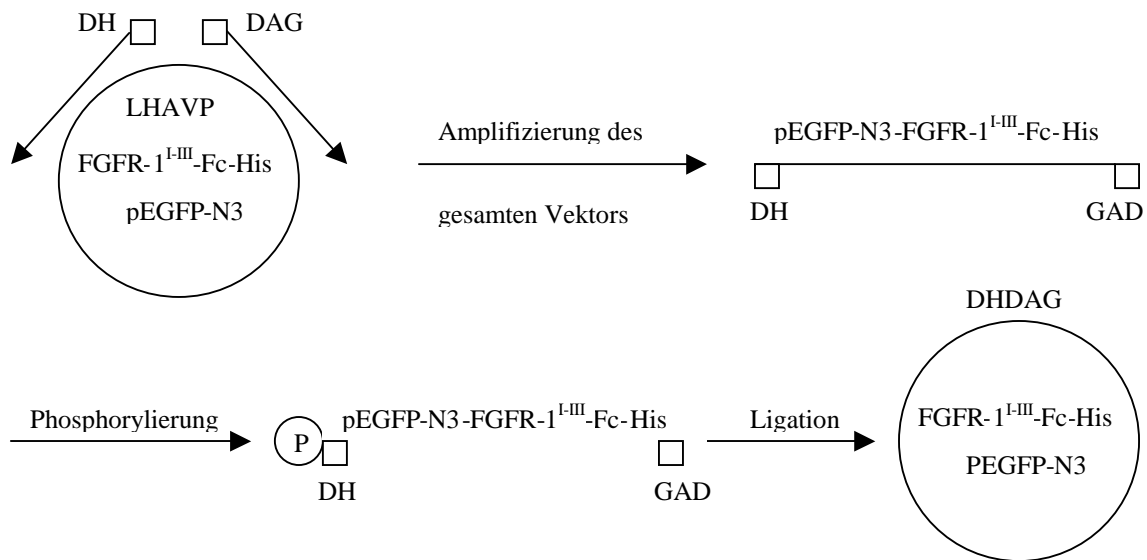


Abb. 23: Generierung von pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)EZD^{I-III}-Fc-His:

Mit Hilfe einer inversen PCR wurde das gesamte Plasmid amplifiziert. Über Oligonukleotide wurden zwischen der ersten und zweiten EZD von FGFR-1 die Aminosäuren LHAVP gegen DHDAG ausgetauscht. Nach Phosphorylierung des 5'-Endes des linearisierten Konstruktes pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His erfolgte eine Ligation und ergab das Plasmid pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His.

7.3. Generierung von pDsRed-C1-FGFR-1

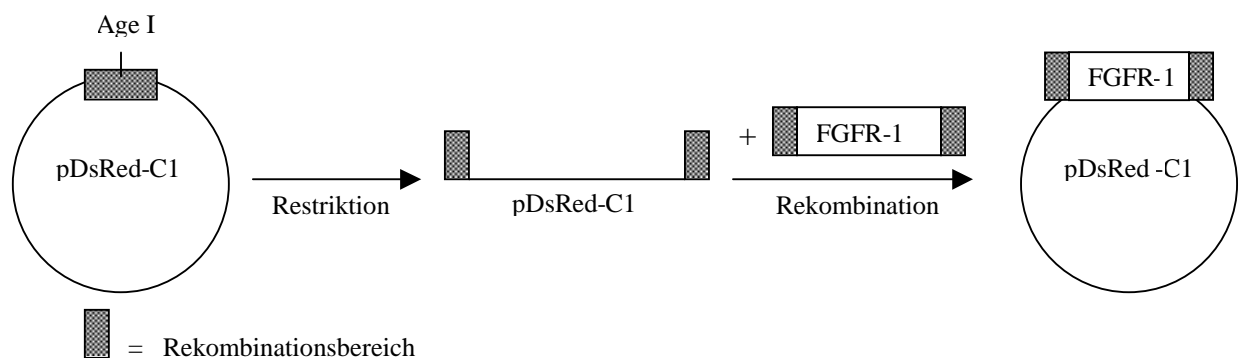


Abb. 24: Generierung von pDsRed-FGFR-1:

Die FGFR-1-cDNA wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Das Plasmid pDsRed-C1 wurde durch Restriktionsverdau mit Hilfe des Enzyms Age I auf die Rekombination mit der FGFR-1-cDNA vorbereitet.

7.4. Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His

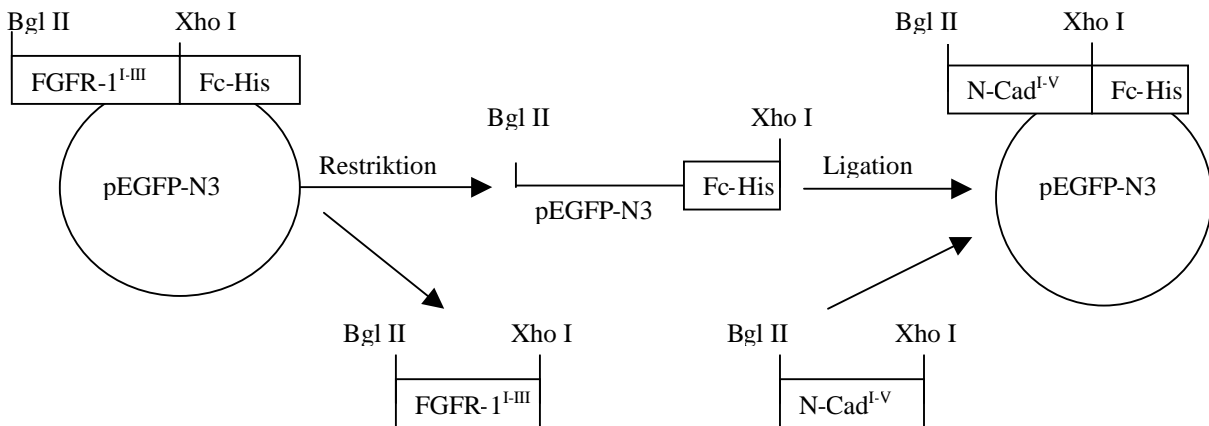


Abb. 25: Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His:

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Xho I wurde die FGFR-1-EZD^{I-III}-cDNA aus pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His entfernt. Das N-Cadherin-EZD^{I-V}-cDNA-Fragment wurde durch eine PCR gewonnen und mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Xho I behandelt. Die Ligation der Bgl II und Xho I kompatiblen N-Cadherin-EZD^{I-V}- und Vektor pEGFP-N3-Fc-His-Fragmente ergab das Plasmid pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His.

7.5. Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His

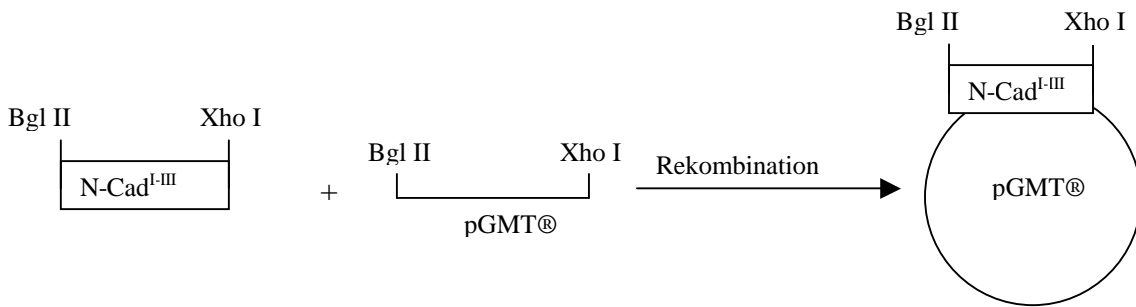


Abb. 26: Generierung von pGMT[®]-N-Cadherin-EZD^{I-III}:

Die N-Cadherin-EZD^{I-III}-cDNA wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert und in pGMT[®] zwischenkloniert. Der Klon pGMT[®]-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His wurde durch eine Sequenzierung auf Mutationen überprüft.

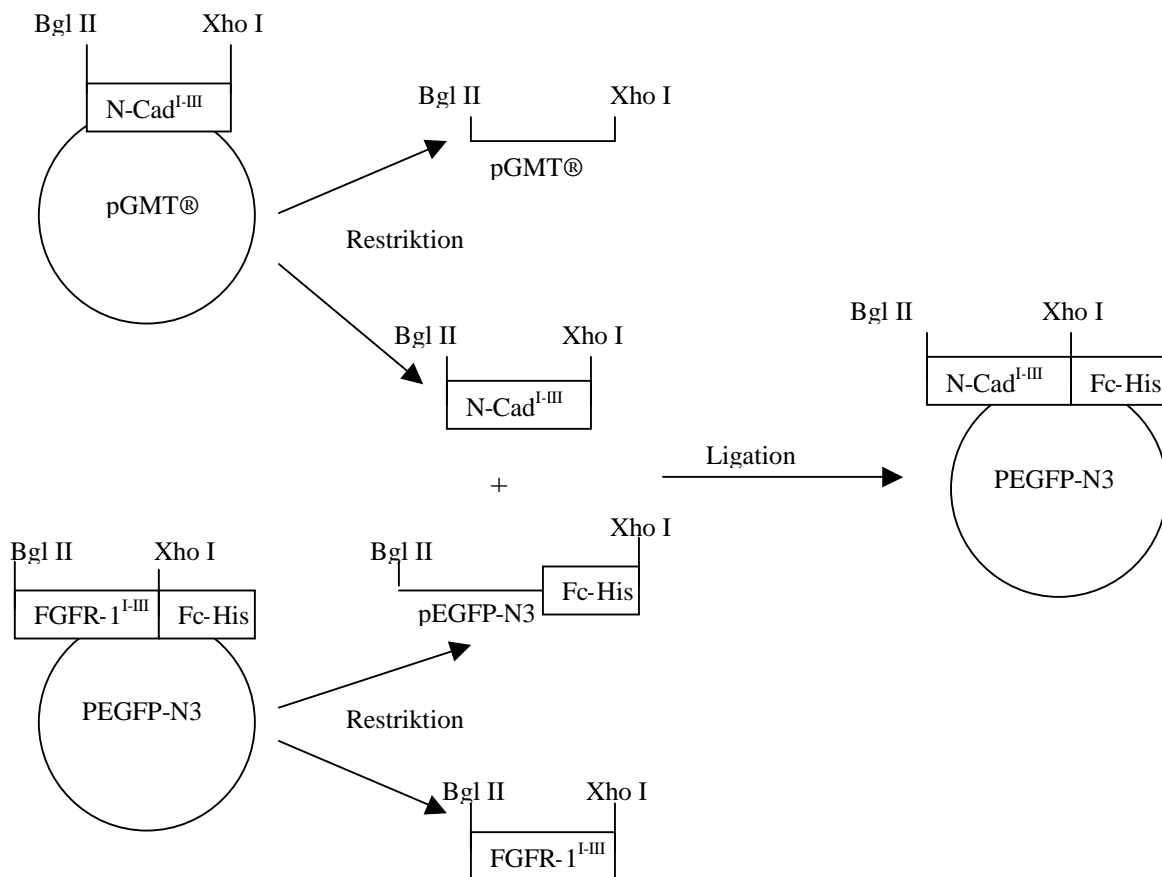
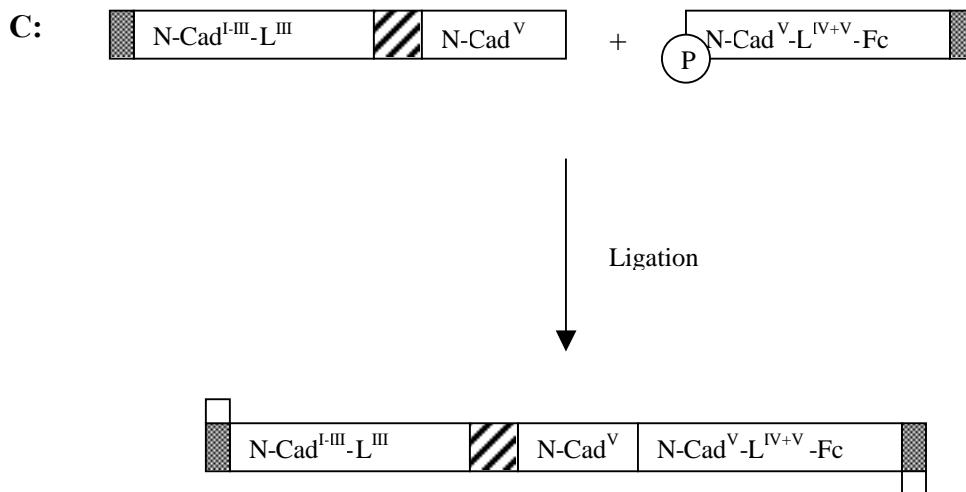
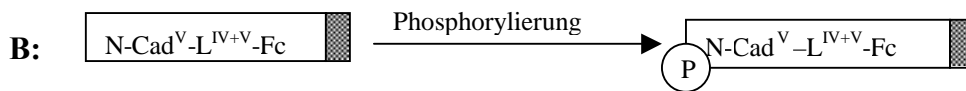
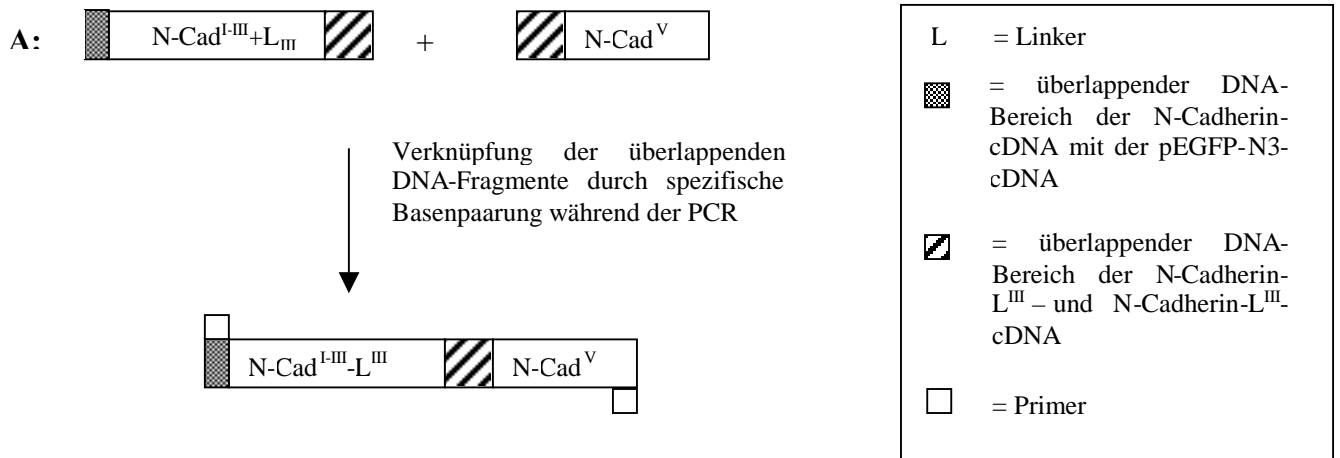


Abb. 27: Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His:

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Xho I wurde aus pGMT[®] die N-Cadherin EZD^{I-III}-cDNA und aus pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His die FGFR-1-EZD^{I-III}-cDNA deletiert. Die so vorbereiteten DNA-Fragmente wurden miteinander ligiert und der daraus resultierende Vektor pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His genannt.

7.6. Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{IV+V}-Fc-His



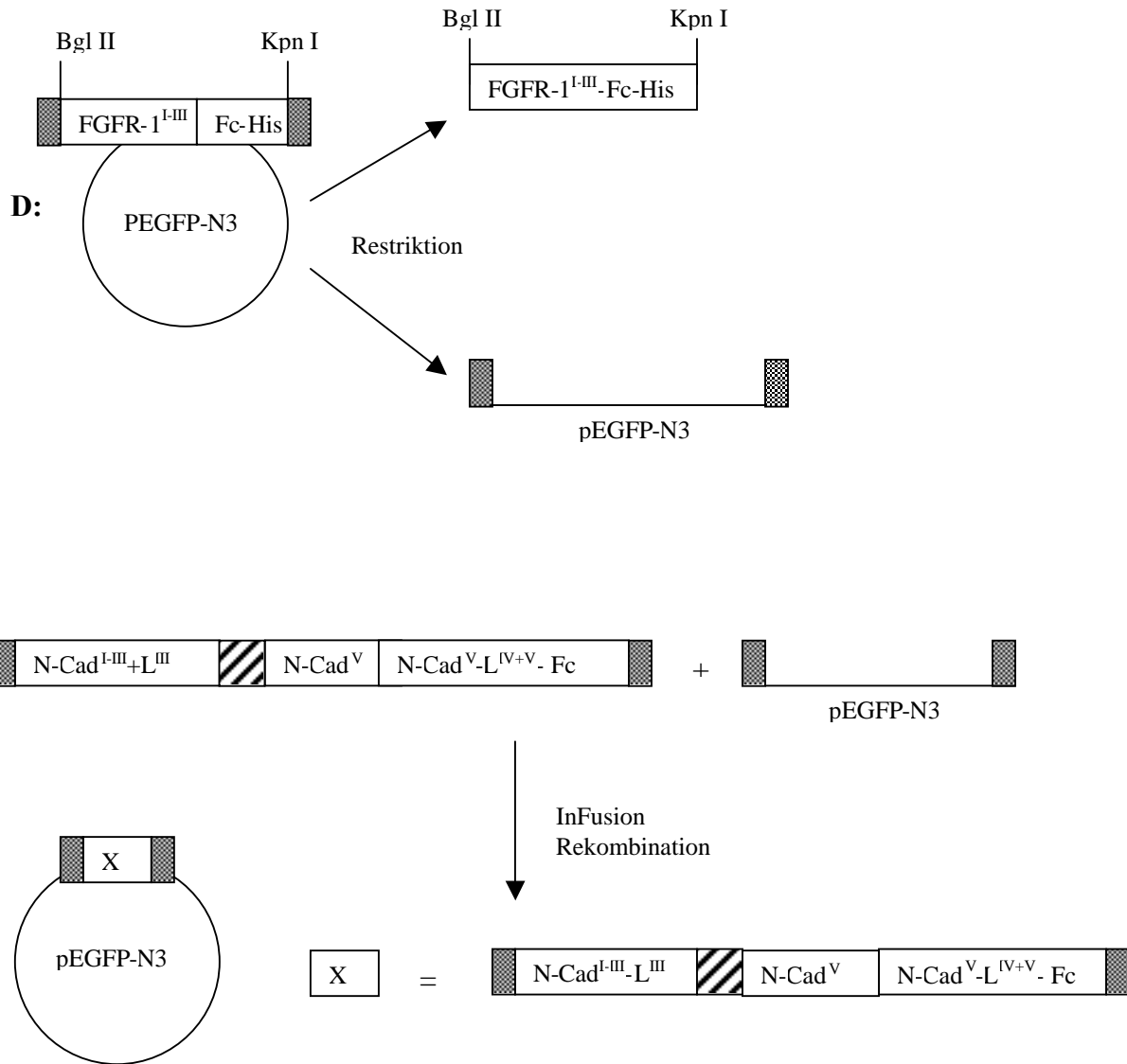


Abb. 28: Generierung des Amplifikats N-Cadherin-EZD^{I-III}-L^{III+V+V}-Fc-His:

A: Die N-Cadherin-EZD^{I-III}-L^{III}- und N-Cadherin-EZD^V-cDNA wurden jeweils mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Da durch überlappende DNA-Bereiche eine spezifische Basenpaarung möglich war, konnten die DNA-Fragmente mit Hilfe einer PCR miteinander verbunden werden. Es entstand das Amplifikat N-Cadherin-EZD^{I-III+V}-L^{III}.

B: Die N-Cadherin-EZD^V-L^{IV+V}-Fc-His wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert und anschließend am 5'-Ende phosphoryliert.

C: Durch Ligation der erhaltenen DNA-Fragmente N-Cadherin-EZD^{I-III+V}+L^{III} und N-Cadherin-EZD^V+L^{IV+V}-Fc-His (phosphoryliert) entstand die N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His cDNA.

D: Aus pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His wurde durch die Restriktionsenzyme Bgl II und Kpn I das DNA-Fragment FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His entfernt. Der linearisierte Vektor pEGFP-N3 wurde mit N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His-DNA in einer InFusion-Rekombination miteinander verknüpft.

7.7. Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin

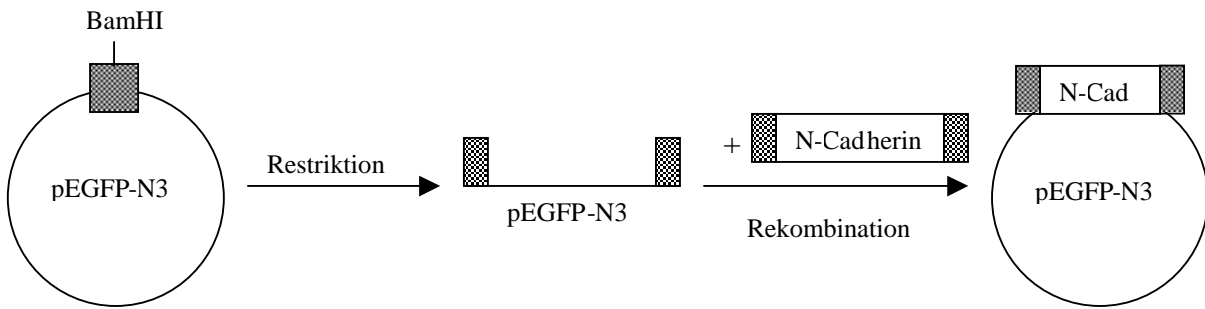


Abb. 29: Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin:

Die N-Cadherin-cDNA wurde mit Hilfe einer PCR amplifiziert. Das Plasmid pEGFP-N3 wurde mit Hilfe des Enzyms BamHI linearisiert und zusammen mit der N-Cadherin cDNA in einer InFusion Rekombination miteinander verknüpft.

7.8. Generierung von pEGFP-N3-Fc-His

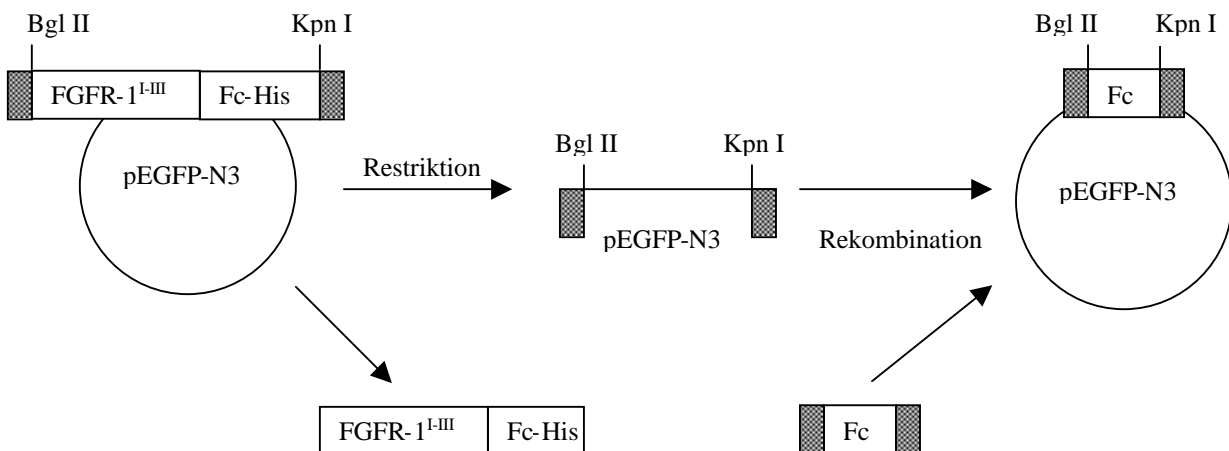


Abb. 30: Generierung von pEGFP-N3-Fc-His:

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Kpn I wurde die FGFR-1-EZD^{I-III}-cDNA aus pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His entfernt. Das Fc-His DNA-Fragment wurde durch eine PCR gewonnen und konnte zusammen mit dem linearisierten Vektor pEGFP-N3 in einer InFusion Rekombination miteinander verknüpft werden.

7.9. Sequenzangaben

In dieser Arbeit verwendete Vektoren kodierten für folgende cDNA-Sequenzen:

- Cadherin-2-mRNA (Maus), vollständige cDNA: BC022107
- Fibroblastenwachstumsfaktor Rezeptor-1 mRNA (Maus), lange Isoform, vollständige cDNA: U22324
- Immunglobulin schwere Kette mRNA (Mensch), vollständige cDNA: BC041037

cDNA-Sequenz	Protein	Expressionsvektor
Fc DNA; bp 787-1482	Fc	pEGFP-N3-Fc-His
FGFR-1 DNA; bp 58-1185	FGFR-1 EZD ^{I-III}	pEGFP-N3-FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His
FGFR-1 DNA; bp 550-564	FGFR-1 EZD ^{I-III} LHAVP→DHDAG	pEGFP-N3-FGFR-1 _(mut) -EZD ^{I-III} -Fc-His
FGFR-1 DNA; bp 58-2526	FGFR-1	pDsRed-C1-FGFR-1
N-Cadherin DNA; bp 853-2319	N-Cadherin EZD ^{I-III}	pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III} -Fc-His
N-Cadherin DNA; bp 853-2994	N-Cadherin EZD ^{I-V}	pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His
N-Cadherin DNA; bp 853-2355	N-Cadherin EZD ^{I-III+L^{III}}	pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III+V+V-L^{III+IV+V}} -Fc-His
N-Cadherin DNA; bp 2677-2955 bp	N-Cadherin EZD ^V	
N-Cadherin DNA; bp 2641-2994 bp	N-Cadherin EZD ^{V-L^{IV+V}}	
N-Cadherin DNA; bp 853-3573	N-Cadherin	pEGFP-N3-N-Cadherin

Tabelle 3: Auflistung der Abschnitte der cDNA-Sequenz, die im geeigneten Expressionsvektor für das entsprechende Protein kodiert.

8. Ergebnisse

Um das Bindungsmodell zwischen der extrazellulären Domäne (EZD) von N-Cadherin an FGFR-1 auf zellulärer und biochemischer Ebene überprüfen zu können, wurden beide Proteine und ihre Derivate in Säugetierzellen hergestellt. Hierzu wurden die entsprechenden cDNAs in ein geeignetes Expressionssystem kloniert und anschließend mit diesen CHO-Zellen transfiziert.

Die Konstruktion der Expressionsvektoren soll im folgenden näher beschrieben werden:

8.1. Molekularbiologische Versuche

Konstrukte, die hergestellt wurden:

Nummer	Konstrukt	Expression	Verwendung
1	pEV-FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His	nicht untersucht	Klonierung
2	pEGFP-N3-FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His	stabil	proteinbiochemisch und zellbiologisch
3	pEGFP-N3-FGFR-1 _(mut) -EZD ^{I-III} -Fc-His	stabil	proteinbiochemisch
4	pDsRed-FGFR-1	transient	zellbiologisch
5	pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His	stabil	zellbiologisch und proteinbiochemisch
6	pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III} -Fc-His	stabil	zellbiologisch und proteinbiochemisch
7	pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD ^{I-III+V+V} -L ^{III+IV+V} -Fc-His	nicht untersucht	Konstrukt verbleibt nicht in Zellen
8	pEGFP-N3-N-Cadherin	transient	zellbiologisch
9	pEGFP-N3-Fc-His	stabil	Zelllinie produziert nicht

Tabelle 4: Verzeichnis der hergestellten Konstrukte und ihre anschließende Expression und Verwendung.

Da alle von diesen Konstrukten gebildeten Proteine Fc-His Fusionsproteine darstellen, erfolgte die Namensgebung dieser Proteine innerhalb der Graphiken und Abbildungen der vorliegenden Arbeit ohne die zusätzliche Bezeichnung Fc-His.

Alle in Tabelle 2 aufgeführten Konstrukte wurden auf Basis der Expressionsvektoren pEGFP-N3 bzw. DsRed-C1 generiert.

War es das Ziel das gebildete Protein für Bindungsstudien zu verwenden, wurde die für pEGFP-N3 kodierende cDNA durch die Einführung eines Stop-Codons so modifiziert, dass die Translation eines GFP-Fusionsproteins verhindert wurde.

Dieser Vektor wurde mit Ausnahme des Vektors pEGFP-N3-N-Cadherin zur Herstellung sämtlicher pEGFP- N3- Konstrukte eingesetzt.

8.1.1. Generierung von FGFR-1 und N-Cadherin exprimierenden Vektoren

Für die Generierung der FGFR-1 und N-Cadherin exprimierenden Vektoren wurden unterschiedliche Klonierungsstrategien durchgeführt. Diese sind in Punkt 7 graphisch dargestellt.

8.1.1.1. Generierung FGFR-1 exprimierender Vektoren

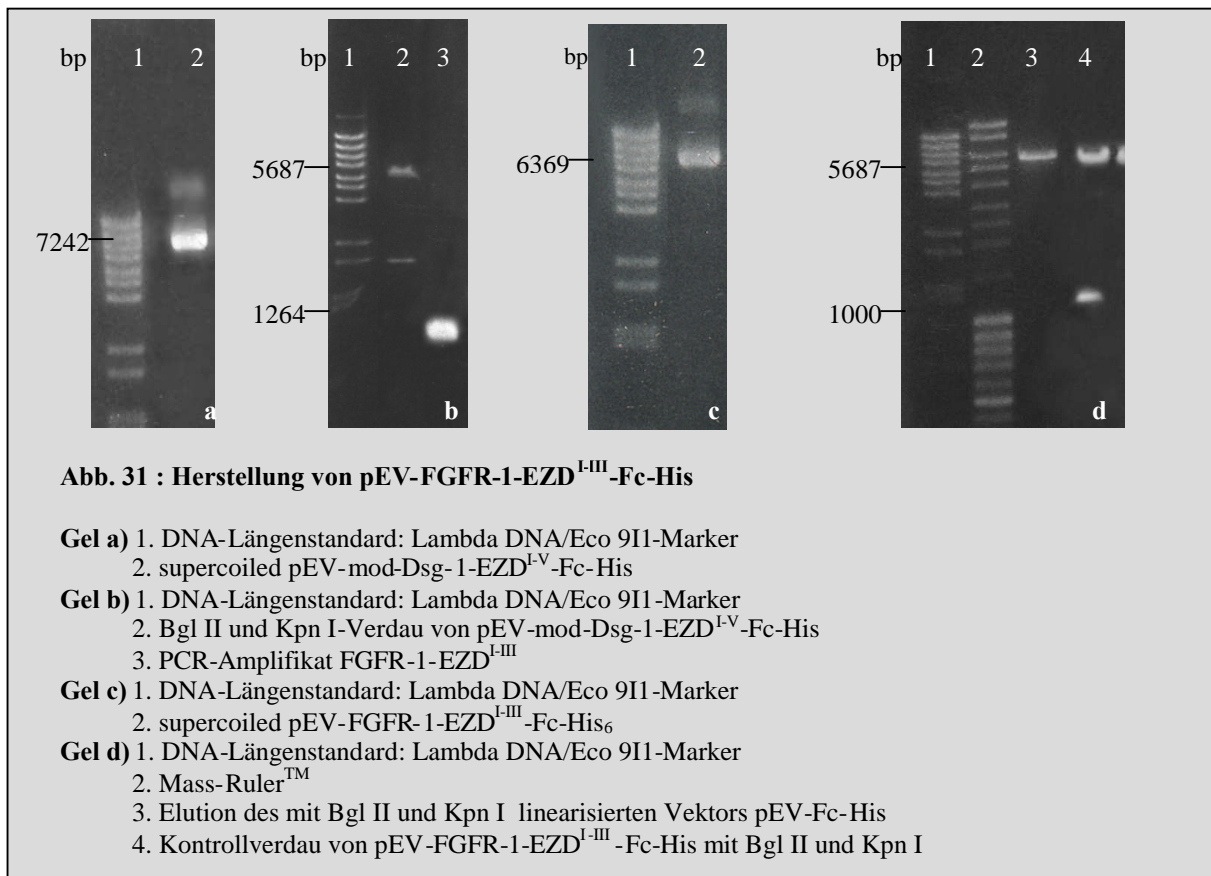
8.1.1.1.1. Konstruktion von pEV-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His

Um FGFR-1 über eine Protein-A-Säule aufzureinigen zu können, war es notwendig ein Fusionsprotein herzustellen, das mit einem Fc-Teil des humanen Immunglobulins G (IgG) versehen ist. Daher diente als Ausgangsplasmid der Vektor pEV-mod-Dsg-1-Fc-His (7,3 kbp) (siehe 5.11.4.). Dieses besteht ausgehend vom Aminoterminus aus der extrazellulären Domäne von Dsg-1, einem Fc und 6 Histidinresten (6 x His), die gegebenenfalls auch eine Aufreinigung über eine NTA-Nickelsäule ermöglichen.

Ziel war es mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Xho I die für Dsg-1 (1,9 kbp) kodierende cDNA herauszuschneiden und durch die cDNA, die für die 3 extrazellulären Domänen (EZD^{I-III}) von FGFR-1 (1,1 kbp) kodieren, zu ersetzen. Das FGFR-1 EZD^{I-III} Fragment wurde mit Hilfe einer PCR unter Verwendung der Polymerase Pfu und der als Matrize dienenden Maus-FGFR-1 cDNA amplifiziert (siehe Abb. 21b Spur 3) und für die Ligation vorbereitet, indem es mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Xho I inkubiert wurde. Für die PCR wurden die Oligonukleotide FGFR-1 fwd und FGFR-1 rev verwendet.

Die präparativen Restriktionsansätze wurden auf einem 0,8 % Agarosegel aufgetragen und die entsprechenden Banden nach Elektrophorese aus dem Gel eluiert. *E.coli DH5 α* -Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten, die Ampicillin enthielten, plattiert. Die über Nacht bei 37°C gewachsenen Klone wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte aufgenommen und in Reagenzgläsern mit ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht inkubiert. Die aus der Übernachtskultur gewonnene Plasmid-DNA wurde auf einem Agarosegel gelelektrophoretisch analysiert. Plasmid-DNA, die höher als der Leervektor lief, wurde einem Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Xho I unterzogen und durch eine elektrophoretische Analyse im 0,8 % Agarosegel untersucht. Es entstanden durch die Behandlung mit Bgl II und Xho I

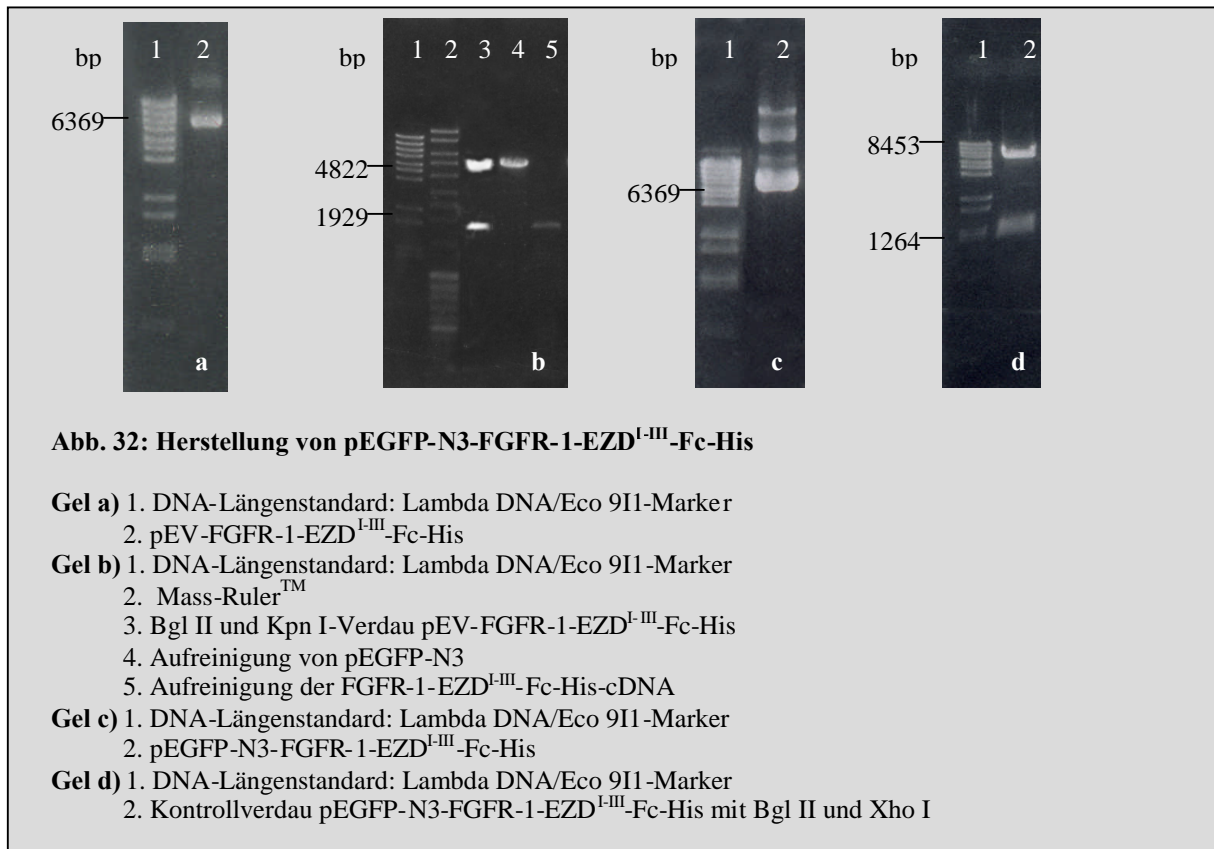
Fragmente der Länge 5,6 kbp und 1,1 kbp (siehe Abb. 31d Spur 4). Die Richtigkeit der FGFR-1-EZD^{I-III}-cDNA-Klonierung wurde durch eine Sanger-Sequenzierung überprüft und der entsprechende Vektor pEV-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His genannt.



8.1.1.1.2. Konstruktion von pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Kpn I wurde die FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His-cDNA (1,8 kbp) aus dem Vektor pEV-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His herausgeschnitten und nach einer Elektrophorese aus dem Gel eluiert. Als Ausgangsplasmid wurde der Vektor pEGFP-N3-Dsg-1-EZD^{I-V}-Fc-His verwendet. Aus diesem wurde mit Hilfe der Enzyme Bgl II und Kpn I die Dsg-1-EZD^{I-V}-Fc-His-cDNA (2,6 kbp) deletiert (siehe Abb. 32 b Spur 3) und der entstandene Vektor pEGFP-N3 (4,7 kbp) auf einem 0,8 %igen Agarosegel von der cDNA elektrophoretisch getrennt und anschließend eluiert. Die durch Bgl II und Kpn I-Behandlung gewonnenen DNA-Fragmente pEGFP-N3 und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His wurden in einem Ligationsansatz miteinander fusioniert und mit diesem Ansatz *E. coli DH5α*-Bakterien transformiert. Die nach Selektion auf LB-Ampicillin-Platten gewachsenen Kolonien wurden durch eine Übernachtinkubation vermehrt und aus diesen Kulturen die Plasmid-DNA isoliert (siehe Abb. 32c Spur 2). Positive Plasmide wurden durch Freisetzung der FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His-cDNA nach Behandlung mit Bgl II und Kpn I mit Hilfe einer gelelektrophoretischen

Analyse identifiziert (siehe Abb. 32d Spur 2). Nach Verifizierung der cDNA mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung wurde ein entsprechend korrekter Vektor herausgesucht und dieser pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His genannt.



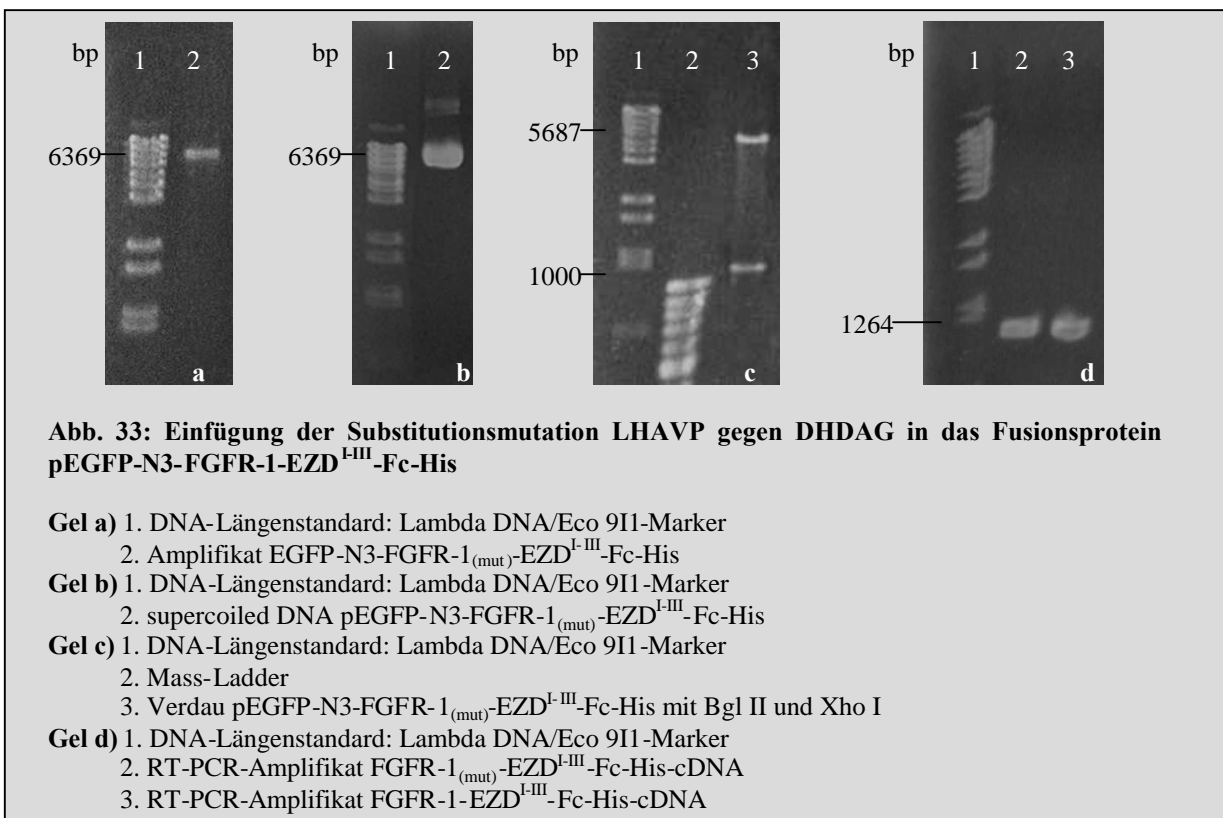
8.1.1.1.3. Generierung von pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His

Die HAV-Domäne liegt zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Domäne von FGFR-1. Um die Bindungsaktivität dieser Domäne messen zu können, wurden die Aminosäuren HAV und die amino- und carboxyterminal angrenzenden Aminosäuren L (Leucin) und P (Prolin) durch die Aminosäuren DHDAG (Asparaginsäure, Histidin, Asparaginsäure, Alanin, Glycin) ersetzt. Die benachbarten Aminosäuren wurden in dieser Substitutionsmutation zusätzlich verändert, da das Bindungsmotiv HAV in Form einer Bindungstasche berücksichtigt werden sollte. Mit Hilfe einer Computeranalyse wurden die Aminosäuren ermittelt, die bei Substitution die dreidimensionale Struktur des FGFR-1 am wenigsten beeinflussen.

Mit Hilfe einer PCR wurde in Gegenwart der Oligonukleotide FGFR-1_(mut)560-fwd und -rev, der Matrix pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His und der Phusion-Polymerase die Substitutionsmutation LHAVP → DHDAG eingefügt (siehe Abb. 33a Spur 2). Das so entstandene EGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His DNA-Fragment wurde nach elektrophoretischer Behandlung aus einem Agarosegel eluiert. Um bei einer Transformation eine Verunreinigung

mit der Ausgangsmatrize pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His zu vermeiden, wurde das geeluierte DNA-Fragment über Nacht bei 37°C mit dem Enzym Dpn I inkubiert. Dieses ist in der Lage PCR-Amplifikate von bakterieller DNA zu unterscheiden und letztere abzubauen, da diese im Gegensatz zu den *in-vitro* hergestellten PCR-Amplifikaten Methylgruppen enthalten. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min bei 65°C) erfolgte die Phosphorylierung des 5'-glatten Endes mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK). Nach Hitzeinaktivierung der PNK wurde das DNA-Fragment in einer Ligation rezirkularisiert. Nach Transformation von *E. coli DH5α-Bakterien* und Ausplattieren auf kanamycinhaltigen Agarplatten wurden von positiven Kolonien Übernachtskulturen angesetzt, aus diesen die Plasmid-DNA isoliert (siehe Abb. 33b Spur 2) und über eine Restriktionsanalyse mit Bgl II und Xho I der korrekte Expressionsvektor pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)EZD^{I-III}-Fc-His identifiziert (siehe Abb. 33c Spur 3). Die Mutation wurde schließlich mit Hilfe einer Sanger-Sequenzierung nachgewiesen.

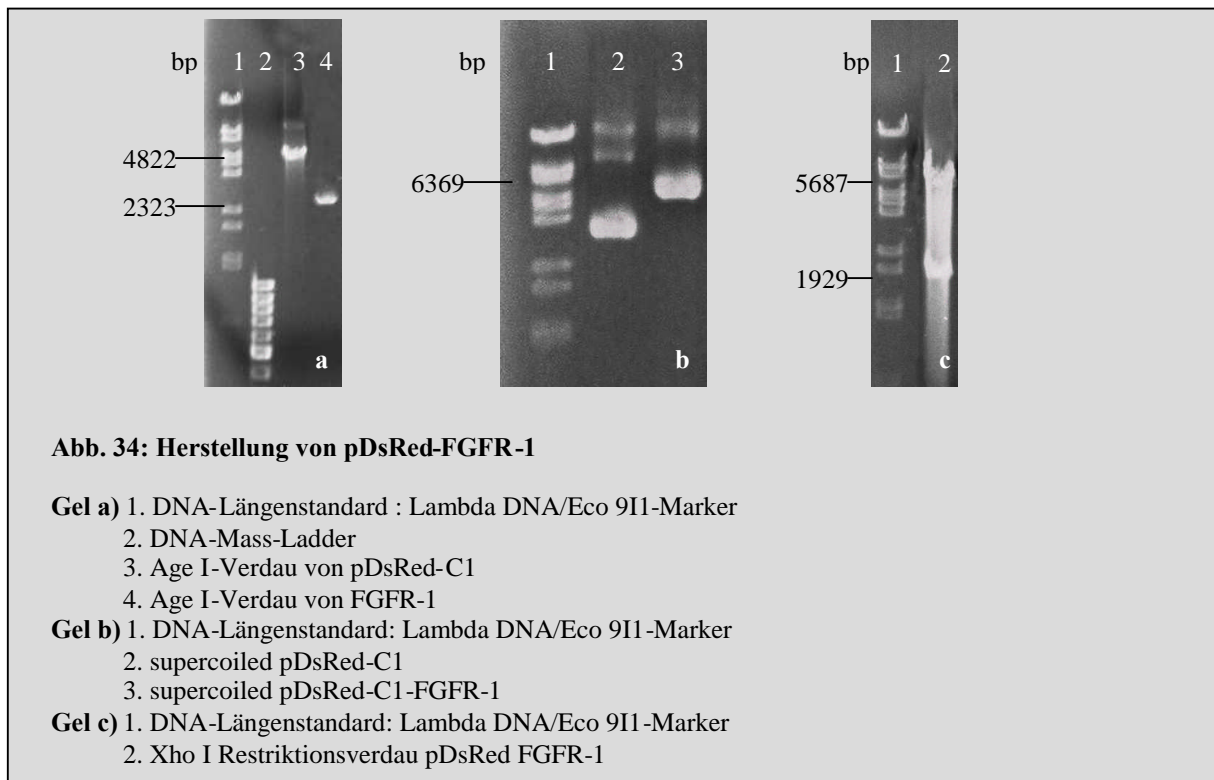
CHO-Zellen, die mit pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)EZD^{I-III}-Fc-His DNA transfiziert worden waren (siehe 6.2.9), starben durch Apoptose. Aus den wenigen verbliebenen Zellen konnte nach Monaten eine Zelllinie erstellt werden. Da es sich als schwierig erwies, diese Zelllinie zu erstellen, wurde mit Hilfe einer RT-PCR überprüft, ob eine chromosomale Interpunktion der entsprechenden cDNA noch vorhanden war (siehe Abb. 33d Spur 2).



8.1.1.1.4. Generierung von pDsRed-C1-FGFR-1

Über eine PCR wurde in Gegenwart der Oligonukleotide FGFR/DsRed-fwd und -rev die FGFR-1-cDNA (Maus) amplifiziert und aus einem 0,8 %igem Agarosegel eluiert (siehe Abb. 34a Spur 4).

Der durch Age I-Behandlung linearisierte Vektor pDsRed C1 wurde ebenfalls aus einem 0,8 %igem Agarosegel eluiert. Vektor und Amplifikat wurden gemäß der BD-InfusionTM-Technologie miteinander rekombiniert (siehe 6.1.2.9). Nach Transformation von *E. coli DH5 α -Bakterien* wurde der Ansatz auf kanamycinhaltige Agarplatten ausplattiert. Aus Übernachtskulturen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe Abb. 34b Spur 3). Die FGFR-1-cDNA enthaltenen Plasmide wurden einer Xho I Restriktionsanalyse und einer anschließenden Sanger-Sequenzierung unterzogen (siehe Abb. 34c Spur 2). Ein positives Plasmid wurde schließlich als pDsRed-C1-FGFR-1 bezeichnet.



8.1.1.2. Generierung von Vektoren zur Expression von N-Cadherin

8.1.1.2.1. Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I^V}-Fc-His und pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I^{III}}-Fc-His

Für die Konstrukte pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I^V}-Fc-His und pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I^{III}}-Fc-His diente pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I^{III}}-Fc-His als Ausgangsplasmid. Mit Hilfe der Enzyme Bgl II und Xho I wurde die für FGFR-1-EZD^{I^{III}} (1,1 kbp) kodierende cDNA herausgeschnitten (siehe Abb. 35b Spur 2) und durch die cDNA für N-Cadherin-EZD^{I^V} (2,1

kbp) bzw. N-Cadherin-EZD^{I-III} (1,4 kbp) ersetzt. Die N-Cadherin-EZD^{I-V}-cDNA wurde über PCR mit Hilfe der Oligonukleotide N-Cad-EZD^{I-V}-fwd und -rev in Gegenwart der N-Cadherin-cDNA amplifiziert und anschließend mit Hilfe der Enzyme Bgl II und Xho I einem Restriktionsverdau unterzogen (siehe Abb. 35b Spur 3). Für die Amplifikation der N-Cadherin-EZD^{I-III}-cDNA wurden die Oligonukleotide N-Cad-EZD^{I-III}I -fwd und -rev verwendet (siehe Punkt 5.12.). Während die N-Cadherin-EZD^{I-V} cDNA direkt in den Bgl II und Xho I geöffneten Vektor EGFP-N3-Fc-His kloniert wurde, erfolgte eine Zwischenklonierung der N-Cadherin-EZD^{I-III}-cDNA in pGMT®. Es entstand der Ampicillin-resistente Klon pGMT-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His (siehe Abb. 36a Spur 5), der durch „blue-white screening“ (siehe 6.1.4.) identifiziert werden konnte.

Die entsprechenden cDNA enthaltenen Plasmide Kanamycin-resistenter Klone wurden mittels Bgl II und Xho I spezifischer Restriktionsanalyse identifiziert und die Richtigkeit der Konstrukte durch Sanger-Sequenzierung bestätigt. Schließlich wurden die N-Cadherin-EZD^{I-III}- und N-Cadherin-EZD^{I-V}-cDNA enthaltenen Expressionsvektoren pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His (siehe Abb. 36c Spur 2) und pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His (siehe Abb. 35c Spur 2) genannt.

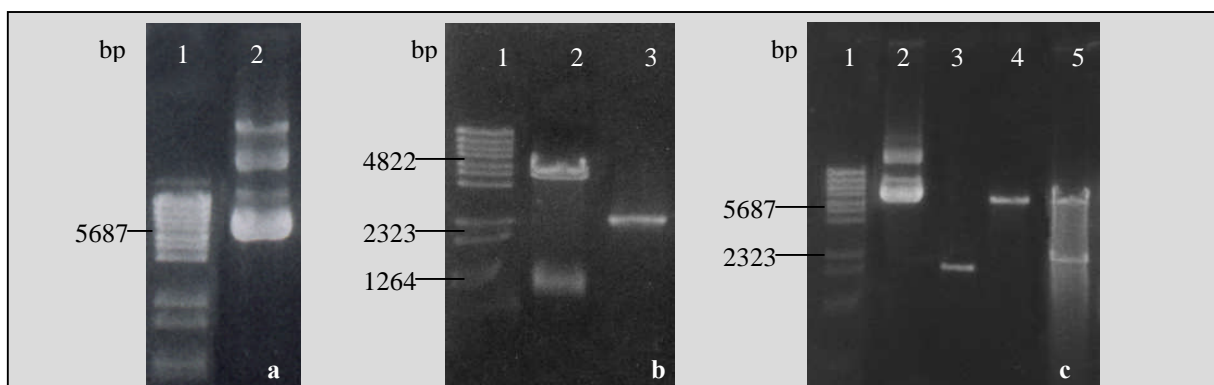


Abb. 35: Klonierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His

Gel a) 1. Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker

2. pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His supercoiled

Gel b) 1. Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker

2. Verdau von pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His mit Bgl II und Xho I

3. N-Cadherin-EZD^{I-V} Amplifikat nach Bgl II und Xho I Restriktionsverdau

Gel c) 1. Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker

2. pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His supercoiled

3. geleluiertes N-Cadherin-EZD^{I-V}-Amplifikat mit Bgl II und Xho I Behandlung

4. geleluierte pEGFP-N3-Fc-His-DNA mit Bgl II und Xho I Behandlung

5. Restriktionsanalyse von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His mit Bgl II und Xho I

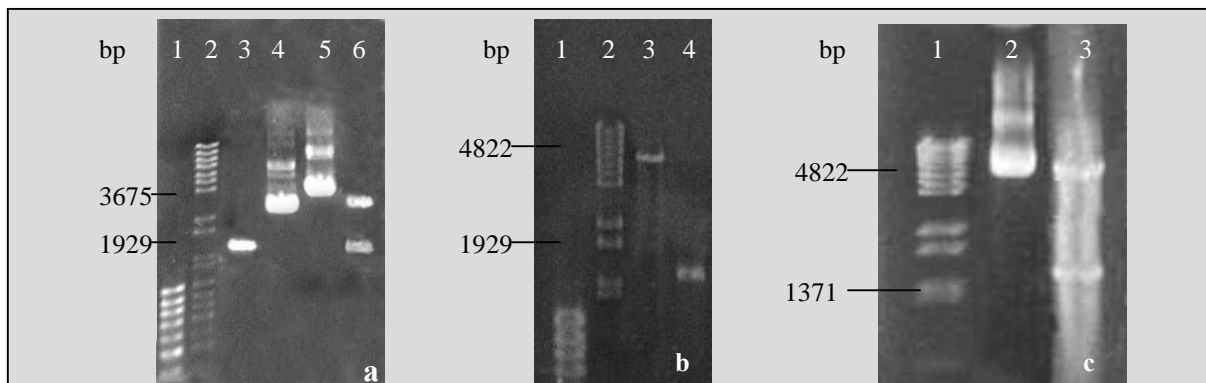


Abb. 36: Herstellung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His

- Gel a)** 1. DNA-Längenstandard: Mass-Ladder
 2. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker
 3. N-Cadherin EZD^{I-III}-Amplifikat
 4. pGMT®-Vektor supercoiled
 5. pGMT® N-Cadherin-EZD^{I-III} supercoiled
 6. Restriktionsanalyse von pEGMT-N-Cadherin-EZD^{I-III} mit Bgl II und Xho I
- Gel b)** 1. DNA-Längenstandard: Mass-Ladder
 2. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker
 3. pEGFP-N3 nach Bgl II und Xho I Verdau und Gelelektion
 4. N-Cadherin-EZD^{I-III}-cDNA Verdau und Gelelektion mit Bgl II und Xho I
- Gel c)** 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker
 2. pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His supercoiled
 3. Restriktionsanalyse von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His mit Bgl II und Xho I

8.1.1.2.2. Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-Fc-His

Um das in der vierten EZD befindliche Bindungsmotiv IDPNGQ zu deletieren, wurde das Konstrukt pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-Fc-His hergestellt.

Hierzu wurden in einer PCR ausgehend von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His die in Tabelle 2 aufgeführten Fragmente amplifiziert. Zum besseren Verständnis werden die berücksichtigen Linker in diesem Unterpunkt und in Punkt 7.6. „Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{IV+V}-Fc-His“ der Arbeit aufgezeigt. In anderen Unterpunkten wird der Klon als pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-Fc-His bezeichnet.

Nummer:	Fragment:	Oligonukleotide:
1	N-Cadherin-EZD ^{I-III} +L ^{III}	N-Cad-EZD ^{I-III} -L ^{III} -fwd und -rev
2	N-Cadherin-EZD ^V	N-Cad-EZD ^V -fwd und -rev
3	N-Cadherin-EZD ^V -L ^{IV+V} -Fc-His	N-Cad-EZD ^V -L ^{IV+V} -Fc -fwd und -rev
4	N-Cadherin-EZD ^{I-III+V} -L ^{III}	N-Cad-EZD ^{I-III+V} -L ^{III} -fwd N-Cad-EZD ^V -rev
5	N-Cadherin-EZD ^{I-III+V+V} -L ^{IV+V} -Fc-His	N-Cad-EZD ^{I-III} -L ^{III} -fwd N-Cad-EZD ^V +L ^{IV+V} -Fc-rev

Tabelle 5: Aufführung der notwendigen Fragmente und Oligonukleotide für die Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-Fc-His.

Das Fragment 1 enthält im carboxyterminalen Bereich einen 15 bp umfassenden Überlappungsbereich. Daher konnten in einer anschließenden PCR diese Fragmente N-Cadherin-EZD^{I-III+V}-L^{III} Fragment vervielfältigt werden (siehe Kapitel 7.6.).

In einer weiteren PCR wurde mit Hilfe der Oligonukleotide (siehe 5.12.1.) aus N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-cDNA die N-Cadherin-EZD^V-L^{IV+V}-Fc-His c-DNA amplifiziert.

Die Fragmente N-Cadherin-EZD^{I-III+V}-L^{III} (siehe Abb. 37a Spur 3) und N-Cadherin-EZD^V-L^{IV+V}-Fc-His wurden für eine „blunt-end“ Ligation in Gegenwart von ATP und der T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und über Nacht bei 16°C im Wasserbad miteinander ligiert.

Dieser Ansatz resultierte in der Bildung geringer DNA-Mengen des gewünschten DNA-Fragmentes N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{IV+V}-Fc-His (siehe Abb. 37b Spur 2-3), das daran anschließend über eine PCR amplifiziert werden konnte. Da in der Gelelektrophorese zwei eng benachbarte Banden auftraten, wurden beide getrennt voneinander eluiert. Anschließend erfolgte jeweils eine InFusion-Rekombination (siehe Punkt 6.1.2.9.) mit pEGFP-N3, aus dem zuvor mit Hilfe der Enzyme Bgl II und Kpn I das Insert FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His entfernt worden war. Die Ansätze wurde nach Transformation von *E. coli DH5α*-Bakterien auf kanamycinhaltige Platten ausgestrichen und diese bei 37°C über Nacht inkubiert.

Plasmide Kanamycin resistenter Klone wurden über den Restriktionsverdau mittels der Enzyme Bgl II und Kpn I identifiziert und einer Sanger-Sequenzierung unterworfen (siehe Abb. 37d Spur 3).

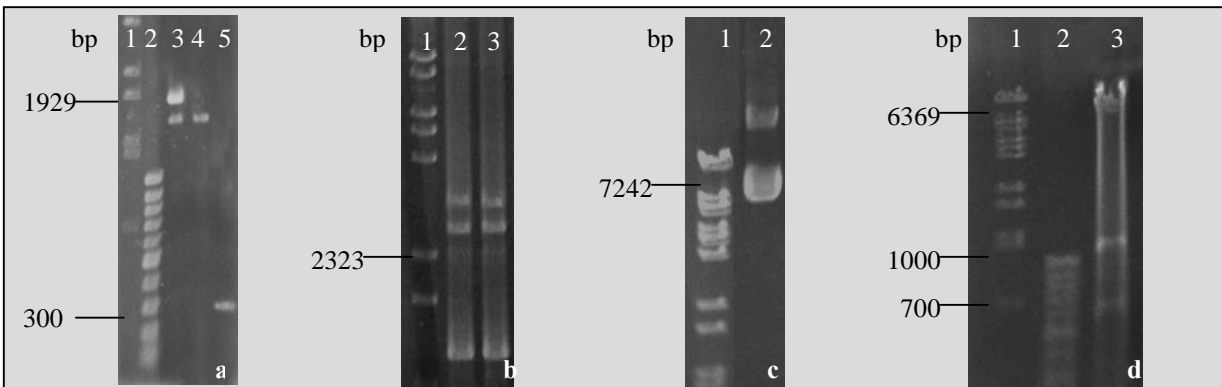


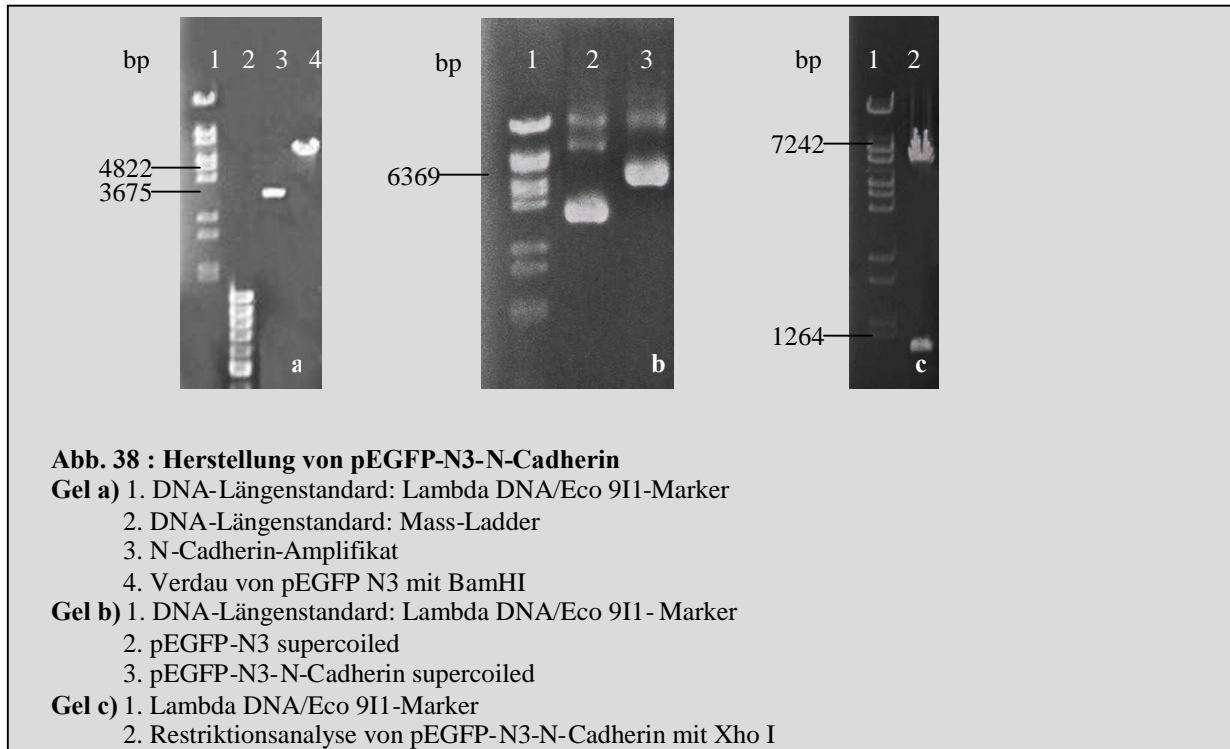
Abb. 37: Klonierung von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{IV+V}-Fc-His

- Gel a)** 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker
 2. DNA-Längenstandard: Mass-Ladder
 3. N-Cadherin-EZD^{I-III+V}-L^{III}-Amplifikat (höher verlaufende DNA-Bande; entspricht dem Hauptprodukt)
 N-Cadherin-EZD^{I-III}-L^{III}-Amplifikat (niedriger verlaufende DNA-Bande; entspricht dem Nebenprodukt)
 4. N-Cadherin-EZD^{I-III}-L^{III}-Amplifikat
 5. N-Cadherin-EZD^V-Amplifikat
- Gel b)** 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker
 2.-3. Amplifikat-N-Cadherin-EZD^{I-III+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His
- Gel c)** 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker
 2. pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{IV+V}-Fc-His supercoiled
- Gel d)** 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 9I1-Marker
 2. Mass-Ladder
 3. Verdau von pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{IV+V}-Fc-His mit Pst I

8.1.1.2.3. Generierung von pEGFP-N3-N-Cadherin

Über eine PCR wurde mit Hilfe der Oligonukleotide N-Cad-pEGFP-N3-fwd und -rev (siehe 5.12.1.) die gesamte N-Cadherin-cDNA amplifiziert und aus einem 0,8 %igem Agarosegel eluiert (siehe Abb. 38a Spur 3).

Der Vektor pEGFP N3 wurde mit dem Restriktionsenzym BamH I linearisiert und zusammen mit dem Amplifikat in einer InFusion-Reaktion miteinander rekombiniert. Daran anschließend wurden mit dem Ansatz *E. coli DH5α-Bakterien* transformiert und diese auf kanamycinhaltigen Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Aus positiven Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und diese einer Restriktionsanalyse mit Xho I unterzogen (siehe Abb. 38 c Spur 2). Plasmide, aus denen ein 1,2 kbp großes Fragment herausgeschnitten wurde, galten als positiv und wurden einer Sanger-Sequenzierung unterzogen. Ein so identifizierter Vektor wurde pEGFP-N3-N-Cadherin genannt.



8.1.1.3. Generierung von pEGFP-N3-Fc-His

Da in den Bindungsstudien Fusionsproteine mit einem Fc-Anteil verwendet wurden, musste ausgeschlossen werden, dass Protein-Protein Wechselwirkungen unspezifisch über Fc vermittelt wurden. Aus diesem Grunde sollte der Expressionsvektor pEGFP-N3-Fc-His und das so gebildete Fc-Molekül als Negativkontrolle in Bindungsstudien eingesetzt werden. Daher wurde in einer PCR in Gegenwart von pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His und den Oligonukleotiden Fc- fwd und -rev die Fc-cDNA amplifiziert (siehe Abb. 39a Spur 4). Parallel dazu wurde aus pEGFP-N3-FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His mit Hilfe der Enzyme Bgl II und Kpn I die FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His cDNA (1,8 kbp) herausgeschnitten, der Vektor aus dem 0,8 %igem Agarosegel eluiert (siehe Abb. 39a Spur 3) und zusammen mit dem Fc-Fragment in einem InFusion-Rekombinationsansatz eingesetzt. Daran anschließend wurden mit dem Ansatz *E. coli DH5 α -Bakterien* transformiert, diese auf einer kanamycinhaltigen Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus kanamycin-resistenten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und positive Konstrukte anhand einer Bgl II/Kpn I Restriktionsanalyse identifiziert (siehe Abb. 39c Spur 3). Ein positives Konstrukt wurde nach Sanger sequenziert und pEGFP-N3-Fc-His genannt.

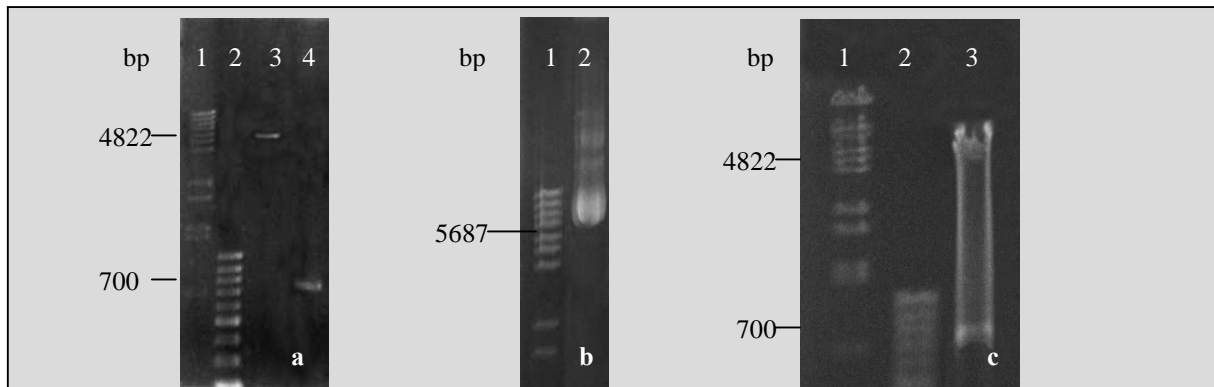


Abb. 39: Klonierung von pEGFP-N3-Fc-His

Gel a) 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 911-Marker
 2. DNA-Längenstandard: Mass-Ladder
 3. EGFP-N3 nach Bgl II und Kpn I Verdau und Geelution
 4. Fc-His- Amplifikat

Gel b) 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 911-Marker
 2. pEGFP-N3-Fc-His supercoiled

Gel c) 1. DNA-Längenstandard: Lambda DNA/Eco 911-Marker
 2. DNA-Längenstandard: Mass-Ladder
 3. pEGFP-N3-Fc-His nach Behandlung mit Bgl II und Kpn I

8.2. Charakterisierung stabiler Zellklone

Nach dem wie unter Punkt 6.2.9 und 6.2.10 beschrieben nach Transfektionen von CHO-Zellen mit den entsprechenden Vektoren stabile Zelllinien erhalten worden waren, wurden diese hinsichtlich der Expression des Fusionsproteins sowohl fluoreszenzmikroskopisch (siehe 6.4.1) als auch proteinbiochemisch (siehe 6.3.4) untersucht. Eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten stabilen Zelllinien ist in Tabelle 3 gezeigt.

Name der Zelllinie	verwendeter Expressionsvektor	gebildetes Fusionsprotein
CHO FGFR-1-EZD ^{I-III}	pEGFP-N3-FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His	FGFR-1-EZD ^{I-III} -Fc-His
CHO FGFR-1 _(mut) -EZD ^{I-III}	pEGFP-N3 FGFR-1 _(mut) -EZD ^{I-III} -Fc-His	FGFR-1 _(mut) -EZD ^{I-III} -Fc-His
CHO N-Cadherin-EZD ^{I-V}	pEGFP-N3 N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His	N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His
CHO N-Cadherin-EZD ^{I-III}	pEGFP-N3 N-Cadherin EZD ^{I-III} -Fc-His	N-Cadherin-EZD ^{I-III} -Fc-His

Tabelle 6: Stabile Zelllinien

8.2.1. Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung stabiler Zelllinien

Zur fluoreszenzmikroskopischen Charakterisierung wurden die gewünschten stabilen Zelllinien auf Deckgläschen ausgesät, am darauf folgenden Tag zur Fixation und Permeabilisierung mit Methanol behandelt und daran anschließend mit den Erstantikörpern anti-FGFR-1 bzw. anti-N-Cadherin inkubiert. Als Zweitantikörper diente ein mit Cy3-konjugiertes anti-IgG. Im Falle der direkten Detektion des Fc-Epitops innerhalb der Fusionsproteine wurde nur Cy3-konjugiertes Ziege-anti-human IgG zugegeben (siehe Abb. 40- 44).

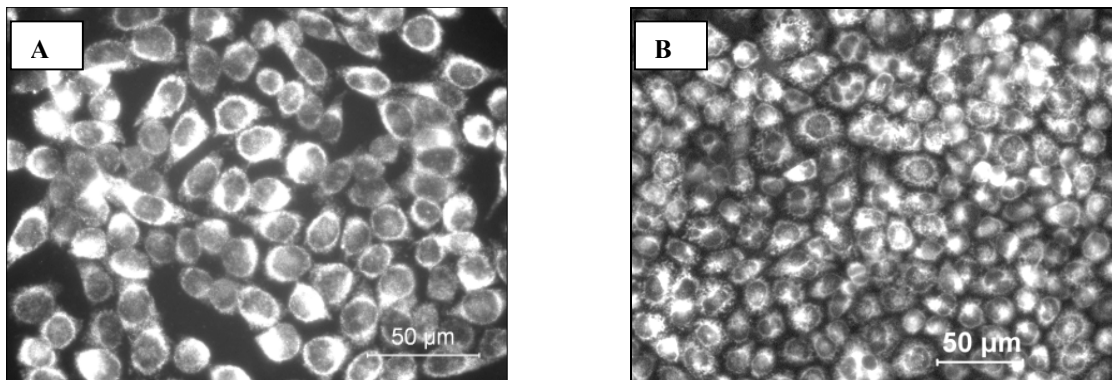


Abb. 40: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zelllinie CHO FGFR-1-EZD^{I-III}:

(A) Indirekte Immunfluoreszenz nach Inkubation der Methanol-behandelten CHO-Zellen mit Anti-FGFR-1 und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper bzw. (B) direkte Immunfluoreszenz in Gegenwart von Cy3-konjugierten Ziege-anti-humanen IgG.

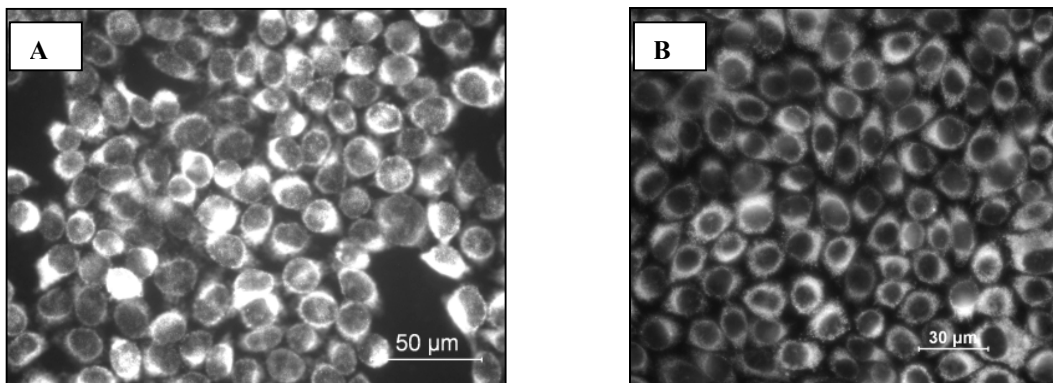


Abb. 41: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zelllinie CHO N-Cadherin EZD^{I-V}:

(A) Indirekte Immunfluoreszenz nach Inkubation der Methanol-behandelten CHO-Zellen mit Anti-N-Cadherin und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper bzw. (B) direkte Immunfluoreszenz in Gegenwart von Cy3-konjugierten Ziege-anti-humanen IgG.

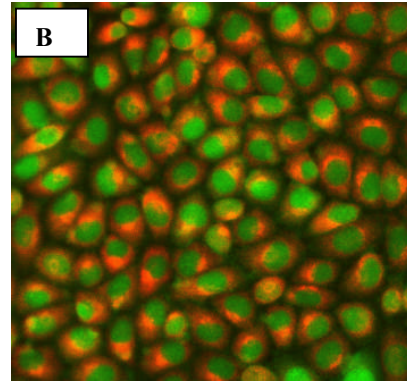
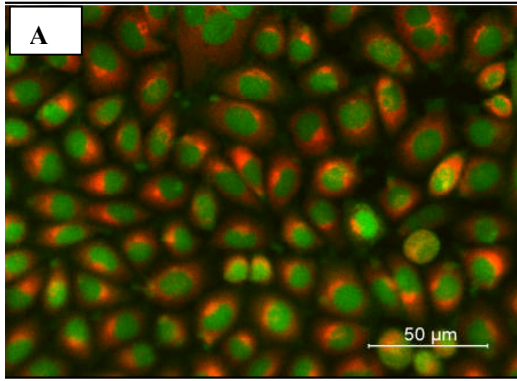


Abb. 42: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zelllinie CHO FGFR-1_(mut)-EZD^{LIII}: (A) Indirekte Immunfluoreszenz nach Inkubation der Methanol-behandelten CHO-Zellen mit Anti-FGFR-1 und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper bzw. (B) direkte Immunfluoreszenz in Gegenwart von Cy3-konjugierten Ziege-anti-humanen IgG.

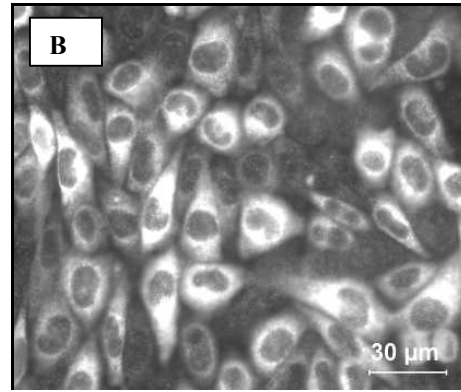
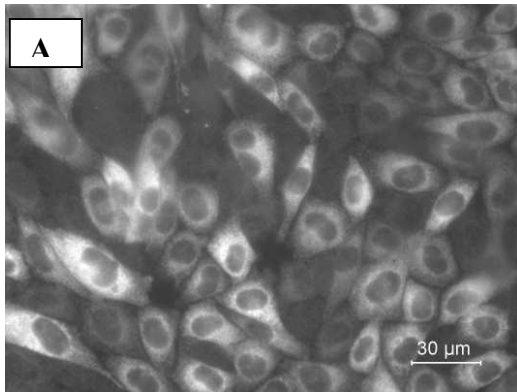


Abb. 43: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zelllinie CHO pEGFPN3-N-Cadherin EZD^{LIII}: (A) Indirekte Immunfluoreszenz nach Inkubation der Methanol-behandelten CHO-Zellen mit Anti-N-Cadherin und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper bzw. (B) direkte Immunfluoreszenz in Gegenwart des Cy3-konjugierten anti-IgG.

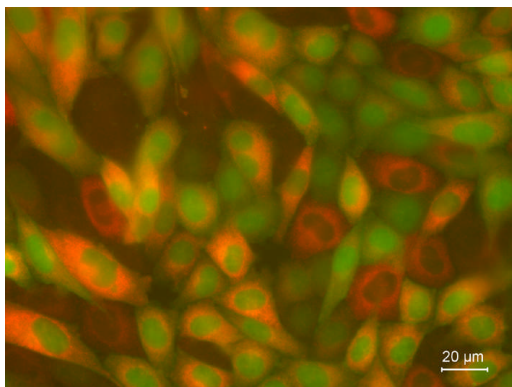


Abb. 44: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Zelllinie CHO Fc: Direkte Immunfluoreszenz in Gegenwart von Cy3-konjugierten Ziege-anti-humanen IgG.

8.2.2. Proteinbiochemische Charakterisierung der in stabilen CHO-Zellen gebildeten Fusionsproteine

Da es sich in fast allen Fällen um sekretorische Proteine handelte, wurde für die proteinbiochemische Charakterisierung von stabilen CHO-Zelllinien der Kulturüberstand abgenommen. Dieser wurde mit Proteaseinhibitoren versetzt und von Zellen durch Zentrifugation (900 rpm, 5 min.) befreit. Daran anschließend wurde der Überstand über eine Protein A-Säule (siehe 6.3.7) gegeben und so affinitätschromatographisch gereinigt. Zur Elution des gebundenen Fusionsproteins wurden 20 mM Natriumcitrat-Lösung pH 5 und pH 2,4 über die Säule gegeben und das Eluat gegen HBSS dialysiert (siehe 6.3.7). Die Proteinkonzentration des Eluats wurde mit der Methode nach Bradford (siehe 6.3.10) bestimmt.

Die Reinheit des so gewonnenen Eluats wurde anhand eines Coomassie-Blau gefärbtem SDS-Polyacrylamid-Gels (siehe 6.3.2) sowie durch Westernblot-Analyse (siehe 7.3.4) überprüft (siehe Abb. 45, 46).

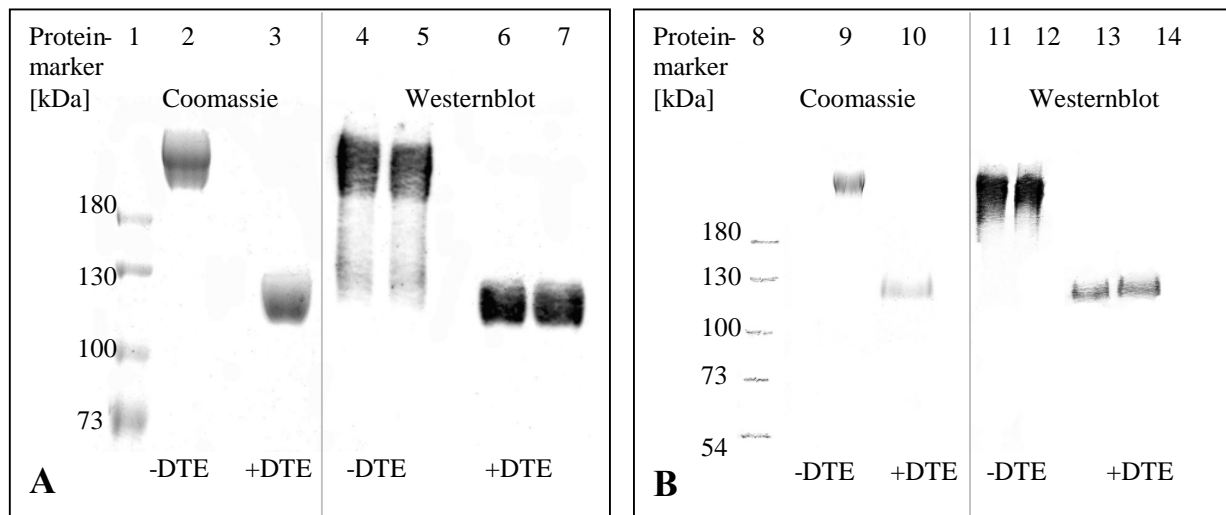


Abb. 45: Nachweis von FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His (A) und FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His (B) im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel und Westernblot-Analyse:

Die Coomassie-gefärbten SDS-Gele zeigen bei 220 kDa eine Bande für das Dimer (Spur 2 und 9) unter nicht reduzierenden Bedingungen (-DTE) und für das Monomer (Spur 3 und 10) unter reduzierenden Bedingungen (+DTE) bei 110 kDa.

Die im Coomassie-gefärbten SDS-Gel sichtbaren Banden entsprachen Fc (Spur 5, 7, 12 und 14) bzw. FGFR-1 (Spur 4, 6, 10 und 13) spezifischen Banden in der Westernblot-Analyse. Die Spuren 1 und 8 zeigen Protein-Molekularmarker.

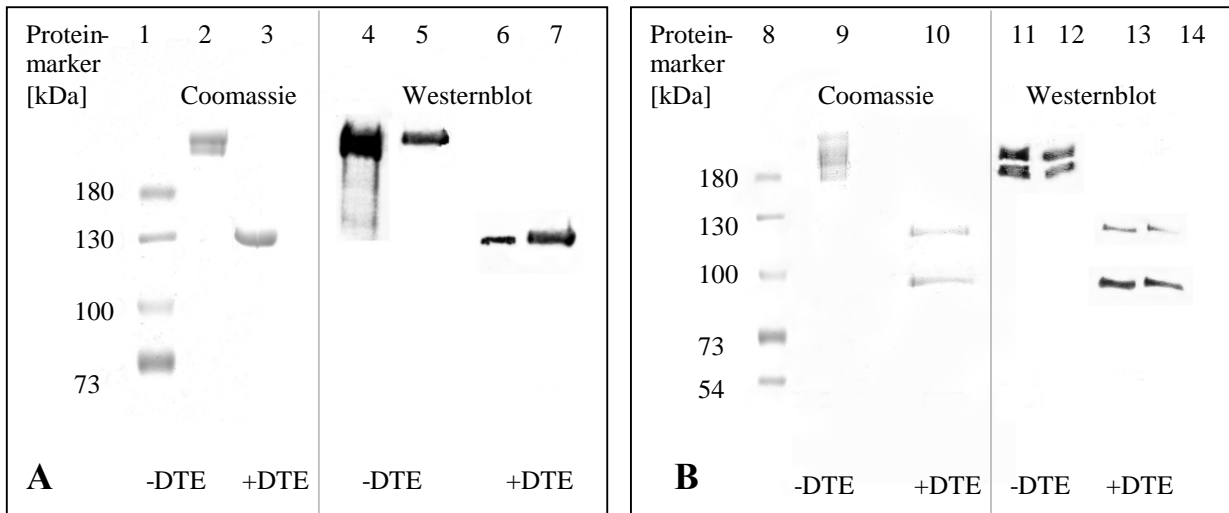


Abb. 46: Nachweis von N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His (A) und N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His (B) im Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamid-Gel und Westernblot-Analyse:

Die Coomassie-gefärbten SDS-Gele zeigen bei 260 kDa bzw. bei 240 und 180 kDa eine Bande für das Dimer (Spur 2 und 9) unter nicht reduzierenden Bedingungen (-DTE) und für das Monomer (Spur 3 und 10) unter reduzierenden Bedingungen (+DTE) bei 130 bzw. bei 120 und 90 kDa.

Die im Coomassie-gefärbten SDS-Gel sichtbaren Banden entsprachen Fc (Spur 5, 7, 12 und 14) bzw. N-Cadherin (Spur 4, 6, 10 und 13) spezifischen Banden in der Westernblot-Analyse. Die Spuren 1 und 8 zeigen Protein-Molekularmarker.

8.4. Nachweis der Expression von FGFR-1 und N-Cadherin in cerebellären Körnerzellen

Cerebelläre Körnerzellen wurden aus 5-7 Tage alten Mäusen (129S1/svJmJ) gewonnen und aus diesen nach entsprechender Kultivierung von einem Tag ein Gesamtextrakt für eine Westernblot-Analyse hergestellt. Sowohl FGFR-1, als auch N-Cadherin konnten aus dem Gesamtextrakt in Gegenwart spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. (siehe Abb. 48).

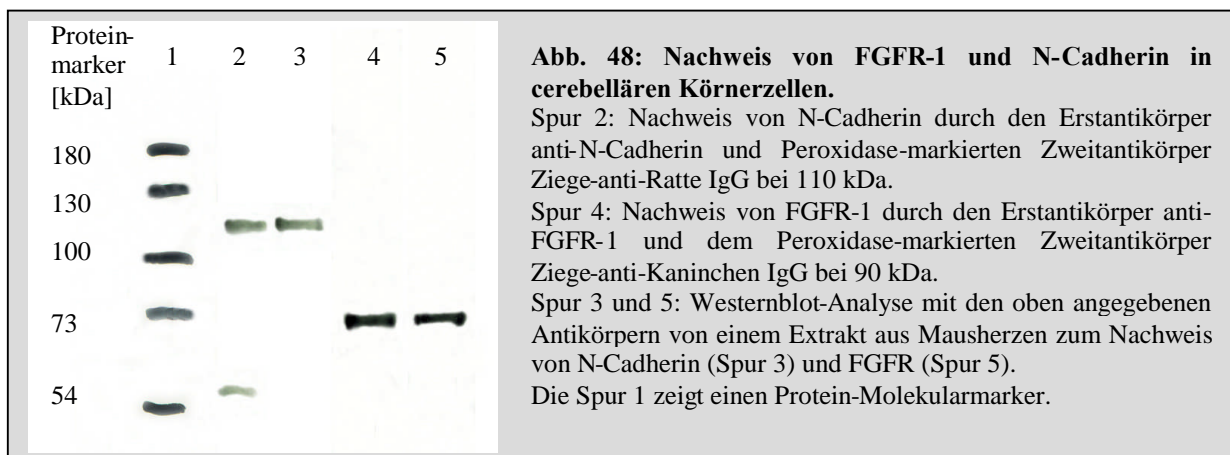


Abb. 48: Nachweis von FGFR-1 und N-Cadherin in cerebellären Körnerzellen.

Spur 2: Nachweis von N-Cadherin durch den Erstantikörper anti-N-Cadherin und Peroxidase-markierten Zweitantikörper Ziege-anti-Ratte IgG bei 110 kDa.

Spur 4: Nachweis von FGFR-1 durch den Erstantikörper anti-FGFR-1 und dem Peroxidase-markierten Zweitantikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG bei 90 kDa.

Spur 3 und 5: Westernblot-Analyse mit den oben angegebenen Antikörpern von einem Extrakt aus Mausherzen zum Nachweis von N-Cadherin (Spur 3) und FGFR (Spur 5).

Die Spur 1 zeigt einen Protein-Molekularmarker.

8.5. Bindungsstudien

8.5.1. zelluläre Bindungsstudien

Für zelluläre Bindungsstudien wurde der wachstumsfördernde Effekt der zu untersuchenden Proteine (Fc, FGF-2, Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His, L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His) und Peptide (KMEKKLHAVPAAK, APKAVHALKKMEK, IDPVNGQ und QGVNDIP) auf cerebelläre Körnerzellen untersucht. Desweiteren wurde in einer Cotransfektion von CHO-Zellen mit pDsRed-C1-FGFR-1 und pEGFP-N3-Cadherin die intrazelluläre Kollokalisierung von FGFR-1 und N-Cadherin untersucht.

8.5.1.1. Untersuchung zum Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen

8.5.1.1.1. Etablierung des Zellkultursystems

Mit Hilfe von cerebellären Körnerzellen wurde die wachstumsfördernde Wirkung von verschiedenen Proteinen (Fc, L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His) auf Axone analysiert. Da Wachstumsfaktoren im FCS und der depolarisierende Effekt von Kaliumionen Einfluß auf das Axonwachstum nehmen konnten, wurden cerebelläre Körnerzellen unter möglichst geringen Kalium- und FCS-Konzentrationen kultiviert. Nur so konnte gewährleistet werden, dass die zugegebenen Proteine/Peptide einen maximalen Effekt auf das Axonwachstum bewirken (siehe Abb. 51-54).

Die Konzentration der zugegebenen Proteine betrug in allen Fällen 5ng/ml. Als Positivkontrollen wurden die Wachstumsfaktoren FGF-2, NGF und CNTF verwendet. 24 h nach Proteinzugabe wurden die Zellen 1 min in eiskaltem Methanol fixiert, in PBS gewaschen und mit dem polyklonalen Mikrotubuli-spezifischen Erstantikörper anti-tau inkubiert. Nach Zugabe des Cy₃-markierten Zweitantikörpers Ziege-anti-Kaninchen-Fc erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Nervenzellen. Bei der anschließenden Auswertung wurde nur der längste Zellfortsatz der einzelnen Körnerzelle ausgemessen. Dieser musste zusätzlich eine Mindestlänge von 20 µm aufweisen. Alle Körnerzellen ohne Axon bzw. mit einem kleineren Axon als 20 µm wurden pro Bild gezählt.

In der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung waren neben Körnerzellen auch Gliazellen zu finden (siehe Abb. 49). Letztere konnten aufgrund ihrer sternförmigen Morphologie gut von Körnerzellen differenziert werden. Bei der statistischen Untersuchung wurden ausnahmslos Körnerzellen berücksichtigt.

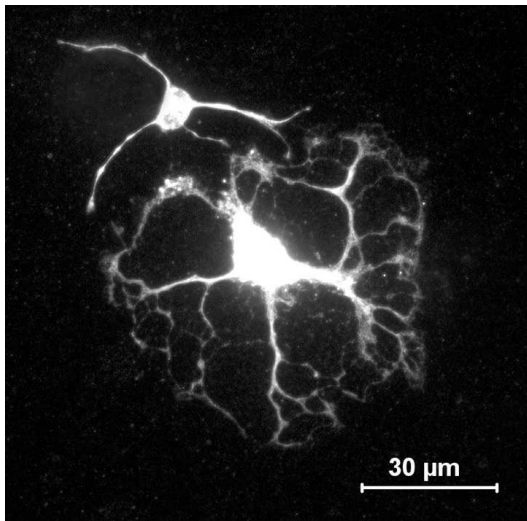


Abb. 49: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tau in einer Gliazelle (untere Zelle) und cerebellären Körnerzelle (obere Zelle) 1 Tag nach Präparation. Das Sichtbarmachen von Tau erfolgte mit anti-tau und Cy₃-markiertem Zweitantikörper Ziegenanti-Kaninchen-Fc.

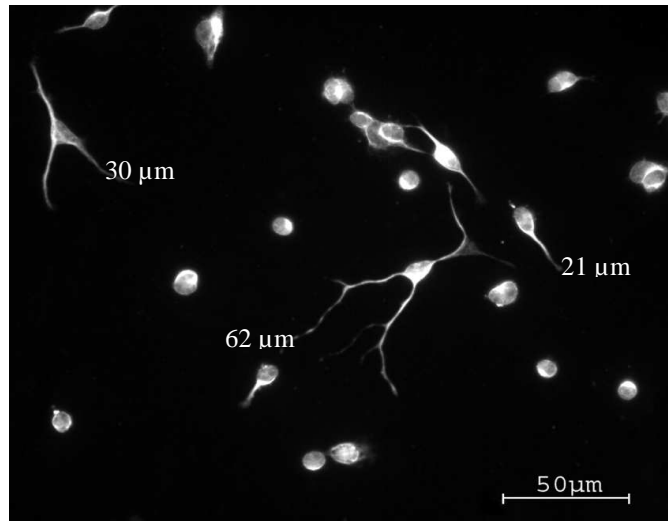


Abb. 50: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Tau in cerebellären Körnerzellen: 1 Tag nach Präparation wurde der längste Zellfortsatz mit Hilfe des Computerprogramms Spot-Advanced ausgemessen. Das Sichtbarmachen von Tau erfolgte wie in Abb. 49 beschrieben.

Die statistische Auswertung zeigte folgende Daten:

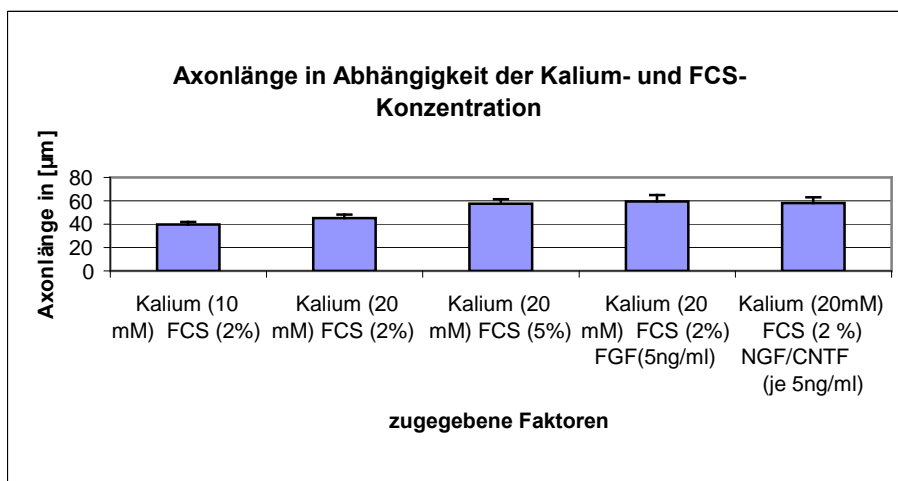


Abb. 51: Untersuchung des Axonwachstums von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe von verschiedenen Kalium- und FCS-Konzentrationen in Abwesenheit und Gegenwart von FGF (5 ng/ml) und NGF/CNTF (je 5 ng/ml).

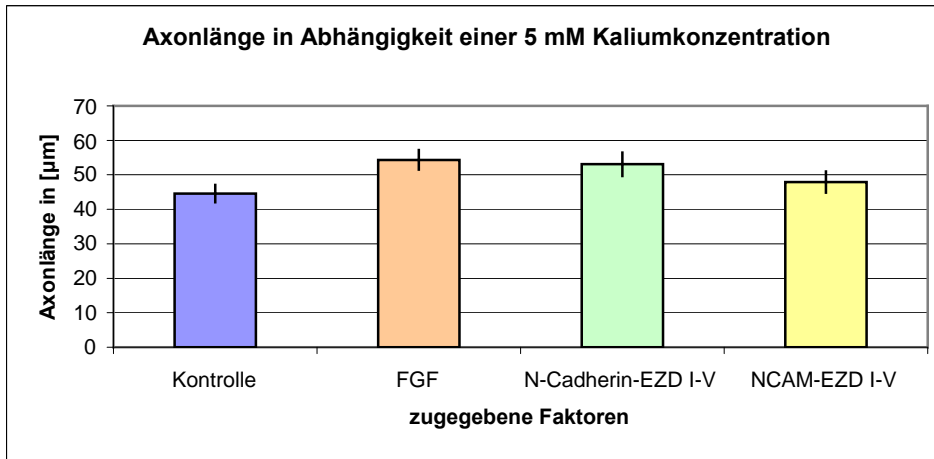


Abb. 52: Untersuchungen zum Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe von 5 mM Kaliumionen, 2 % FCS und verschiedenen wachstumsfördernden Proteinen.

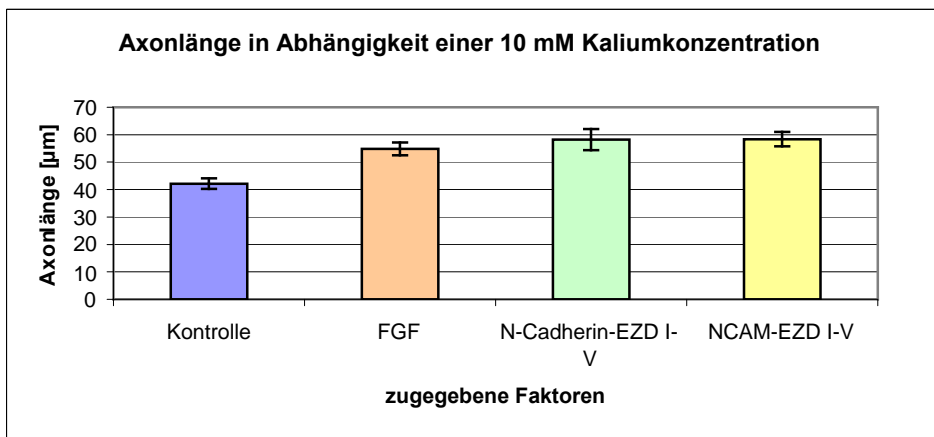


Abb. 53: Untersuchungen zum Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe von 10 mM Kaliumionen, 2 % FCS und verschiedenen wachstumsfördernden Proteinen.

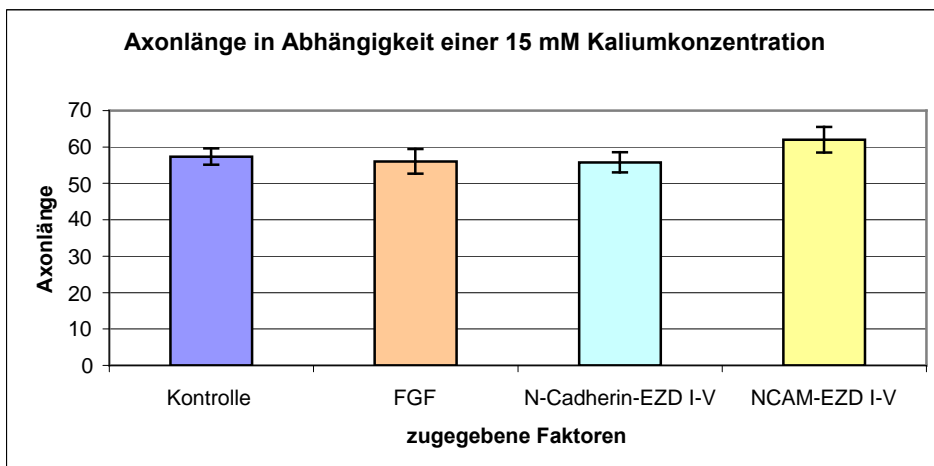


Abb. 54: Untersuchungen zum Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe von 15 mM Kaliumionen, 2 % FCS und verschiedenen wachstumsfördernden Proteinen.

	Kon- trolle	FGF	N- Cadherin EZD ^{I-V} - Fc-His	NCAM EZD ^I - V-Fc- His	Kon- trolle	FGF	N- Cadherin EZD ^{I-V} - Fc-His	NCAM EZD ^I - V-Fc- His	Kon- trolle	FGF	N- Cadherin EZD ^{I-V} - Fc-His	NCAM- EZD ^{I-V} - Fc-His
Kaliumkon- zentration [mM]	5	5	5	5	10	10	10	10	15	15	15	15
Gesamtzahl Nervenzellen	208	363	290	250	273	283	277	345	261	470	294	372
mit Zellfort- satz %	19,2	12,7	14,8	17,6	14,3	12,7	15,5	11,6	13,7	8,3	13,6	11,4
ohne Zell- fortsatz [%] und Axon- länge < 20 µM	80,8	87,3	85,2	82,4	85,7	87,2	84,5	88,4	86,2	91,7	86,4	88,6

Tab. 3: Auszählung von cerebellären Körnerzellen mit/ohne Zellfortsatz nach Zugabe verschiedener Proteine in Abhängigkeit von verschiedenen Kaliumkonzentrationen.

Ein Medium mit 10 mM KCl und 2 %iger FCS-Konzentration erwies sich als geeignet, um cerebelläre Körnerzellen nicht zu stark zum Wachsen anzuregen und eine signifikante Zunahme der Axonlängen nach Zusatz wachstumsfördernder Proteine zu gewährleisten. Die folgenden Versuche wurden daher in dieser Mediumzusammensetzung durchgeführt.

Da sich unter den verschiedenen Versuchsbedingungen die Anzahl der Körnerzellen mit einer Axonlänge unter und über 20 µm nicht signifikant veränderte, erfolgte in der statistischen Auswertung keine Berücksichtigung der Zellen mit einer Axonlänge unter 20 µm.

8.5.1.1.2. Untersuchung des Axonlängenwachstums von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe von verschiedenen Proteinen und Peptiden

Nach Etablierung des Zellkultursystems konnte nun die Wirkung der zu untersuchenden Proteine auf das Axonwachstum analysiert werden. Die Konzentration der zugegebenen Proteine betrug 5 ng/ml. Als Positivkontrolle wurde der Wachstumsfaktor FGF-2 verwendet, als Negativkontrollen Fc, Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His. Folgende CAM wurden auf ihre axonwachstumsfördernde Eigenschaft von cerebellären Körnerzellen untersucht: L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His. Die Nervenzellen wurden wie bereits erläutert 24 h nach Proteinzugabe fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Für jedes Protein wurden pro statistische Auswertung mehr als 100 Axone ausgemessen (siehe Abb. 55).

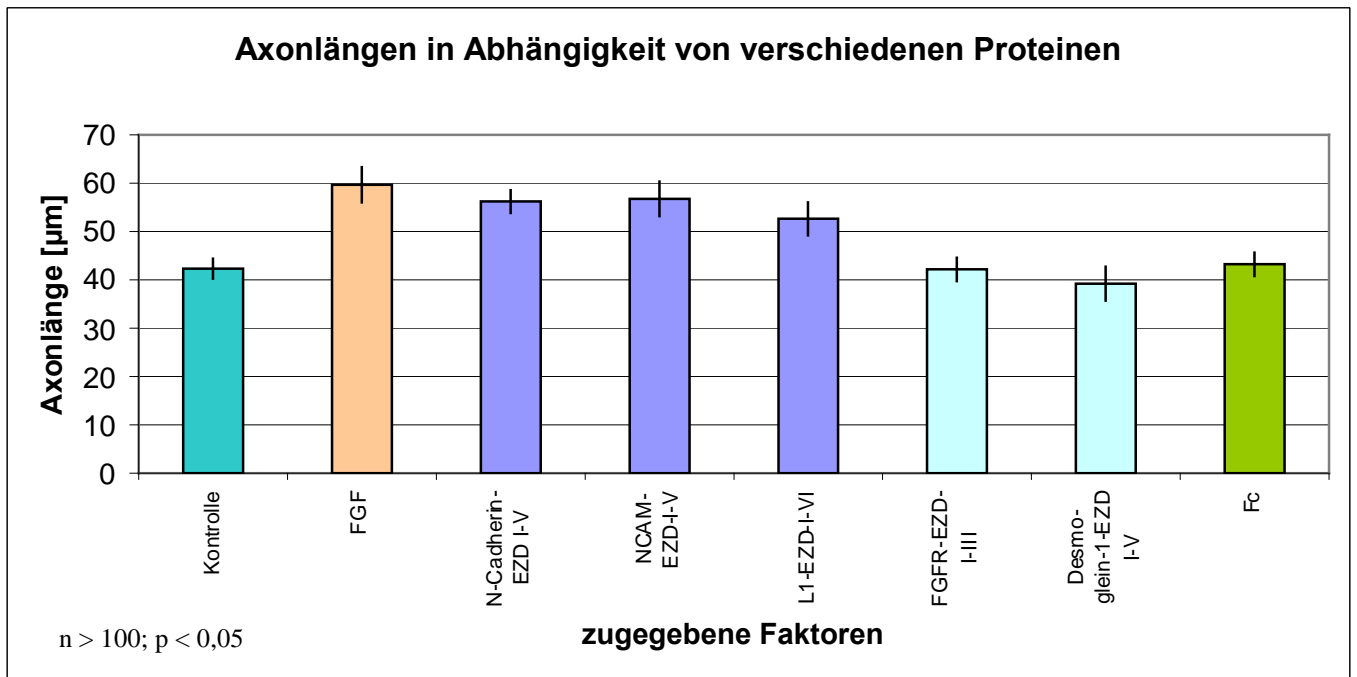


Abb. 55: Untersuchung des Axonlängenwachstums von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe verschiedener Proteine unter 10 mM KCl und 2 % FCS Kulturbedingungen.

Die Körnerzellen zeigten nach Zusatz der Positivkontrolle FGF, sowie bei N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His und L1-EZD^{I-VI}-Fc-His im Vergleich zur Kontrolle ein signifikantes Wachstum der Axone. Fc zeigte als Negativkontrolle ebenso wie Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His im Vergleich zur Kontrolle keinen wachstumsfördernden Effekt.

8.5.1.1.3. Untersuchung des Bindungsmotivs mit Hilfe von cerebellären Körnerzellen

Für die Untersuchung der FGFR-1 und N-Cadherin Bindungsmotive wurden die FGFR-1- und N-Cadherin- spezifischen Proteine wie zuvor in einer Konzentration von 5ng/ml verwendet.

Zusätzlich wurden Peptide eingesetzt, deren Aufgabe es war, an das Bindungsmotiv des Liganden zu binden und so eine Anbindung des Bindungspartners zu inhibieren. Um die Spezifität des Peptids zu überprüfen, wurde parallel Nonsense-Peptid verwendet.

Zur Überprüfung des N-Cadherin- spezifischen FGFR-1 Bindungsmotives IDPVNGQ wurde zu N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His ein 300-fach molarer Überschuss des Peptids KMEKKLHAVPAAK mit dem Bindungsmotiv HAV zugegeben. Mit Hilfe dieses Peptids sollte eine Bindung von FGFR-1 an N-Cadherin verhindert werden. Als Negativkontrolle wurde das Nonsense-Peptid APKAVHALKKMEK im 300-fach molaren Überschuss zu N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His gegeben. Um eine Bindung des Peptids an N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His zu ermöglichen, erfolgte jeweils eine Vorinkubation für 2 h, bei RT und 200 rpm. Anschließend wurde das Protein-Peptidgemisch auf die Körnerzellen gegeben.

Zur Überprüfung des FGFR-1- spezifischen Bindungsmotivs HAV, wurde zu frisch ausgesähten Körnerzellen in Bezug auf die später zugegebene N-Cadherinkonzentration ein

1000-facher molarer Überschuss des Peptides IDPVNGQ gegeben. Die Peptidmenge ist in diesem Fall größer, da im Vergleich zu N-Cadherin keine direkte Inkubation mit dem auf den Körnerzellen lokalisierten FGFR-1 erfolgen konnte. Nach 2 h Vorinkubation bei 37°C wurde N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His zu den Körnerzellen gegeben. Als Negativkontrolle diente das Nonsense-Peptid QGVNDIP.

Das Protein N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His weist in der EZD 1 die Bindungsmotive INSPISG und HAV auf. Das Bindungsmotiv IDPVNGQ fehlt, da es in der EZD 4 lokalisiert ist.

Die vollständigen Sequenzen der eingesetzten Peptide lauten:

Überprüfung der HAV-Motivs:

- Sense-Peptid: KMEKKLHAVPAAK
- Nonsense-Peptid: APKAVHALKKMEK

Überprüfung des IDPVNGQ-Motivs:

- Sense-Peptid: IDPVNGQ
- Nonsense-Peptid: QGVNDIP

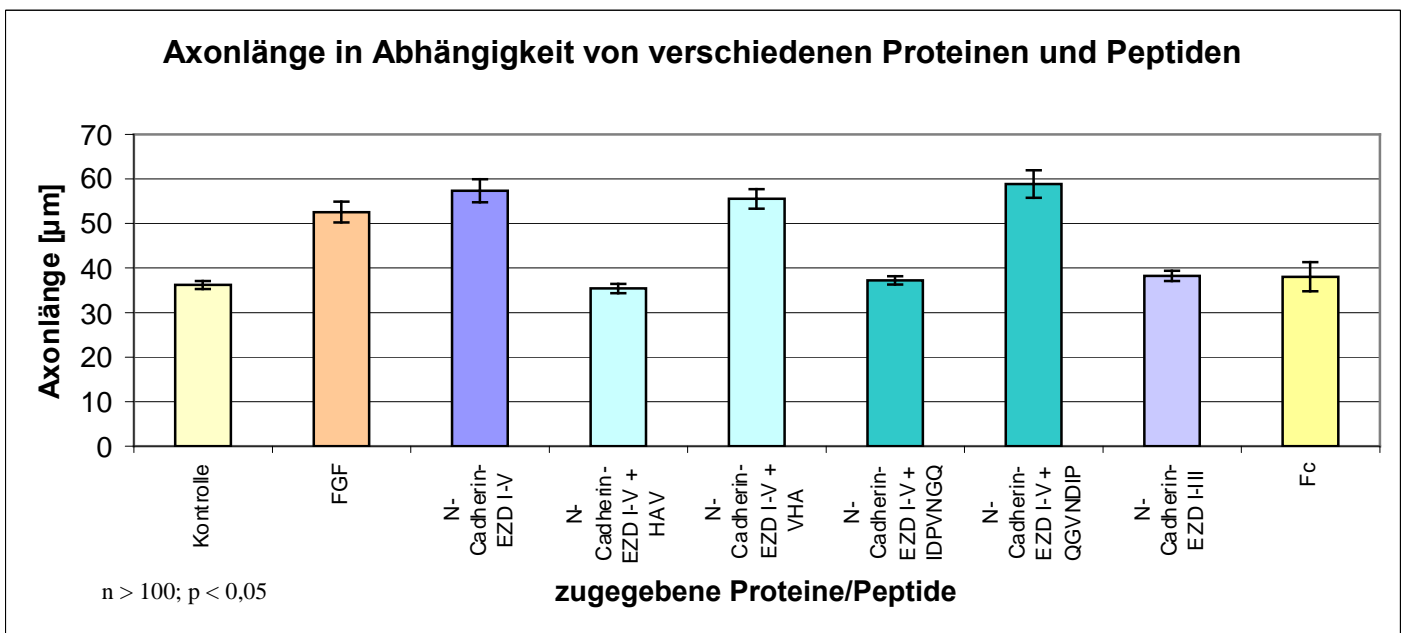


Abb. 56: Untersuchung des Axonlängenwachstums von cerebellären Körnerzellen nach Zugabe verschiedener Proteine und Peptide.

Die Positivkontrolle FGF-2 zeigt wie N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His gegenüber der Kontrolle einen signifikanten wachstumsfördernden Effekt auf die Axonlänge von Körnerzellen. Werden zu N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His die Peptide HAV und IDPVNGQ zugegeben, erfolgt im Gegensatz zu den Nonsense-Peptiden VHA und QGVNDIP eine Längenzunahme der Axone. N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His zeigt keinen wachstumsfördernden Effekt auf Körnerzellen. Als Negativkontrolle wurde Fc verwendet.

8.5.1.2. Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von N-Cadherin-GFP und FGFR-1-DsRed in CHO-Zellen

Um die FGFR-1-abhängige Lokalisation von N-Cadherin zu untersuchen, wurden CHO-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit den Vektoren pDsRed-C1-FGFR-1- und pEGFP-N3 N-Cadherin transfiziert (siehe Punkt 6.2.9.). 1-2 Tage später wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 2 % Formaldehyd 10 min fixiert und daran anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Eine deutlich verstärkte Fluoreszenz wurde in pEGFP-N3-Cadherin transfizierten Zellen an Zell-Zellkontakten beobachtet (siehe Abb. 57 a), während in DsRed-FGFR-1 exprimierenden Zellen eine ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkte Fluoreszenz detektiert wurde.

Hingegen zeigte in doppeltransfizierten Zellen (siehe Abb. 57 b obere Zelle) GFP-N-Cadherin in Gegenwart von DsRed-FGFR-1 eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation (siehe Abb. 57 b untere Zelle).

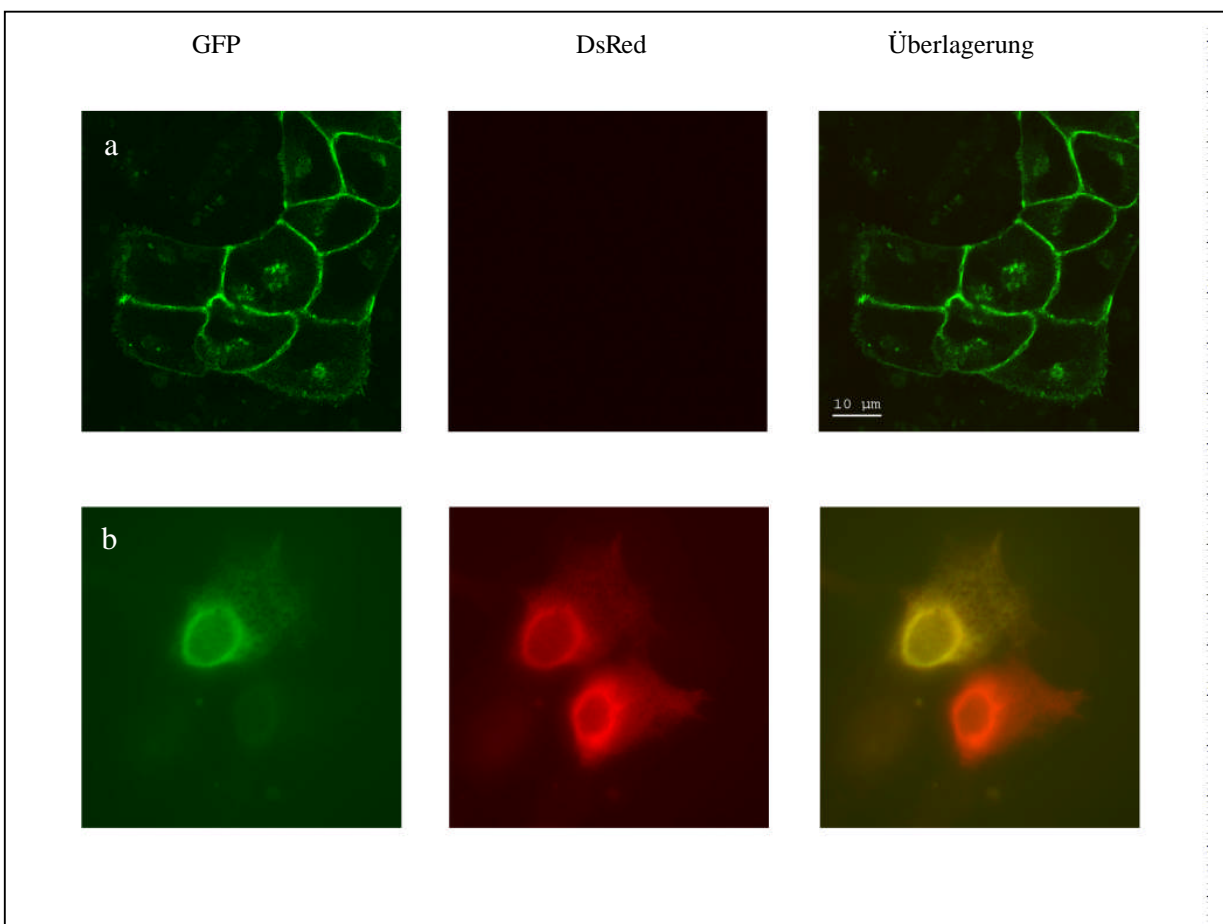


Abb. 57: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der intrazellulären Lokalisation von DsRed-FGFR-1 und GFP-N-Cadherin in CHO-Zellen Expression von EGFP-N3-N-Cadherin (a) und DsRed-FGFR-1 (b – untere Zelle) und Coexpression von EGFP-N3-N-Cadherin und DsRed-FGFR-1 (b – obere Zelle).

8.5.2. Bindungsstudien

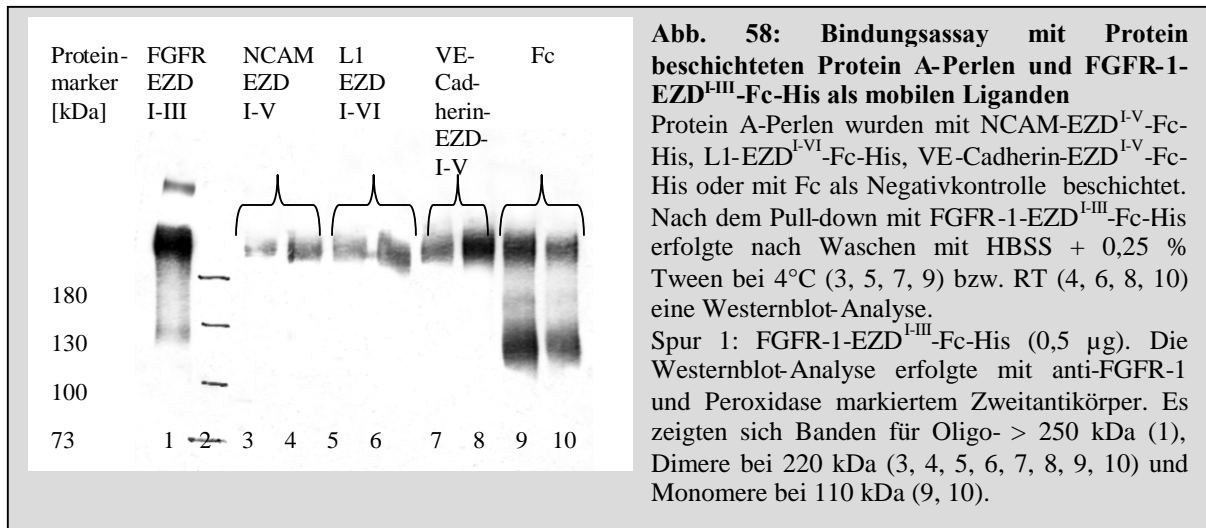
In Bindungsstudien wurden Domänen-typische Interaktionen der zu untersuchenden Proteine analysiert. Dabei war es von entscheidender Bedeutung ein geeignetes System zu finden, in dem sich spezifische Protein-Wechselwirkungen nachweisen ließen.

8.5.2.1. Pull-down-Versuche

Ziel dieser Versuche war es, auf die Oberfläche von Mikroperlen einen Proteinbindungspartner zu immobilisieren. Mit Hilfe dieser Perlen sollte der mobile, sich in Lösung befindliche Bindungspartner durch spezifische Wechselwirkung mit dem immobilisierten Bindungspartner aus der löslichen Phase entfernt werden.

8.5.2.1.1. Bindungsstudie mit Protein A-Perlen

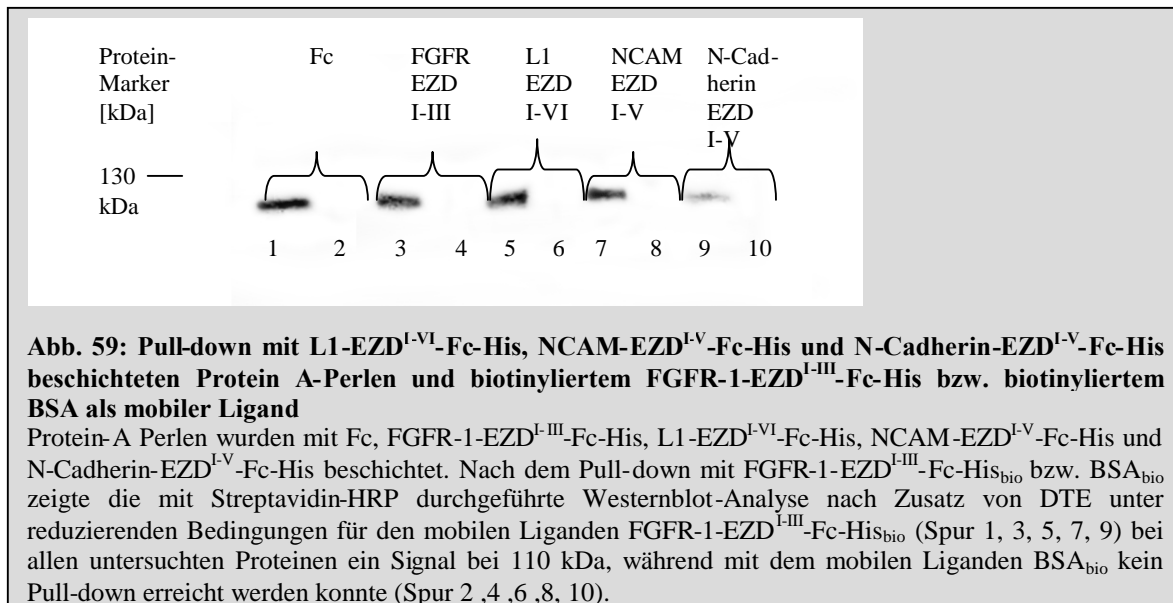
Hierzu wurden mit den Fusionsproteinen FGFR-EZD^{I-III}-Fc-His, NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His, L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, VE-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und mit Fc beschichtete Protein-A Perlen (siehe 6.3.12.) in einem Eppendorf-Gefäß mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His (10 µg/ml) für 1,5 h bei 200 rpm und RT inkubiert. Anschließend wurden die Perlen von ihrem Überstand befreit, indem das Eppendorf-Gefäß in eine Magnethalterung gegeben wurde. Aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaft wurden die Perlen von dem Magneten angezogen und der Überstand entfernt. Auf diese Weise erfolgte ein viermaliges Waschen der Perlen mit je 100 µl HBSS + 0,05 % Tween für jeweils 10 min bei 200 rpm und 4°C bzw. RT. Anschließend wurden die gebundenen Proteine von den Perlen mit SDS-Auftragspuffer abgelöst und nach Entfernung der Perlen einer 7,5 %igen SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Westernblot-Analyse (siehe Punkt 6.3.4.) unterworfen. Da in diesem Versuch auch mit Fc-beschichteten Protein-A-Perlen eine Wechselwirkung mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His erhalten wurde (siehe Abb. 58), konnte dieser Versuchsansatz nicht für Bindungsstudien verwendet werden.



Um eine Kreuzreaktion des FGFR-1-Antikörpers auszuschließen, wurde der Bindungsassay mit biotinyliertem FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His (siehe Punkt 6.3.11.) durchgeführt. Zusätzlich wurde die Konzentration von FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} auf 2 µg/ml herabgesetzt. Eine Wechselwirkung von Biotin mit den zu untersuchenden Proteinen wurde durch Einsatz von biotinyliertem BSA (BSA_{bio}) berücksichtigt. Die Inkubation zwischen dem mobilen und immobiligen Liganden erfolgte bei RT, 200 rpm und 2 h. Die Perlen wurden daran anschließend mit 2 x 500 µl HBSS + 0,05 % Tween bei 5 min, RT und 200 rpm gewaschen.

Anschließend erfolgte mit den Perlen eine 7,5 %ige SDS-Gelelektrophorese und daran anschließend eine Westernblot-Analyse in Gegenwart eines Streptavidin Antikörpers (siehe Punkt 6.3.4.).

Da die Negativkontrollen Fc und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His im Pull-down mit den Protein behandelten Perlen weiterhin interagierten (siehe Abb. 59), war es nicht möglich diese Methode für Bindungsstudien zu verwenden.

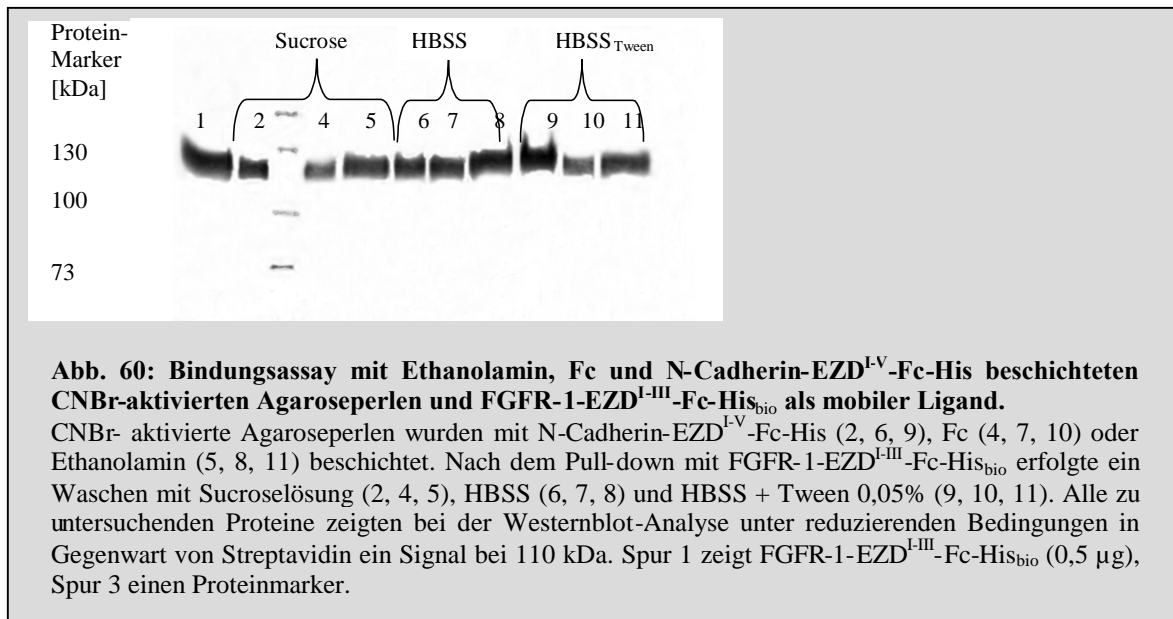


8.5.2.1.2. Bindungsstudie mit CNBr- (Cyanobromid) aktivierten Agaroseperlen

CNBr-aktivierte Agaroseperlen (10 µl) wurden mit verschiedenen Substanzen (Ethanolamin, Fc und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His) behandelt (siehe Punkt 6.3.13) und diese jeweils in einem Eppendorf-Gefäß mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} (2 µg/ml in HBSS) bei 4°C, üN und 200 rpm inkubiert.

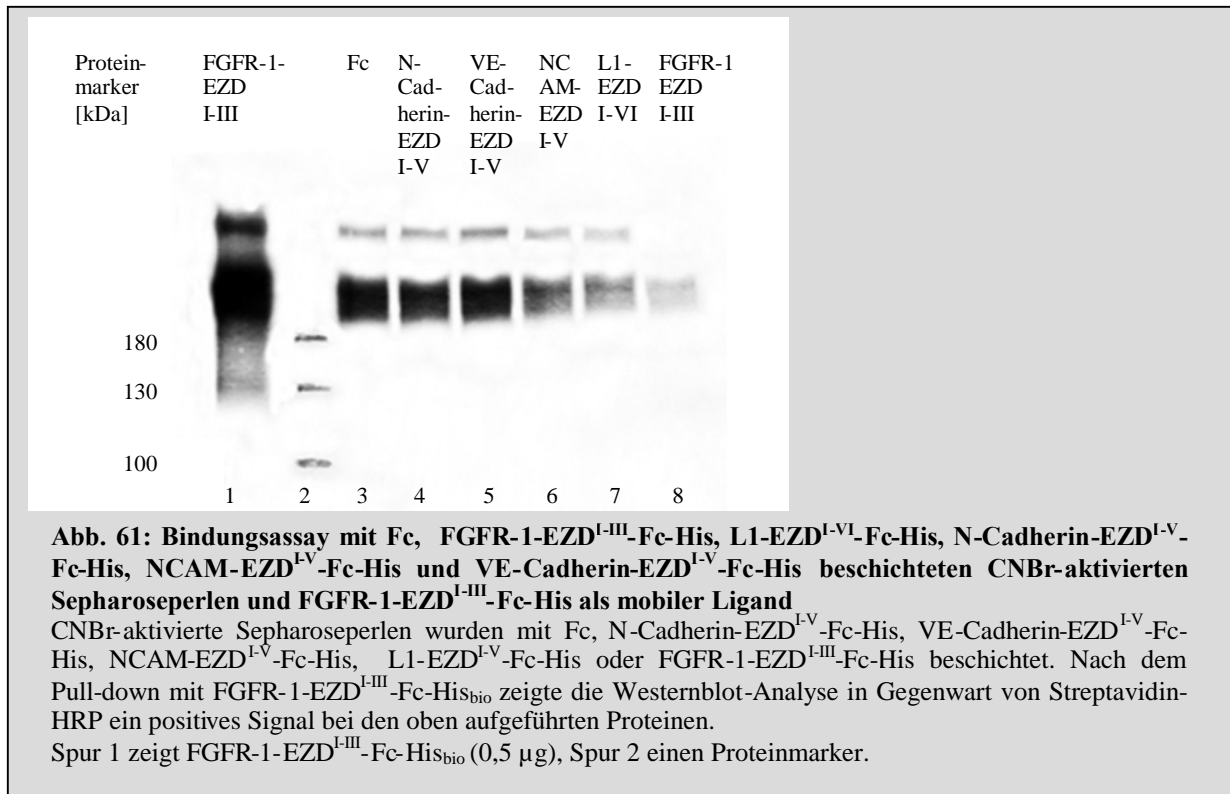
Am folgenden Tag wurde nach Sedimentation der Perlen der Überstand verworfen. Um unspezifisch gebundenes FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} zu entfernen, wurden die Perlen 3 x für 5 min bei 200 rpm mit verschiedenen Waschlösungen gewaschen: 3x 500 µl 50 %iger Sucrose Lösung, 3 x 500 µl HBSS und 3 x 500 µl HBSS + 0,05 % Tween.

Anschließend wurden die Perlen in 20 µl Auftragsprobenpuffer aufgenommen und nach Zusatz von DTE einer 7,5%igen SDS-Gelelektrophorese unterworfen. Eine anschließende Westernblot-Analyse (siehe Punkt 6.3.4.) wurde unter Verwendung von Streptavidin-HRP durchgeführt. Da mit Fc, Ethanolamin und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His behandelte Perlen weiterhin mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} interagierten (siehe Abb. 60), konnte auch dieser Ansatz für Bindungsstudien nicht verwendet werden.



8.5.2.1.3. Bindungsstudie mit CNBr-aktivierten Sepharoseperlen

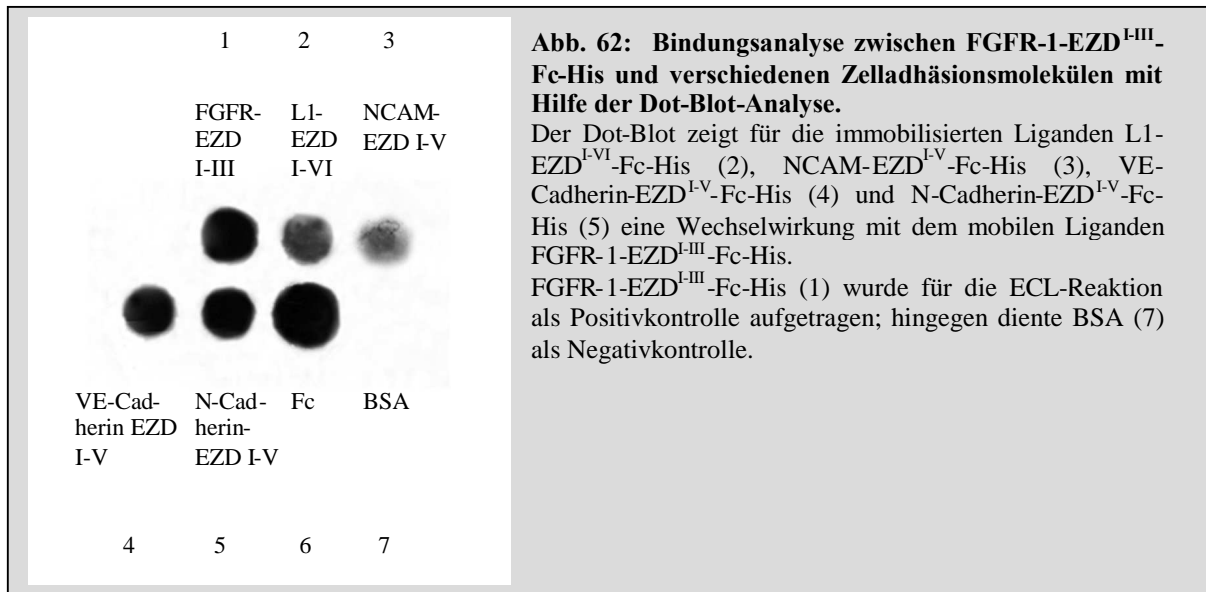
CNBr-aktivierte Sepharoseperlen (15 µl) wurden mit Fc, FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His, L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His und VE-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His beschichtet (siehe Punkt 6.3.14.), jeweils in ein Eppendorf-Gefäß mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} (2 µg/ml in 200 ml HBSS) gegeben und üN bei 4°C und 200 rpm inkubiert. Nach Sedimentation der Perlen wurde der Überstand verworfen. Das Waschen der Perlen erfolgte mit 3 x 1 ml PBS + 0,05 % Tween für je 5 min bei RT und 200 rpm. Anschließend wurden die Perlen in Probenpuffer aufgenommen und nach einer 7,5 %igen SDS-Gelelektrophorese einer Westernblot-Analyse mit Streptavidin-HRP unterworfen (siehe Punkt 6.3.4.). Da auch hier Fc und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His mit den immobilisierten Liganden wechselwirkten (siehe Abb. 61), wurde der Pull-down-Assay als Versuchsansatz zwischen den CAM und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His aufgegeben.



8.5.2.2. Untersuchung der Wechselwirkung zwischen FGFR-1 und N-Cadherin Fusionsproteinen mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse

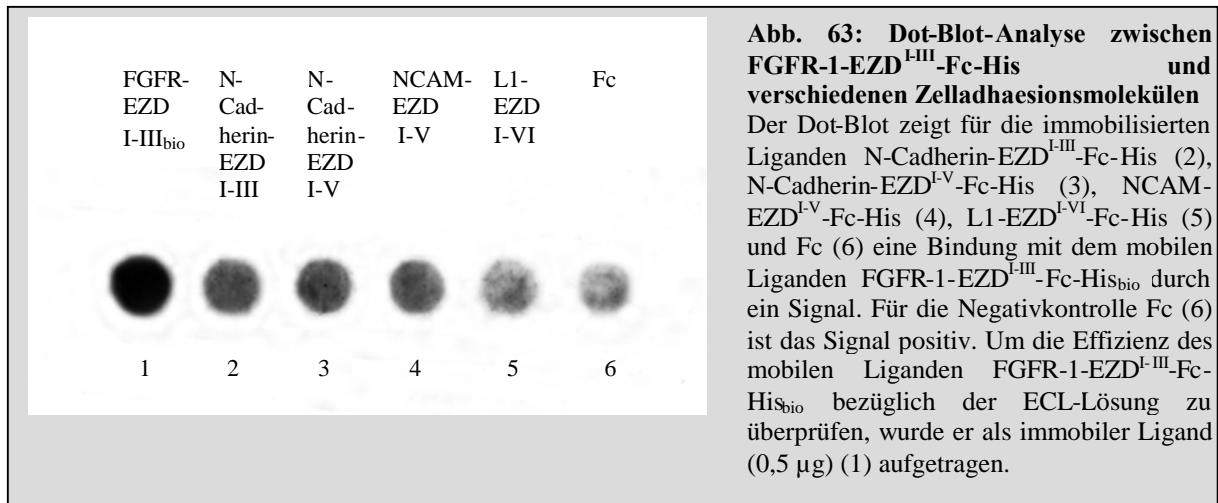
8.5.2.2.1. Versuchsansatz 1

Mit Hilfe einer Vakuumblotappatur wurden 5 µg der Proteine (BSA, Fc, FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His, L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His und VE-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His) gelöst in 300 µl HBSS, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und diese mit dem mobilen Liganden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His (20 µg/ml in HBSS) bei 37°C für 2h inkubiert. Daran anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 3 x 5 min mit PBS + 0,05 % Tween bei Raumtemperatur gewaschen und mit anti-FGFR über Nacht bei 4°C in Gegenwart des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers inkubiert (siehe Punkt 5.13). Da in der daran anschließenden ECL-Entwicklung auch die immobilisierte Negativkontrolle Fc mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His interagiert (siehe Abb. 62), konnte dieser Versuchsansatz für Bindungsstudien nicht verwendet werden.



8.5.2.2.2. Versuchsansatz 2

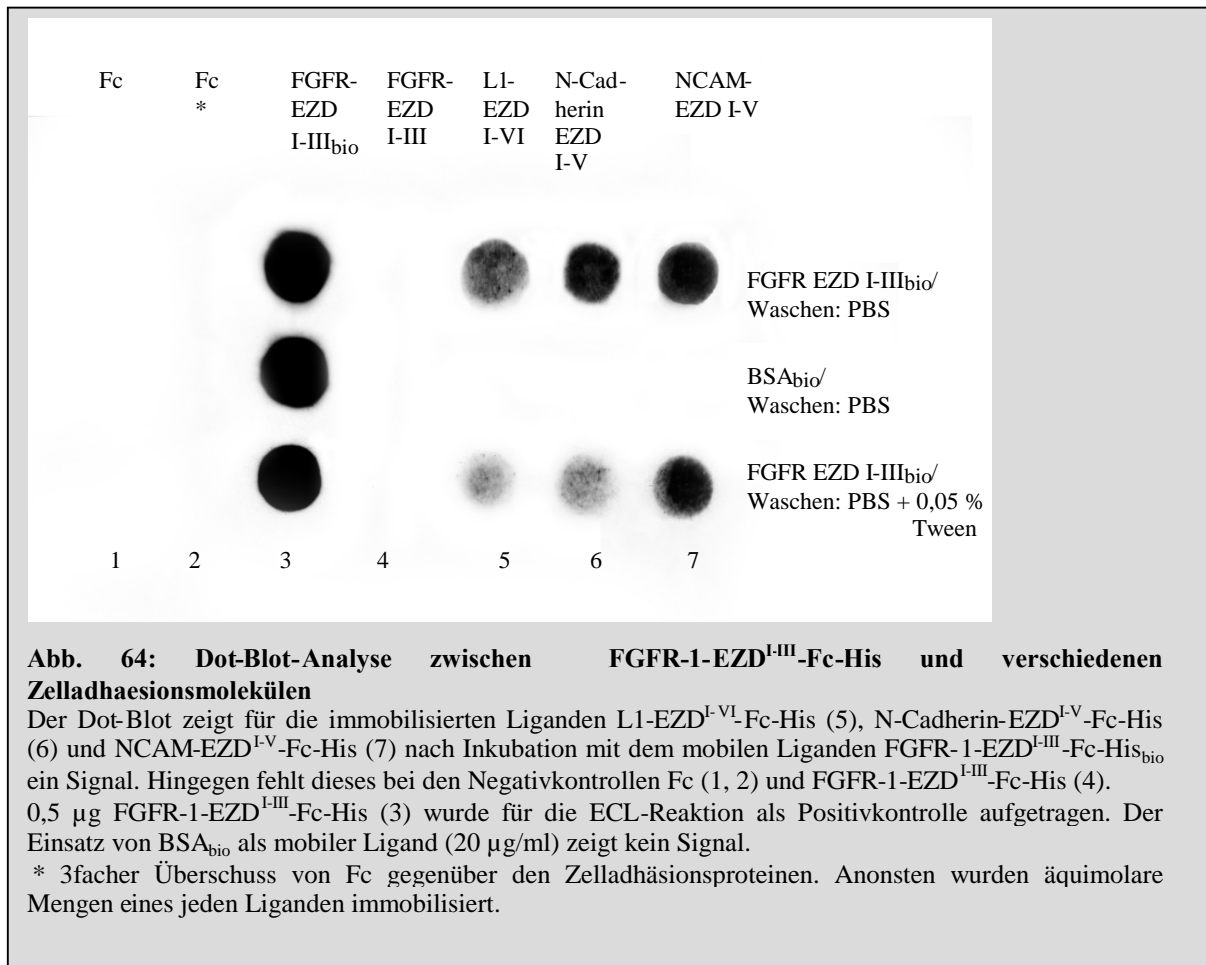
In diesem Versuchsansatz wurde der mobile Ligand FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His biotinyliert. Hierdurch sollte die unspezifische Interaktion zwischen der Negativkontrolle und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His verhindert bzw. reduziert werden. Die Dot-Blot-Analyse wurde wie unter Punkt 6.3.5. beschrieben durchgeführt. Infolge der Biotinylierung von FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His wurde die Nitrozellulosemembran direkt mit Streptavidin-HRP inkubiert. Da auch unter diesen Bedingungen die Negativkontrolle mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} interagiert (siehe Abb. 63), mussten weitere Optimierungsversuche durchgeführt werden. Hierzu wurde der Inkubationsschritt zwischen der Nitrozellulosemembran und den Liganden nicht in Gegenwart von PBS, sondern HBSS durchgeführt. Gleichzeitig wurden auch die zu immobilisierenden Proteine in HBSS gelöst, bevor diese auf die Nitrozellulosemembran geblottet wurden (siehe 8.5.2.2.3. Versuchsansatz 3).



8.5.2.2.3. Versuchsansatz 3

10 µg der immobilisierten Proteine wurden in 300 µl PBS an Stelle von HBSS gelöst. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran wie unter 8.5.2.2.2. beschrieben. Unspezifische Bindungsereignisse sollten durch stringenteres Waschen, d.h. 3 x 5 min Waschen mit PBS bzw. PBS + 0,05 % Tween, verhindert werden. Letzteres führte beim Waschen im Gegensatz zu PBS unter Verwendung von Streptavidin-HRP zu einer deutlichen Verminderung der unspezifischen Wechselwirkung (siehe Abb. 64).

Da unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungsereignisse zwischen löslichen Liganden und der Negativkontrolle ausblieben, wurden diese Versuchsbedingungen in zukünftigen Dot-Blot-Untersuchungen eingesetzt.



8.5.2.2.4. Überprüfung des Bindungsmotives

Nachdem es nun gelungen war eine spezifische Interaktion zwischen N-Cadherin und FGFR-1 mit Hilfe des Dot-Blot-Verfahrens nachzuweisen, sollten nun die hierfür verantwortlichen Bindungsmotive untersucht werden. Hierbei gewährleistet ein solch proteinbiochemischer Ansatz Interaktionen zwischen Proteinen unter definierten Bedingungen zu untersuchen und ist somit komplexen zellbiologischen Versuchsansätzen, wie beispielsweise dem zuvor durchgeführten Körnerzell-Assay (vg. 8.5.1.1.1-8.5.1.1.3.) deutlich überlegen.

Das Aufbringen der immobilen Liganden FGFR-1 auf Nitrozellulosemembranstreifen erfolgte wie unter Punkt 8.5.2.2.3. beschrieben. Das N-Cadherin-spezifische Bindungsmotiv wurde wie folgt überprüft:

N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His wurde für 2 h bei RT und 200 rpm in Gegenwart bzw. Abwesenheit eines 300-fachen molaren Überschusses eines HAV enthaltenen Peptides von FGFR-1 inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Vakuumblyotapparat auf eine Nitrozellulosemembran transferriert. Diese wurde anschließend für 1 min mit PBS

gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 20 µg/ml FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und ein daran anschließender Inkubationsschritt für 2 h bei 37°C und 200 rpm. Um die Spezifität des HAV-Peptides auf die FGFR-1-N-Cadherin-Interaktion zu überprüfen, wurde in einem parallelen Ansatz das Nonsense VHA-Peptid verwendet. Im Falle des immobilisierten Proteins N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His, das gegenüber FGFR-1-EZD^{I-V}-Fc-His kein Bindungsmotiv besitzt, entfiel die Vorinkubation mit den Peptiden.

Das Bindungsmotiv von FGFR-1 wurde wie folgt überprüft: Der mobile Ligand FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml für 2 h bei RT und 200 rpm mit bzw. ohne einem 300-fach molaren Überschuss einer N-Cadherin-spezifischen IDPVNGQ-Peptidlösung inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation des immobilisierten Liganden N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His mit dieser Lösung für 2 h bei 37°C und 200 rpm. Um den Effekt des IDPVNGQ-Peptides auf die FGFR-1 N-Cadherin-Interaktion zu überprüfen, wurde auch hier in einem parallelen Ansatz das Nonsense QGVNDIP-Peptid eingesetzt.

Die Nitrozellulosemembran wurde schließlich für 3 x 5 min in PBS gewaschen und für 30 min direkt mit dem Peroxidase-markierten Streptavidin-Antikörper bei RT inkubiert. Protein-Interaktionen wurden mit Hilfe der ECL-Technik visualisiert (siehe Abb. 65).

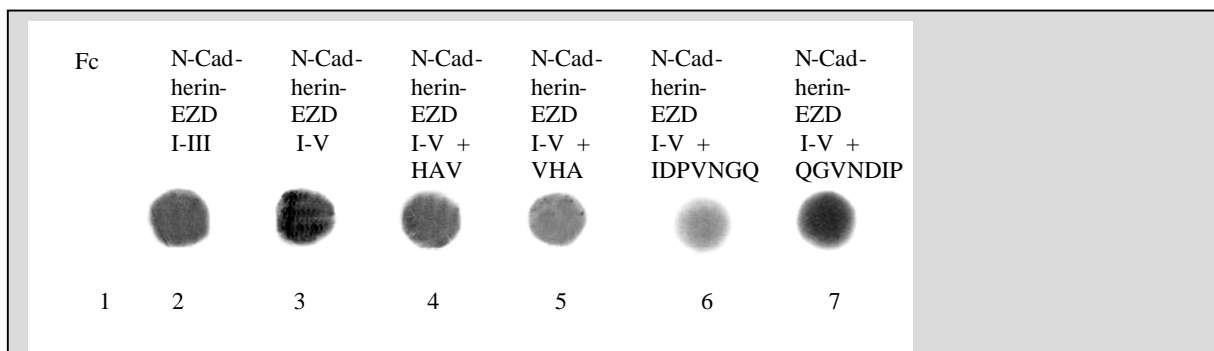
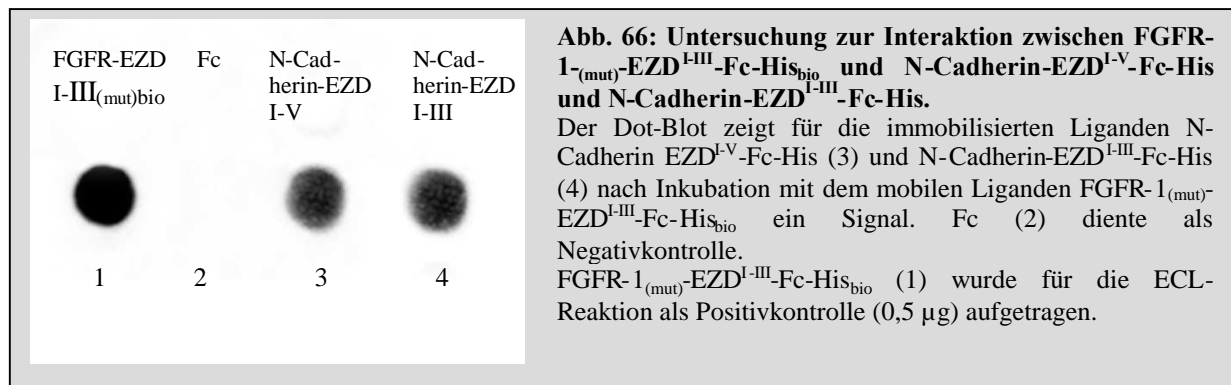


Abb. 65: Dot-Blot-Analyse zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His und verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen zur Überprüfung des Bindungsmotives

Der Dot-Blot zeigt nach Überschichtung mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} in An- bzw. Abwesenheit interaktionsinhibierender Peptide für folgende immobilisierte Liganden Signale: N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His (2), N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His (3), N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His inkubiert mit HAV (4) und VHA (5). Nach Inkubation des mobilen Liganden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} mit dem IDPVNGQ-Peptid (6) bzw. QGVNDIP-Peptid (7) zeigt N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His ein Interaktionssignal. Die Negativkontrolle Fc (1) zeigte nach Inkubation mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} kein Interaktionssignal.

Das FGFR-1 spezifische N-Caderin-Bindungsmotiv wurde zusätzlich unter Verwendung der Deletionsmutanten FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} untersucht (siehe Abb. 66). Der Versuch wurde wie bereits unter Punkt 8.5.2.2.3. beschrieben durchgeführt.



8.5.3. Bindungsstudien mit Hilfe der Laserpinzette

Auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen wurden PC12-Zellen so dicht ausgesät, dass sich am nächsten Tag ein konfluenter Zellrasen auf den Deckgläschen befand. Mikroperlen wurden jeweils mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His oder IgG beschichtet (siehe 6.3.12.). Für die Untersuchung mit der Laserpinzette wurden die beschichteten Mikroperlen 30 min auf PC12-Zellen in dekomplementiertem Medium belassen, um eine Bindung zwischen den zu untersuchenden Proteinen zu ermöglichen. Das Medium wurde für 30 min bei 65°C im Wasserbad dekomplementiert, um eine unspezifische Wechselwirkung von Proteinen des FCS mit den Zellen und Perlen zu verhindern. Nach Ablauf von 30 min wurde die Bindungsfestigkeit der Mikroperlen überprüft. Ließen sich die laserfokussierten Perlen durch die Bewegung des Laserstrahls nicht verschieben, galten sie als gebunden; lose Perlen sprangen hingegen ins Fadenkreuz des Laserstrahls und folgten den Bewegungen des Lasers.

Zur Überprüfung des für N-Cadherin spezifischen HAV-Bindungsmotivs IDPVNGQ, wurden die mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His beschichteten Mikroperlen mit einem 300-fach molaren Überschuss des HAV-Peptids versetzt. Die Inkubation der Mischung erfolgte für 2 h bei RT und 200 rpm. Mit Hilfe dieses Peptids sollte eine Bindung des FGFR-1 an N-Cadherin verhindert werden. Als Negativkontrolle wurde zu einem zweiten Ansatz das VAH-Peptid verwendet.

Zur Überprüfung des HAV-Bindungsmotivs, das auf der EZD von N-Cadherin der Körnerzellen lokalisiert ist, wurde auf ein Deckgläschen in Bezug auf die zugegebene N-Cadherin Konzentration ein 1000-facher Überschuss des IDPVNGQ-Peptids gegeben. Die Peptidmenge ist in diesem Fall größer, da im Vergleich zu den mit N-Cadherin beschichteten

Mikroperlen keine direkte Inkubation mit dem N-Cadherin erfolgen konnte. Nach 2 h Vorinkubation bei 37°C wurden auf die Zellen die mit N-Cadherin EZD^{I-V}-Fc-His beschichteten Perlen gegeben. Als Negativkontrolle wurden in einem parallelen Ansatz Peptide mit dem Motiv QGVNDIP anstelle von IDPVNGQ verwendet.

Nach der Inkubationszeit wurden die verschiedenen Mischungen jeweils auf die PC12-Zellen gegeben, für 30 min bei 37°C inkubiert und die Bindungsstärke von jeweils 100 Mikroperlen quantifiziert.

Auf PC12-Zellen (n = 5) hafteten mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His beschichteten Perlen mit $83 \pm 2 \%$, hingegen reduzierte sich die Haftung mit N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His beschichteten Mikroperlen auf $71 \pm 2 \%$ und Fc auf $34 \pm 4 \%$. Wurden N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His beschichtete Mikroperlen mit verschiedenen Peptiden inkubiert, konnte keine Wirkung der Peptide auf die Haftung festgestellt werden: Die Perlen hafteten in Kombination mit dem HAV-Peptid zu $79 \pm 2 \%$, VHA-Peptid zu $84 \pm 1 \%$, IDPVNGQ-Peptid zu $85 \pm 2 \%$ und QGVNDIP-Peptid zu $84 \pm 2 \%$ (siehe Abb. 67).

Da die Wechselwirkung zwischen dem ersten EZD von N-Cadherin untersucht werden sollte, wurde die Bindung zwischen mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His beschichteten Mikroperlen und PC12-Zellen als maximale Bindung angenommen und zugleich als Kontrollwert verwendet. Die Ca²⁺-Abhängigkeit der Bindung zeigt sich bei der Zugabe einer 5 mM EGTA-Lösung in das Kulturmedium. Die Bindung von N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His beschichteten Perlen an PC12-Zellen wurde durch EGTA auf $20 \pm 2 \%$ reduziert.

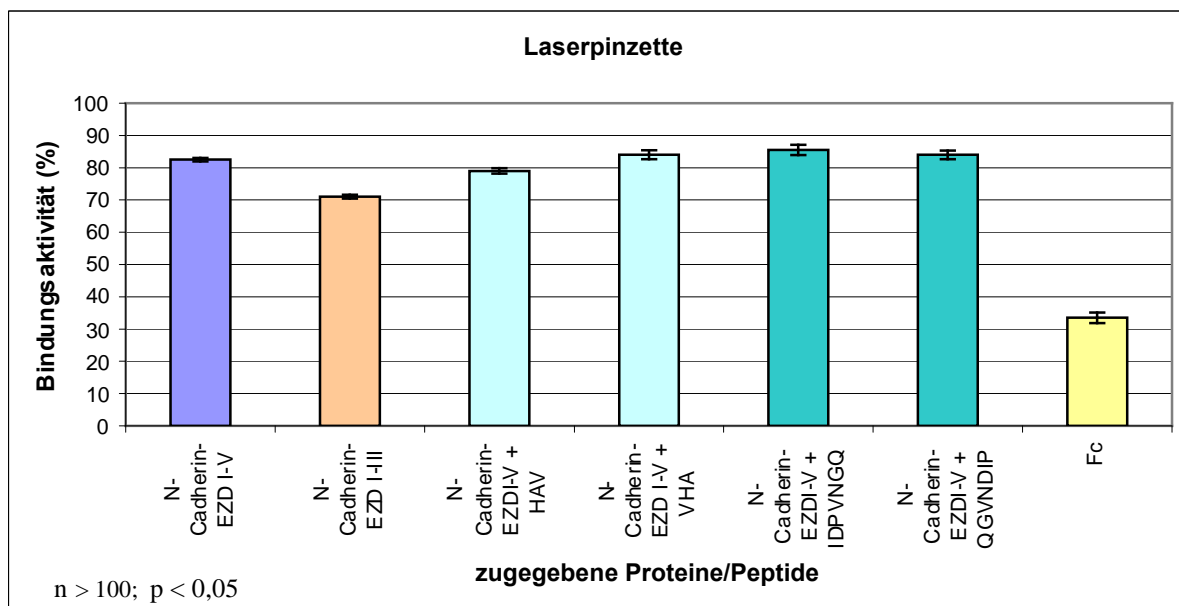


Abb. 67: Untersuchung der Wechselwirkung zwischen N-Cadherin und N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His bzw. N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His mit Hilfe der Laserpinzette (n=5). Pro Versuch wurden 100 Mikroperlen auf ihre Verschiebbarkeit getestet.

Angabe der Haftung von Protein beschichteten Mikroperlen auf PC 12-Zellen in %.

N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His	83 ± 2 %
N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His + HAV-Peptid	79 ± 2 %
N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His + VHA-Peptid	84 ± 1 %
N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His + IDPVNGQ-Peptid	85 ± 2 %
N-Cadherin-EZD ^{I-V} -Fc-His + QGVNDIP-Peptid	84 ± 2 %
N-Cadherin-EZD ^{I-III} -Fc-His	71 ± 2 %
Fc	34 ± 4 %

8.5.4. Bindungsstudien mit Hilfe des ELISA

Mit Hilfe des ELISA sollte die Bindung zwischen N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} näher untersucht werden. Dabei diente die Wechselwirkung zwischen immobilisiertem Fc und löslichem FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} als Negativkontrolle. Parallel wurde dazu die Bindungsstärke zwischen dem zu untersuchenden Protein (siehe unten) und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} bzw. FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} gemessen. Von diesem Ergebnis wurde die Fc-Fc-Wechselwirkung subtrahiert, um die spezifische Wechselwirkung zwischen dem zu untersuchenden Protein und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} zu erhalten.

Als mobile Liganden wurden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} bzw. FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} eingesetzt, während N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His, Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His und Fc als immobile Liganden fungierten (siehe Abb. 69, Abb. 70).

Die ELISA-Auswertung erfolgte mittels der Funktion $B(x) = B_{\max}(1 - e^{-kx})$. Dabei entspricht B der Konzentration des mobilen Liganden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} bzw. FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} in μM . B_{\max} entspricht der maximalen Bindung und k einer Konstante. Wie

unter 6.3.15. geschildert, wurde zur Bestimmung der Stärke der Wechselwirkung zwischen mobilen und immobilisierten Liganden die apparente Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Sie repräsentiert die Konzentration des immobilisierten Liganden (N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His, Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His und Fc), die in einer halbmaximalen Bindung zum entsprechenden mobilen Liganden (FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} bzw. FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio}) resultiert.

Der Korrelationskoeffizient war in allen Untersuchungen $> 0,91$.

8.5.4.1. Wechselwirkung zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His bzw. FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und Cadherinen ohne Berücksichtigung unspezifischer Fc-Fc Wechselwirkung

Hierzu wurden ELISA-Platten in Initialversuchen mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His beschichtet (0,5 µg/Vertiefung) und in Gegenwart der beiden mobilen Liganden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} inkubiert (siehe Abb. 68). Die Durchführung und Auswertung des ELISA erfolgte wie unter Punkt 6.3.15. beschrieben. Unter diesen Versuchsbedingungen interagierten FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His mit ähnlicher Effizienz (apparente $K_D = 0,07 \mu\text{M}$; $0,1 \mu\text{M}$ bzw. $0,09 \mu\text{M}$; $0,08 \mu\text{M}$ bei $n = 4$). Um den Einfluß der unspezifischen Fc-Fc Wechselwirkung quantitativ berücksichtigen zu können, wurden weitere ELISA mit Fc als immobilisierter Ligand durchgeführt.

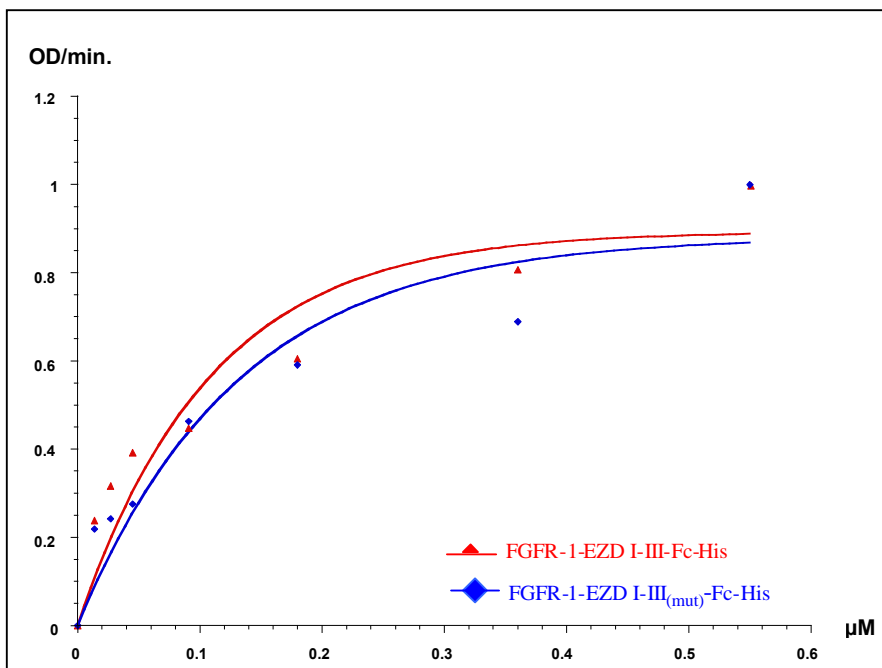


Abb. 68: Repräsentative Darstellung der ELISA-Wechselwirkungen der mobilen Liganden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} bzw. FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} mit dem immobilisierten Liganden N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His
Die apparenten Dissoziationskonstanten K_D lauten:

- FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} $0,09 \mu\text{M}$
- FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} $0,07 \mu\text{M}$

8.5.4.2. Wechselwirkung zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und Cadherinen unter Berücksichtigung unspezifischer Fc-Fc Wechselwirkung

Wie bereits erwähnt deuteten Pull-down- und Dot-Blot-Untersuchungen eine unspezifische Fc-Fc-Wechselwirkung der verwendeten Fusionsproteine an. Um dies zu berücksichtigen wurde ein ELISA mit Fc als zusätzlicher immobilisierter Ligand durchgeführt. Abb. 69 zeigt die Stärke der unspezifischen Fc-Fc Wechselwirkung. Somit war es möglich Wechselwirkungen zwischen N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} bezüglich der unspezifischen Fc-Fc Wechselwirkung zu korrigieren (siehe Abb. 70).

Nach Berücksichtigung der Fc-Fc Wechselwirkung lauteten für N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His die apparenten Dissoziationskonstanten $K_D = 0,02 \mu\text{M}$ (statt $K_D = 0,09 \mu\text{M}$), für Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His $K_D = 0,07 \mu\text{M}$ (an Stelle von $K_D = 0,19 \mu\text{M}$) und für Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His $K_D = 0,04$ (statt $K_D = 0,22 \mu\text{M}$).

Dabei zeigten N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} die stärksten Wechselwirkungen (apparente $K_D = 0,02 \mu\text{M}$). Während Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His und Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} die apparente $K_D = 0,04 \mu\text{M}$ bzw. $K_D = 0,07 \mu\text{M}$ aufwiesen.

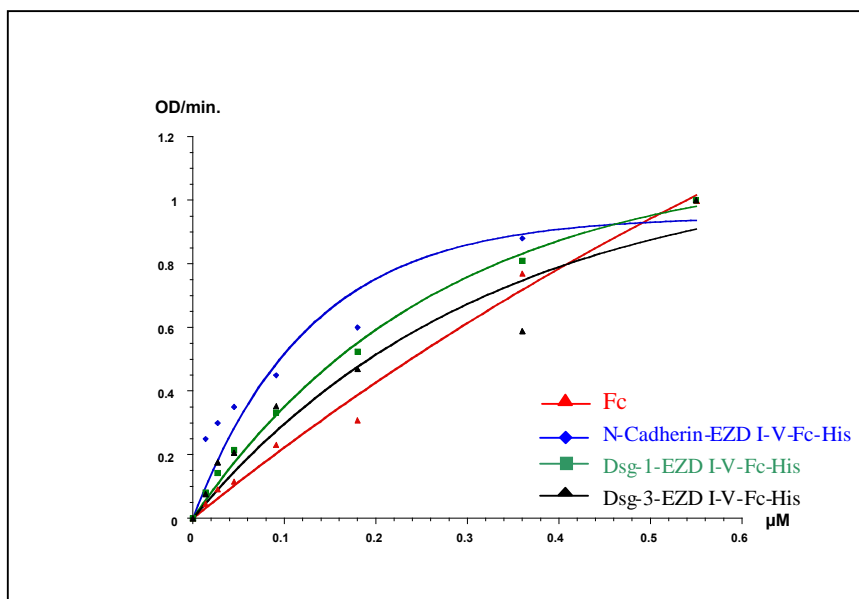


Abb. 69: Wechselwirkung des mobilen Liganden FGFR-1 EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} mit dem immobilisierteren Liganden Fc, Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His und Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His.

Die apparenten Dissoziationskonstanten K_D lauten:

- Fc $0,08 \mu\text{M}$
- N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His $0,09 \mu\text{M}$
- Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His $0,19 \mu\text{M}$
- Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His $0,22 \mu\text{M}$

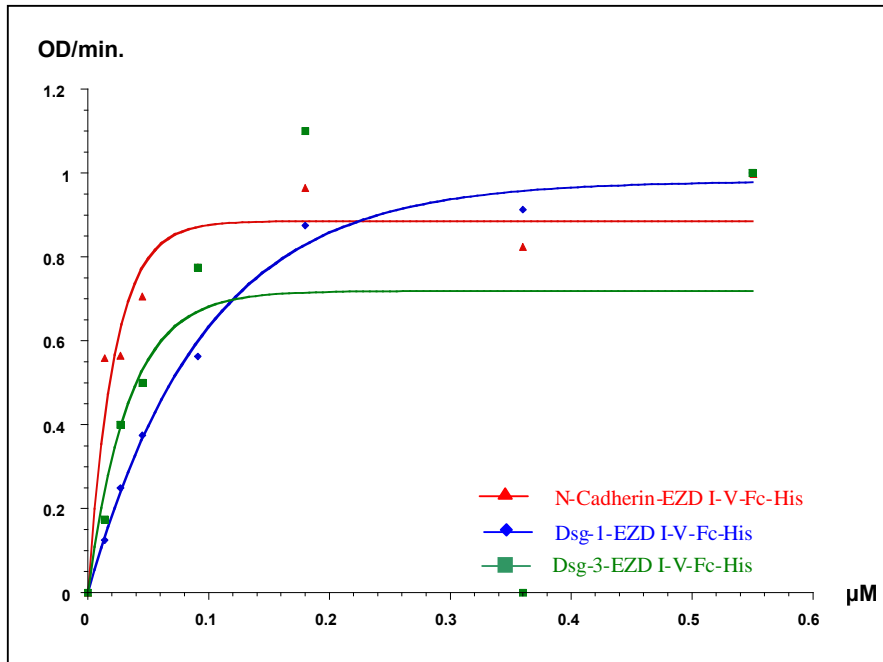


Abb. 70: Wechselwirkung des mobilen Liganden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} mit den immobilen Liganden Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His und Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His unter Berücksichtigung der unspezifischen Fc-Fc-Wechselwirkung.

Die apparenten Dissoziationskonstanten K_D lauten:

- N-Cadherin- EZD^{I-V}-Fc-His 0,02 µM
- Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His 0,07 µM
- Desmoglein-3- EZD^{I-V}-Fc-His 0,04 µM

9. Diskussion

Ein gerichtetes Neuritenwachstum ist notwendig, um die funktionelle Integrität des Nervensystems zu gewährleisten. Mit Hilfe von extrazellulären Rezeptoren wie FGFR-1 erfasst der Wachstumskegel des Neurons Schlüsselreize, setzt diese in intrazelluläre Signalkaskaden um und beteiligt sich an Prozessen wie gerichtetes Axonwachstum bzw. Axonregeneration (Dunican et al., 2000). Obwohl keine direkten Wechselwirkungen zwischen CAMs und FGFR-1 bisher gezeigt werden konnten (Groth et al., 2002), deuten zahlreiche Untersuchungen daraufhin, dass CAMs wie N-Cadherin, NCAM und L1 das zielgerichtete Axonwachstum durch Aktivierung des FGFR-1 stimulieren können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher mögliche direkte Wechselwirkung zwischen N-Cadherin und FGFR-1 nachzuweisen und diese zu untersuchen.

9.1. Generierung von Expressions-Vektoren und -Zelllinien

Zur Herstellung stabiler eukaryotischer Expressionszelllinien wurden cDNAs in den Expressionsvektor pEGFP-N3 kloniert. Die Aufreinigung der ins Medium sezernierten Proteine wurde dadurch gewährleistet, dass sich am Carboxyterminus der Fc-Teil des humanen IgG befand und so eine Proteingewinnung über eine Protein-A Säule möglich war. Zusätzlich wurde ein Histidin-Tag eingeführt, so dass eine alternative Isolierung mit Hilfe der NTA-Nickelsäulen-Affinitätschromatographie zu Verfügung stand. Die so aufgereinigten Proteine wurden schließlich in Protein-Bindungsstudien eingesetzt. Um einen negativen Einfluss des pEGFP-N3 kodierendes GFP auf die Bindungsstudien zu vermeiden, wurde die Translation eines GFP-Fusionsproteins durch ein Stop-Codon verhindert. Als grundlegende Ausgangsvektoren wurden die Expressionsvektoren pEGFP-N3-FGFR-EZD^{I-III}-Fc-His und pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His konstruiert. Von diesen ausgehend wurden weitere Expressionsvektoren hergestellt, die innerhalb potentieller Bindungsmotive mutiert worden waren (pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His, pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His und pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His). Diese sollten dazu dienen spezifische Bindungsexperimente unter nativen Bedingungen (d.h. unter Erhaltung der Proteintertiärstruktur) durchführen zu können.

Hierzu zählen Expressionsvektoren die für Fusionsproteine kodierten, die Mutationen innerhalb des N-Cadherin-CHD-Bindungsmotives bzw. der FGFR-1-CHD enthielten. Zusätzlich wurden Konkurrenzexperimente in Gegenwart FGFR-1- bzw. N-Cadherin-abgeleiteter Peptide durchgeführt.

Das CHD-Bindungsmotiv von N-Cadherin wurde sowohl mit Hilfe der Deletionsmutante N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His und der Substitutionsmutante N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V} L^{III+IV+V}-Fc-His (hier wurde das CHD-Bindungsmotiv vollständig deletiert) als auch mit Hilfe der Substitutionsmutante FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His (LHAVP → DHDAG) untersucht. Letztere wurde so konzipiert, um mögliche durch substituierte Aminosäuren induzierte Veränderungen der Tertiärstruktur zu minimieren bzw. zu vermeiden. Daher wurden neben den als Bindungstasche fungierenden Aminosäuren HAV auch die angrenzenden Aminosäuren mutiert.

Da sich die Herstellung des Expressionsvektors pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His mit Hilfe der konventionellen PCR (Einführung der Mutation durch überlappende PCR (bp 180-550; 550-1129) als nicht durchführbar erwies, wurde das Konstrukt durch inverse PCR generiert (siehe Abb. 23), wobei die Wahl der Polymerase für die „fidelity“ der Amplifikation von entscheidender Bedeutung war. Hierbei zeigte sich die Phusion-Polymerase der Pfu-Polymerase überlegen. Gegenüber den anderen Konstrukten führte die Expression von pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His in CHO-Zellen häufig zur Apoptose. Die Etablierung einer stabilen Zelllinie gelang dennoch und die integrierte pEGFP-N3-FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His-cDNA konnte mittels RT-PCR nachgewiesen werden (siehe 8.1.1.1.3.).

Im Falle der Konstruktion des Expressionsvektors pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His wurden die überlappenden Fragmente N-Cadherin-EZD^{I-III}L^{III} und N-Cadherin-EZD^V amplifiziert, und das daraus resultierende PCR-Fragment mit dem Cadherin-EZD^V-L^{IV+V}-Fc-Amplifikat durch Ligation zusammengeführt. Eine anschließende InFusion-Rekombination inserierte schließlich die N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His-cDNA in den entsprechend vorbereiteten Vektor pEGFP-N3. Auch hier zeigten mit pEGFP-N3-N-Cadherin-EZD^{I-III+V+V}-L^{III+IV+V}-Fc-His transfizierte CHO-Zellen Apoptose, die jedoch so ausgeprägt war, dass eine Etablierung einer stabilen Zelllinie nicht möglich war.

Alle anderen stabilen Zelllinien dienten der Sezernierung der gewünschten Fusionsproteine (d.h. N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His, FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His und FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His) ins Zellkulturmedium

Zusätzlich wurde ein Fc-His-exprimierender Vektor generiert, der dazu dienen sollte, dass in Kontroll-Bindungsassays zuvor eingesetzte käufliche Fc durch Fc-His zu ersetzen. Da keine Zelllinie generiert werden konnte, die das Protein in nennenswerten Mengen produzierte, musste für die Bindungsassays wieder auf das käufliche Fc zurückgegriffen werden.

Als transiente CHO-Zelllinien entstanden GFP-N3-N-Cadherin und DsRed-FGFR-1. Diese dienten subzellulären Lokalisationsuntersuchungen von N-Cadherin und FGFR-1 (siehe 8.5.1.2).

9.2. Untersuchung zum Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen

Doherty P., Walsh F. und Williams EJ. führten intensive Untersuchungen zum Einfluss von CAM, Peptiden, Antikörpern und Inhibitoren, unter Vermittlung von FGFR, auf das Wachstums-/Regenerationsverhalten von cerebellären Körnerzellen, PC12-Zellen, retinale Ganglienzellen und Hypocampusneuronen zurück (Williams EJ. et al., 2002; Brittis et al., 1996; Williams EJ et al., 1994; Doherty P. et al., 1990). Basierend auf den Ergebnissen entstand das bereits erläuterte hypothetische Drenckhahn-Bindungsmodell (siehe 4.5.4.), wonach Wechselwirkungen zwischen transdimeren N-Cadherin-Molekülen über die Aminosäuren IDPVNGQ der EZD von N-Cadherin und den Aminosäuren HAV der EZD von FGFR-1 stattfinden (siehe Abb. 17).

An dieser Stelle, sollte betont werden, dass die von Williams EJ. et al., (2002), Brittis et al., (1996), Williams EJ et al., (1994), Doherty P. et al., (1990) durchgeführten Bindungsstudien ausschließlich auf Wechselwirkungen zwischen Proteinen/Peptiden und Zellen fundierten. In der vorliegenden Arbeit wurden daher nicht nur Wechselwirkungen zwischen Proteinen/Peptiden und cerebellären Körnerzellen untersucht, sondern auch Bindungsstudien zwischen Proteinen mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse und des ELISAs durchgeführt. Letztere sind komplexen zellbiologischen Versuchsansätzen insofern vorzuziehen, da diese unter definierten Bedingungen durchgeführt werden können.

In ersten Versuchen wurden die wachstumsfördernden Einflüsse von N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His, L1-EZD^{I-VI}-Fc-His und NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His auf cerebelläre Körnerzellen durch Axonlängenwachstumsmessungen 24 h nach Applikation der Fusionsproteine quantifiziert. Um dies zu ermöglichen, wurde hierzu der depolarisierende und damit wachstumsfördernde Effekt von Kaliumionen und die Konzentration der Wachstumsfaktoren in FCS möglichst klein gehalten (siehe 8.5.1.1.1). Dabei zeigten der Wachstumsfaktor FGF-2 ebenso wie die zu untersuchenden Proteine N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, L1-EZD^{I-VI}-Fc-His und NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His im Vergleich zu unbehandelten Körnerzellen einen signifikanten wachstumsfördernden Effekt; während die Negativkontrollen Fc, Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His erwartungsgemäß keinen Einfluss auf das Axonwachstum ausübten (siehe Abb. 55). Zusätzlich wurden in Gegenwart ausgewählter Peptide Konkurrenzexperimente

durchgeführt, die dazu dienen sollten, die Funktionalität der N-Cadherin- und FGFR-1-spezifischen Bindungsmotive zu untersuchen (siehe 8.5.1.1.3). Im Falle der Zugabe des Fusionsproteins N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His wurde das FGFR-1-spezifische Peptid HAV den cerebellären Körnerzellen zugegeben. Parallel durchgeführte Versuche mit dem Nonsense-Peptid AVH dienten der Kontrolle. 24 h post Applikation zeigte sich zum Kontrollversuch ein signifikanter inhibierender Effekt im Axonwachstum der cerebellären Körnerzellen. Dabei reduzierte sich die durchschnittliche Axonlänge von 57 μm \pm 2,6 μm auf Kontrollwerte (35 μm \pm 1,0 μm) (siehe Abb. 56). Dagegen wurde das auf den cerebellären Körnerzellen befindliche Bindungsmotiv des FGFR-1 durch Zugabe des N-Cadherin-spezifischen IDPVNGQ-Peptids überprüft. Auch hier wurden Kontrollversuche in Gegenwart eines vom IDPVNGQ-Peptids abgeleiteten Nonsense-Peptids durchgeführt. Trotz Zugabe von N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His auf solch behandelte Zellen konnte im Vergleich zu cerebellären Körnerzellen, die mit dem Nonsense-Peptid behandelt worden waren, ein signifikanter inhibierender Effekt auf das Axonwachstum festgestellt werden. So veränderte sich die durchschnittliche Axonlänge infolge der sequentiellen Behandlung der cerebellären Körnerzellen mit dem IDPVNGQ-Peptid und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His gegenüber unbehandelte Zellen nicht (35 μm \pm 0,9 μm versus 35 μm \pm 0,9 μm). Die Zugabe des Nonsense-Peptids und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His erhöhte dagegen das durchschnittliche Axonwachstum auf 59 μm \pm 3,1 μm , was einem Axonlängenwachstum unter N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-fördernden Bedingungen entsprach (57 μm \pm 2,6 μm).

Untersuchungen von Takeichi (1990) zeigten, dass das FGFR-1-spezifische Bindungsmotiv HAV ebenfalls in N-Cadherin vorkommt und innerhalb der 1. EZD lokalisiert ist. Darüber hinaus liegt in unmittelbarer Nachbarschaft die AS-Sequenz INSPISG die eine zum IDPVNGQ-Bindungsmotiv ähnliche räumliche Struktur aufweist. Das von Drenckhahn entworfene Modell zur Rolle von Cadherin bei der Aktivierung des FGFR-1 postuliert eine mögliche homophile Wechselwirkungen zwischen N-Cadherin-cis-Dimeren in trans (siehe Abb. 17). Somit ist durch homophile Transbindungen zwischen N-Cadherin cis-Dimeren der Plasmamembran von Körnerzellen eine Oligomerisierung zu erwarten. Diese könnte entsprechend der Abbildung 17 illustrierten Modellvorstellung eine Dimerisierung von FGFR bewirken und so in einem axonwachstumsfördernden Effekt des entsprechenden Neurons resultieren. Überraschenderweise zeigten cerebelläre Körnerzellen, 24 h nach Behandlung mit N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His kein signifikantes Axonwachstum. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass für eine räumlich korrekte cis-Dimerisierung des N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His-Moleküls die EZD 4 und/oder 5 eine bedeutende Rolle spielen. Dafür spricht

die prinzipielle Fähigkeit des N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His-Moleküles dimerisieren zu können, wie Westernblot-Analysen gezeigt haben (siehe Abb. 46).

In der vorliegenden Arbeit konnte die von Doherty und Walsh postulierte wachstumsfördernde Wirkung von FGF-2, L1, N-Cadherin und NCAM auf Axone cerebellärer Körnerzellen bestätigt werden. Weiterhin konnte der inhibierende Effekt der Peptide HAV und IDPVNGQ und die fehlende inhibierende Wirkung der entsprechenden Nonsense-Peptide auf das Axonwachstum gezeigt werden. Die erzielten Ergebnisse lassen daher vermuten, dass die strukturelle Ähnlichkeit der N-Cadherin-spezifischen Peptide IDPVNGQ und INSPISG an die FGFR-1-spezifische HAV Sequenz von FGFR-1 binden. Die heterophile cis-Bindung zwischen dem FGFR-1 und N-Cadherin-cis/trans-Oligomer könnte eine Dimerisierung von zwei FGFR-1-Molekülen induzieren, die schließlich eine Signaltransduktion initiiert, die in einem gerichteten Axonwachstum des Neurons resultiert.

9.3. Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von GFP-N-Cadherin und DsRed FGFR-1 in CHO-Zellen

CHO-Zellen, die mit pEGFP-N3-N-Cadherin transfiziert wurden, zeigten 24 h später ein deutlich plasmalemmales Fluoreszenzsignal, das sich aufgrund von Transinteraktionen hauptsächlich auf Zell-Zell-Verbindungen beschränkte. Hingegen wurde in pDsRed-C1-FGFR-1 transfizierten CHO-Zellen ein über das gesamte Zytoplasma der Zelle unter Aussparung des Zellkerns verteiltes Fluoreszenzsignal detektiert. In pEGFP-N3-N-Cadherin und pDsRed-C1-FGFR-1 doppeltransfizierten Zellen zeigte sich eine von DsRed-C1-FGFR-1 abhängige subzelluläre Lokalisation von EGFP-N3-N-Cadherin. So wurde für EGFP-N3-N-Cadherin keine Lokalisation an Zell-Zell-Kontakten beobachtet. Vielmehr lokalisierte EGFP-N3-N-Cadherin wie DsRed-C1-FGFR-1 ausschließlich im Zytoplasma. Diese von DsRed-C1-FGFR-1 abhängige Relokalisierung von EGFP-N3-N-Cadherin deutet auf eine mögliche Interaktion dieser Proteine hin (siehe Abb. 57).

9.4. Bindungsstudien

Bindungsstudien mit Hilfe exprimierter Proteine haben gegenüber komplexen zellbiologischen Studien den Vorteil, dass Interaktionen zwischen Proteinen unter definierten Bedingungen stattfinden. So können Fremdeinflüsse ausgeschlossen werden. Durch die Wahl die Fc-Domäne des humanen IgG für die Affinitätschromatographie der Fusionsproteine zu benutzen, traten bei den Bindungsstudien wider Erwarten unspezifische Fc-Fc-

Wechselwirkungen auf. Somit war es wichtig Bedingungen zu finden, in dem solche unspezifischen Wechselwirkungen minimiert werden konnten.

9.4.1. Bindungsstudien durch Pull-down-Experimente

Pull-down-Versuche erfolgten mit unterschiedlichen Mikroperlen, auf denen die zu untersuchenden Proteine immobilisiert vorlagen. Der mobile Interaktionspartner befand sich in Lösung und sollte vom immobilen, an Mikroperlen gebundenen Bindungspartner aus der Lösung gebunden werden. Dies wurde mit Hilfe einer daran anschließenden Westernblot-Analyse überprüft.

9.4.1.1. Einsatz von Protein-A-Perlen

Die Westernblot-Analyse mit anti-FGFR-1 zeigte bei allen zu untersuchenden DMP-kovalent immobilisierten Proteinen (L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His insbesondere Fc) in Gegenwart des mobilen Liganden FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His einen positiven Pull-down (siehe Abb. 58). Auch biotinyliertes FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His führte unter ähnlichen Versuchsbedingungen zu einem Pull-down der oben genannten Fusionsproteine.

Da der Pull-down bei Fc-beschichteten Mikroperlen für FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His positiv war, konnte nicht zwischen unspezifischen Fc-Fc-Wechselwirkungen (d.h. Wechselwirkungen zwischen Fc-Mikroperle und dem Fc von FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His) bzw. Wechselwirkungen zwischen nicht besetzten Protein-A-Bindungsstellen und angebotenen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His unterschieden werden. Durch die Mikroperlen verursachte unspezifische Wechselwirkungen mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His konnte durch negative Pull-down Experimente in Gegenwart BSA_{bio} (statt FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His) ausgeschlossen werden (siehe Abb. 59). Daher wurden daran anschließende Pull-down-Experimente mit Mikroperlen durchgeführt, die kein gebundenes Protein-A enthielten.

9.4.1.2. Einsatz von Epoxyagaroseperlen und CNBr-aktivierten Sepharoseperlen

Epoxyagaroseperlen und CNBr-aktivierten Sepharoseperlen besitzen im Gegensatz zu den Protein-A-beschichteten Mikroperlen den Vorteil, dass sie unabhängig von Protein-A die zu untersuchenden Fusionsproteine kovalent immobilisieren.

Ähnlich wie unter Punkt 9.4.1.1. beobachtet, wurde in der Westernblot-Analyse für N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His- und Fc-beschichtete Mikroperlen ein positiver Pull-down mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} detektiert. Leider waren auch Pull-down-Experimente mit Ethanolamin-beschichteten Mikroperlen für FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} positiv, so dass diese

Mikroperlen für die geplanten Bindungsassays nicht geeignet waren (siehe Abb. 60). Daran änderten auch keine abgewandelten Bedingungen des Pull-downs (waschen der Mikroperlen mit Sucrose, HBSS bzw. HBSS-Tween). Zusammenfassend waren Pull-down-Experimente mit Hilfe von Mikroperlen nicht geeignet Bindungsstudien durchzuführen.

9.4.2. Bindungsstudien durch Dot-blot Experimente

Dot-Blot-Experimente wurden als eine weitere Möglichkeit für Protein-Protein-Bindungsstudien gewählt, da sich die Pull-down-Experimente als nicht geeignet erwiesen, um unspezifische Fc-Fc-Wechselwirkungen zu vermeiden.

Mit Hilfe eines Vakuum-Blots wurden auf eine Nitrozellulose die Fusionsproteine L1-EZD^{I-VI}-Fc-His, N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His immobilisiert. Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 %iger Magermilch-PBS-Lösung wurde die Nitrozellulose mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His überschichtet. Unter Verwendung des Antikörpers anti-FGFR-1 zeigten sowohl die oben aufgeführten Proteine als auch die Negativkontrolle Fc in der Blot-Analyse jeweils ein Signal. Der Verdacht auf eine unspezifische Fc-Fc-Wechselwirkung zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His und den immobilisierten Liganden bestätigte sich, da immobilisiertes BSA wie bereits in den Pull-down-Experimenten unter diesen Bedingungen kein Signal zeigte (siehe Abb. 59, 62). Basierend auf diesen Beobachtungen wurden in darauffolgenden Blot-Analysen in 5 %iger Magermilch-PBS-Lösung bzw. 5 %iger Magermilch-HBSS-Lösung mobiles biotinyliertes FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His eingesetzt. Unter Magermilch-HBSS-Bedingungen wurden wieder auf Fc-Fc-beruhende Wechselwirkungen zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und den immobilisierten Liganden detektiert (siehe Abb. 63). Unter Magermilch-PBS-Bedingungen gelang es jedoch unspezifische Fc-Fc-Wechselwirkungen zu vermeiden (siehe Abb. 64), so dass es nun möglich war, Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und den Zelladhäsionsproteinen durchzuführen. So konnte eine signifikante Wechselwirkung zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio}, N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und erwartungsgemäß zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und den Zelladhäsionsproteinen L1-EZD^{I-VI}-Fc-His und NCAM-EZD^{I-V}-Fc-His nachgewiesen werden (siehe Abb. 64). Das Ergebnis dieser Dot-Blot-Analyse zeigt zum ersten Mal eine direkte Bindung zwischen FGFR-1 und N-Cadherin (siehe Abb. 17).

Die Beteiligung der Bindungsmotive HAV und IDPVNGQ an dieser Wechselwirkung wurde mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten überprüft (siehe 8.5.2.2.4). Hierzu wurden Dot-Blot-Analysen in Gegenwart der für FGFR-1 und N-Cadherin spezifischen Peptide HAV und

IDPVNGQ durchgeführt. Das HAV-Peptid wurde vor Immobilisierung mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His, während das IDPVNGQ-Peptid mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} präinkubiert.

Trotz der potentiell inhibierenden Peptide konnte in beiden Fällen die Wechselwirkung nicht verhindert werden (siehe Abb. 65). Eine parallel dazu durchgeführter Ansatz mit immobilisiertem Fc zeigte erwartungsgemäß keinerlei Interaktion mit FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio}. Eine unspezifische Fc-Fc-Wechselwirkung konnte wie zuvor gezeigt ausgeschlossen werden. Zusätzlich zu den Konkurrenzexperimenten wurden Dot-Blot-Analysen mit der Substitutionsmutante FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und der Deletionsmutante N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His durchgeführt.

Überraschenderweise konnte im Bindungsassay sowohl zwischen FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His als auch zwischen FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His eine Wechselwirkung beobachtet werden (siehe Abb. 66). Die Spezifität dieser Wechselwirkung wurde dadurch gezeigt, dass die Negativkontrolle Fc keine Bindung mit FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} einging. Diese Beobachtungen waren insofern überraschend, da entsprechend des hypothetischen Modells inhibierende Effekte des Sense-Peptids bzw. der Deletions-/Substitutions-Mutanten auf die FGFR-1-N-Cadherin-Wechselwirkung erwartet worden waren (siehe Abb. 17). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das FGFR-1-Bindungsmotiv (HAV) zwischen der 1. und 2. immunglobulin-ähnlichen Domäne von FGFR-1 und das N-Cadherin-Bindungsmotiv (IDPVNGQ) in der 4. EZD für die FGFR-1-N-Cadherin-Wechselwirkung keine Rolle spielen. Damit lässt sich auch die im Peptid-Kompetitionsversuch fehlende Inhibierung der Wechselwirkung zwischen FGFR-1 und N-Cadherin trotz potentiell inhibierender Peptide bestätigen. Welche Motive für die heterophile cis-Bindung von FGFR-1 an die EZD von N-Cadherin, L1 und NCAM beteiligt sind, ist Ziel zukünftiger Untersuchungen.

9.4.3. Bindungsstudien mit Hilfe von ELISA

Zur weiteren Untersuchung, insbesondere Quantifizierung der Protein-Protein-Wechselwirkung wurden zusätzlich Bindungsstudien mit Hilfe eines ELISAs durchgeführt. Zur Etablierung des Systems wurden zunächst ELISA-Platten wie unter 6.3.15. beschrieben mit je 0,5 µg Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His, Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His, Fc und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His pro Well beschichtet. Nach Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen mit BSA erfolgte daran anschließend die Zugabe des mobilen Liganden FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} in ansteigender Konzentration (0,125 - 6 µg).

Wie in den vorangegangenen Bindungsstudien wurden auch hier unspezifische Fc-Fc-Wechselwirkungen zwischen den Fc-Fusionsproteinen beobachtet. Daher wurden bei darauffolgenden ELISAs zwischen immobilisiertem Fc und FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} gemessene Absorptionsveränderungen als Korrekturwerte eingesetzt. Zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und den immobilen Liganden Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His, Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His, Fc und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His gemessene Absorptionsänderungen konnten somit durch diesen Fc-Wert korrigiert werden (siehe Abb. 69 und 70).

Initiale ELISAs zeigten eine stärkere Wechselwirkung zwischen FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His gegenüber FGFR-1-EZD^{I-III}-Fc-His_{bio} und den Desmoglein-Fusionsproteinen. Dabei betrug die apparente Dissoziationskonstante (K_D = Konzentration des mobilen Liganden um halbmaximale Bindung an immobilen Liganden zu erreichen) für N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His 0,02 μ M, für Desmoglein-3-EZD^{I-V}-Fc-His 0,04 μ M und für Desmoglein-1-EZD^{I-V}-Fc-His 0,07 μ M (siehe Abb. 70).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wie bereits in den Dot-Blot-Analysen gezeigt eine Bindung zwischen den EZD von N-Cadherin und FGFR-1 bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde eine Wechselwirkung zwischen der EZD der Desmosomen-spezifischen Zelladhäsionsproteine Desmoglein-1 und -3 und der EZD des FGFR-1 beobachtet.

Mit Hilfe des ELISAs können nun zukünftige Versuche den Einfluss spezifischer Mutationen in den Bindungsmotiven auf das Bindungsverhalten von FGFR-1 und N-Cadherin quantitativ untersuchen.

9.5. Bindungsstudien mit Hilfe der Laserpinzette

Die Laserpinzette erlaubt Bindungsstudien durchzuführen, die auf Wechselwirkungen zwischen auf Mikroperlen gebundenen Proteinen und zellulären Membranproteinen beruhen. Im vorliegenden Fall wurden PC12-Zellen verwendet, von denen in der Vergangenheit gezeigt worden ist, dass sie sowohl N-Cadherin als auch den FGFR-1 exprimieren (Hayashi et al., 2001 und Bayarsaikhan et al., 2007). Als Maß einer Wechselwirkung im Laserpinzettenexperiment diente die Immobilisierung von N-Cadherin-beschichteten Mikroperlen auf der Oberfläche von PC12-Zellen im fokussierten Laserstrahl. Inwieweit die Immobilisierung auf eine Bindung zwischen N-Cadherin und PC12-spezifischem FGFR-1 beruhte, sollte durch Zugabe potentiell inhibierender FGFR-1-Peptide überprüft werden. Wie in Dot-Blot-Experimenten zuvor beobachtet, konnte in ersten Versuchen gezeigt werden, dass sowohl N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His- als auch N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His-beschichtete Mikroperlen gegenüber der Negativkontrolle (Fc-beschichtete Mikroperlen) in der Lage sind

auf PC12-Zellen zu haften. Dabei zeigten mit N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichtete Mikroperlen eine um mehr als 10% höhere Haftung als solche, die mit N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His beschichtet worden waren (siehe Abb. 67). Zur Untersuchung N-Cadherin-FGFR-1-spezifischer Wechselwirkung wurden N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichtete Mikroperlen mit dem FGFR-1-HAV-Peptid präinkubiert. Trotz Gegenwart dieses Peptids konnte keine signifikante Reduzierung der Mikroperlen-Immobilisierung festgestellt werden. So hafteten N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichtete Mikroperlen ohne Peptidzusatz in einer vergleichbaren Stärke (83±2%) wie Perlen mit Peptidzusatz (79±2% bzw. 84±1%). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichtete Mikroperlen (83±2%) mit dem N-Cadherin-IDPVNGQ-Peptid (85±2%) bzw. dem entsprechenden Nonsense-Peptid (84±2%) präinkubiert wurden. Basierend auf diesen Beobachtungen kann gesagt werden, dass für eine Wechselwirkung von N-Cadherin mit PC12-Zellen die EZD IV-V entbehrlich sind. Die fehlende Wirkung des FGFR-1-HAV-Peptid steht in Einklang mit den Ergebnissen der Dot-Blot-Analyse, die eine Wechselwirkung zwischen FGFR-1_(mut)-EZD^{I-III}-Fc-His und den Proteinen N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His gezeigt hatten (siehe Abb. 66). Auf welcher Basis die beobachtete Immobilisierung N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His- und N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His-beschichteter Mikroperlen auf PC12-Zellen beruht (z.B. aufgrund homophiler N-Cadherin-N-Cadherin oder heterophiler N-Cadherin-FGFR-1-Wechselwirkungen) kann mit Hilfe des Laserpinzettenexperiments nicht untersucht werden. Hierzu wären Laserpinzettenexperimente mit isogenen FGFR-1-positiven und FGFR-1-negativen Zellen notwendig.

9.6. Vergleich zwischen Protein-Protein-Bindungsstudien und Untersuchungen zum Axonwachstum cerebellärer Körnerzellen

Obwohl kein direkter Nachweis für die Bindung zwischen CAM und FGFR bisher gezeigt werden konnte (Groth et al., 2002), wird basierend auf folgenden Versuche angenommen, dass CAMs Einfluß auf das zielgerichtete Axonwachstum durch FGFR-Aktivierung nehmen:

- Antikörper gegen FGFR inhibieren das durch N-Cadherin, NCAM und L1 verursachte Axonwachstum von cerebellären Körnerzellen, PC12-Zellen (Williams et al., 1994) und Retinalen Ganglionzellen (Brittis et al., 1996).
- Die Expression des dominant-negativen FGFR verhindert eine Reaktion von CAM auf das Axonwachstum von PC12-Zellen und primären Neuronen (Saffell et al., 1997).

- Inhibierung des FGFR durch PD 17304, einem hoch spezifischen FGFR Antagonisten, verursacht keine Stimulation des Axonwachstums weder durch N-Cadherin noch durch FGF oder wachstumsstimulierende Peptide (Williams et al., 2001).

- Inhibierung der PLC γ -Kaskade verhindert das durch CAM und FGF stimulierte Neuritenwachstum. Dies führte zu der Annahme, dass sowohl FGF als auch CAM über die PLC γ -Signalkaskade Einfluss auf das Neuritenwachstum nehmen (Doherty et Walsh, 1996).

Die aus den oben genannten Versuchen abgeleiteten Erkenntnisse, dass gewisse Proteine/Peptide, Rezeptorantagonisten oder inhibierende Antikörper neuronales Axonwachstum beeinflussen, erlauben keine Rückschlüsse auf mögliche direkte Interaktionen zwischen N-Cadherin und FGFR.

Daher wurden neben solch komplexen zellbiologischen Ansätzen erstmals Protein-Protein-Bindungsstudien mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse und des ELISAs durchgeführt. Somit war es möglich Protein-Protein-Wechselwirkungen unter definierten Bedingungen zu untersuchen.

Entsprechend dem hypothetischen Modell, über die Rolle von N-Cadherin bei der Aktivierung des FGFR (siehe Abb. 17), findet eine heterophile Bindung zwischen der EZD von N-Cadherin und FGFR-1 statt.

Erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Beziehung zwischen beiden Molekülen, zeigten inhibierende Effekte ausgewählter von FGFR und N-Cadherin abgeleiteter Peptide auf das durch N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-induzierte Axonwachstum (siehe Abb. 56).

Ähnliche Erkenntnisse konnten durch subzelluläre Lokalisationsstudien entsprechender GFP- und dsRed-Fusionsproteine in CHO-Zellen gewonnen werden (siehe Abb. 57). Eine direkte Wechselwirkung zwischen N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-EZD^{I-III}-Fc-His wurde allerdings erst durch Dot-Blot-Experimente (siehe Abb. 64) und ELISA-Studien (siehe Abb. 70) dargestellt.

Bei näherer Untersuchung der Bindungsmotive widersprachen die Ergebnisse der zellbiologischen Bindungsstudien den Protein-Protein-Bindungsstudien.

So konnten potentiell inhibierende Peptide wie das FGFR-spezifische Peptid HAV und das N-Cadherin-spezifische Peptid IDPVNGQ in Gegenwart von N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His die Förderung des Axonwachstums verhindern (siehe Abb. 56). Dagegen konnte eine Bindung zwischen N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His und FGFR-EZD^{I-III}-Fc-His durch Zugabe dieser Peptide in der Dot-Blot-Analyse nicht verhindert werden (siehe Abb. 65). Ähnliche Ergebnisse wurden in Dot-Blot-Experimenten in Gegenwart der N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His und FGFR-EZD^{I-III}-1_(mut)-Fc-His Fusionsproteine erzielt (siehe Abb. 66). Da den Fusionsproteinen die postulierten Bindungsmotive, wie das CHD-Bindungsmotiv IDPVNGQ und die CHD HAV,

fehlte, muss daraus geschlossen werden, dass eine Bindung zwischen N-Cadherin und FGFR-1 unabhängig von diesen erfolgt.

Gemäß früherer Untersuchungen erfolgt eine Wechselwirkung zwischen Cadherinen über die EZD 1. Um so überraschender war es, dass im Gegensatz zu N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His die Zugabe von N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His zu cerebellären Körnerzellen kein signifikantes Axonlängenwachstum hervorrief (siehe Abb. 56). In Laserpinzettenexperimenten konnte allerdings bei PC12-Zellen eine Haftung N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His-beschichteter Mikroperlen beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Mikroperlen erzielt, die N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichtet worden waren. So lag die Haftung N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His- und N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichteter Mikroperlen bei 71 ± 2 % bzw. 83 ± 2 % (siehe Abb. 67).

Darüber hinaus konnten wir in der Dot-Blot Analyse (Abb. 66) eine Bindung von N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His sowohl an FGFR-EZD^{I-III}-1-Fc-His als auch FGFR-EZD^{I-III}-1_(mut)-Fc-His feststellen. Aufgrund der fehlenden Wirkung von N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His auf das Axonwachstum cerebellärer Körnerzellen, kann vermutet werden, dass die EZD 4 und 5 für eine physiologisch aktive Struktur des N-Cadherin-Moleküls notwendig sind. Andererseits wäre es auch vorstellbar, dass die EZD 1-3 von N-Cadherin eine unphysiologische Konformation mit FGFR-1-bindenden Eigenschaften eingeht.

Mit Hilfe der Laserpinzette konnten neben N-Cadherin-EZD^{I-V}-Fc-His-beschichteten Mikroperlen auch Bindungen von Mikroperlen, die mit N-Cadherin-EZD^{I-III}-Fc-His beschichtet worden waren, auf PC12-Zellen nachgewiesen werden. Die Haftung solcher Mikroperlen konnten in beiden Fällen durch Calcium-Zugabe signifikant reduziert werden. Zur Untersuchung von Wechselwirkungen, die zwischen den N-Cadherin-Fusionsproteinen und in PC12-Zellen gebildetes FGFR1 bzw. N-Cadherin stattfinden, wurden wie in vorangegangenen Versuchen die potentiell inhibierendem N-Cadherin/FGFR1-spezifischen HAV- bzw. IDPVNGQ-Peptide verwendet (siehe Abb. 67). In allen Fällen, d.h. Präinkubationen der N-Cadherin-Moleküle in Gegenwart der Peptide, konnte keine bedeutende Reduzierung der Haftung der Mikroperlen auf PC12-Zellen beobachtet werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass die Bindungsmotive HAV und INSPISG keine für N-Cadherin bzw. FGFR1 bedeutsame bindenden Eigenschaften haben (siehe Abb. 17).

Kamiguchi, Tamura (2000) und Plotnikov (1999) berücksichtigen nicht wie Doherty und Walsh (1996) die Primär-, sondern auch die Tertiärstruktur des Proteins. Bändermodelle von Kamiguchi und Lemmon (2000) zeigen die HAV-Sequenz der CHD in N-Cadherin und FGFR-1 (siehe Abb. 18). So ragen in der EZD^I von N-Cadherin Histidin und Valin aus dem

Molekül heraus (Tamura et al., 1998) und stehen daher als potentieller Bindungspartner zur Verfügung. Im Gegensatz dazu zeigen zwischen der ersten und zweiten Ig-ähnlichen Domäne des FGFR-1 die Aminosäuren Histidin und Valin in das Molekül hinein (Plotnikov et al., 1999, Kamiguchi et al., 2000). Basierend auf diesen Bändermodellen können die Aminosäuren Histidin und Valin des HAV-Motives zwar für eine homophile Bindung zwischen N-Cadherin-Molekülen fungieren, nicht aber für eine heterophile Bindung zwischen FGFR-1 und andere potentiellen Bindungspartnern, wie N-Cadherin.

10. Ausblick

Bisher konnte kein direkter Nachweis für die Bindung zwischen CAM wie N-Cadherin und dem FGFR-1 gezeigt werden (Groth et al., 2002). Daher wurden in dieser Arbeit Bindungsuntersuchungen zwischen den EZD von N-Cadherin und FGFR-1 untersucht. In Dot-Blot-Analysen und ELISAs wurde eine Wechselwirkung zwischen beiden Molekülen nachgewiesen, wobei diese unabhängig von N-Cadherin-EZD IV und V stattfindet. Voneinander abhängige subzelluläre Lokalisationen von N-Cadherin-GFP und FGFR-1-DsRed in CHO-Zellen deuten ebenfalls auf eine mögliche Wechselwirkung der beiden Moleküle hin. Ferner konnte in Konkurrenzexperimenten eine mögliche Wechselwirkung zwischen der EZD^{I-V} von N-Cadherin und EZD^{I-III} von FGFR-1 über die Bindungsmotive IDPVNGQ und HAV ausgeschlossen werden. Ähnliche Schlußfolgerungen sind für N-Cadherin-Wechselwirkungen in trans möglich, da bei Laserpinzettenexperimenten N-Cadherin-EZD^{I-V}-beschichtete Mikroperlen trotz Gegenwart der IDPVNGQ- und HAV-Peptide an PC12 binden konnten. Basierend auf diesen Beobachtungen muss davon ausgegangen werden, dass für beide Proteine bisher nicht identifizierte Bindungsmotive für die Wechselwirkung verantwortlich sind. Solche Bindungsmotive müssen in zukünftigen Versuchen durch die Generierung neuer Deletions-/Substitutions-Mutanten identifiziert werden. Diese würden schließlich in Dot-Blot- und Laserpinzetten-Experimenten überprüft werden. Von solchermaßen identifizierte Bindungsmotiven könnten Peptide abgeleitet werden, die Anwendung in verschiedensten Konkurrenzexperimenten finden würden. So beispielsweise in Dot-Blot- und Laserpinzetten-Experimenten. Durch die Etablierung des ELISAs wäre es darüber hinaus möglich in Gegenwart/Abwesenheit solcher Peptide Wechselwirkung zwischen FGFR1 und N-Cadherin zu quantifizieren. FRET-Versuche mit N-Cadherin und FGFR-1 könnten letztendlich dazu beitragen, die physiologische Relevanz der in vitro nachgewiesenen Wechselwirkungen darzulegen.

11. Literaturverzeichnis

- Angst B, Marcozzi C, Magee A (2001)** The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of Cell Science* 114; 629-641
- Bateman A, Jouet M, MacFarlane J, Du JS, Qeo G, Hicks R, Rathjen FG, Kenwrick S, Brummendorf T (1999)** Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect homophilic and heterophilic binding activities. *EMBO J* 1999; 18: 4744-4753
- Bayarsaikhan M, Taino T, Gantulaga D, Sato H, Ito T, Yoshioka K (2007)** Regulation of N-cadherin-based cell-cell interaction by JSAP1 scaffold in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 353 (2) : 357-62
- Benninghoff A, Drenckhahn D (2003)** Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1 Vol. 16. Edited by Drenckhahn D: Urban & Fischer Verlag
- Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L, Huntley GW (2000)** Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.* 10; 473-482
- Bentley D, O'Connor (1994)** Cytoskeletal events in growth cone steering. *Curr. Opin Neurobiol* 4; 43-48
- Bixby JL, Zhang R (1990)** Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J. Cell Biol* 110; 1253-1260
- Boggon TJ, Murray J, Chappuis-Flament S, Wong E, Gumbiner M, Shapiro L (2002)** C-cadherin ectodomain structure implications for cell adhesion mechanisms. *Science* 296; 1308-1313
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72; 248-254
- Brieher WM, Yap AS, Gumbiner BM (1996)** Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin *J. Cell Biol.* 135; 487-496
- Brittis PA, Silver J, Walsh FS, Doherty P (1996)** FGF Receptor function is required for the orderly projection of ganglion cell axons in the developing mammalian retina. *Mol. Cell Neurosci.* 8; 120-28
- Brummendorf T, Rathjen G (1995)** Cell adhesion molecules 1: Immunoglobulin superfamily. *Protein profile* 2; 963-1058
- Burden-Gulley S, Brady-Kalnay S (1999)** PTP μ regulates N-Cadherin-dependent neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 144; 1323-1336

Carafoli E, Genazzani A, Guerini D (1999) Calcium controls the transcription of its own transporters and channels in developing neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266; 624-632

Chappuis-Flament S, Wong E, Hicks LD, Cyril MK, Gumbiner BM (2001) Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *Journal of Cell Biology* 154; 231-243

Chellaiah AT McEwen DG, Werner S, Xu J, Ornitz DM (1994) Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3: Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *J. Biol. Chem.* 269 (15); 11620-11627

Damon DH, Lobb RR, D'Amore PA, Wagner JA (1989) Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half-life. *Journal of Cellular Physiology* 138; 221-226

Derycke L, Bracke M (2004) N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.* 48 ; 463-476

Dhalluin C, Yan KS, Plotnikova O, Lee KW, Zeng L, Kuti M, Mujtaba S, Goldfarb MP Zhou, M.-M. (2000) Structural basis of SNT PBT domain interactions with distinct neurotrophic receptors. *Cell* 6; 921-929

Dickson C, Smith R, Brooks S, Peters G (1984) Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: proviral activation of a cellular gene in the common integration region int-2. *Cell* 37; 529-536

Dimitropoulou A, Bixby JL (2000) Regulation of retinal neurite growth by alterations in MAPK/Erk kinase (MEK) activity. *Brain. Res.* 858; 205-214

Doherty P, Cohen J, Walsh FS (1990) Neurite outgrowth in response to transfected NCAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* 5; 209-219

Doherty P, Fruns M, Seaton P, Dickson G, Barton CH, Sears TA, Walsh FS (1990) A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 343; 464-466

Doherty P, Skaper S, Moore SE, Leon A, Walsh FS (1992) A developmentally regulated switch in neuronal responsiveness to NCAM and N-cadherin in the rat hippocampus. *Development* 115; 885-892

Doherty P, Walsh, FS (1996) CAM FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol. Cell. Neurosci.* 8; 99-111

Doherty P, Walsh FS (1996) Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4; 49-55

Dunican D, Doherty P (2000) The generation of localized calcium rises mediated in neuronal growth cone motility. *Molecular cell biology research communications* 2; 255-263

Eckenstein FP, Andersson C, Kuzis K, Woodward WR (1994) Distribution of acidic and basic fibroblast growth factors in the mature, injured and developing rat nervous system. *Progr. Brain Res.* 103; 55-64

Fannon AM, Colman DR (1996). A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of cadherins. *Neuron* 17; 423-434

Fields RD, Itoh K (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 19; 473-470.

Folkman J (1985) Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Rec.* 43; 175-203.

Forman-Kay JD Pawson T (1999) Diversity in protein recognition by PTB domains. *Curr. Opin. Struc. Biol.,* 9; 690-695

Friesel R, Maciag T (1995) Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB Journal* 9; 919-925

Goodman CS (1996) Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 19; 341-377

Gospodarowicz D, Cheng J, (1986) Heparin protects basic and acid FGF from inactivation *Journal of Cellular Physiology* 128; 475-484

Gordon-Weeks PR (2004) Microtubules and Growth Cone Function. *J. Neurobiol* 58; 70-83

Green PJ, Walsh FS, Doherty P (1996) Promiscuity of fibroblast growth factor receptors. *BioEssays* 18; 639-646

Groth C, Lardelli M (2002) The structure and function of vertebrate Fibroblast Growth Factor Receptor 1. *J. Dev. Biol.* 46; 393-400

Gumbiner BM (1993) Proteins associated with the cytoplasmic surface of adhesion molecules. *Neuron* 11; 551-564

Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84; 345-357

Gumbiner BM (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Aug; 6 (8); 622-34

Hall A (1998) The GTPases and the actin cytoskeleton *Science* 279; 509-514

Harrison O, Corps E, Berge T, Kilshaw P (2004) The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1. *Journal of Cell Science* 118; 711-721

Hazan RB, Phillips GR, Qiao R F, Norton L, Aaronson SA (2000) Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.* 148, 779-790

Haussinger D, Ahrens T, Aberle T, Engel J, Stetefeld J Grezesiel S (2004) Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J.* 23, 1699-1708

Hayashi Hisaki, Ishisaki Akira, Suzuki Masashi, Imamura Toru (2001) BMP-2 augments FGF-induced differentiation of PC12 cells through upregulation of FGF receptor-1 expression. *Journal of Cell Science* 114, 1387-1395

Hirans S, Suzuki St, Reies C (2003) The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front. Biosci.* 8; D 306-D355

Huang JM-C, Bacaner M (1992) Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89; 6452-6456

Huot J (2004) Ephrin signaling in axon guidance. *Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 28; 813-818

Hyafil F, Babinet C, Jacob F (1981) Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell* 26; 447-454

Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JAM, HT, Maciag T (1990) Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science* 249; 1567-1570

Johnson DE, Lee PL, Lu J, Williams LT (1990) Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Molecular Cell Biology* 10; 4728-4736

Johnson DE, Williams LT (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60; 1-41

Johnson PH, Grossman LI (1977) Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformational isomers of double- and single-stranded DNAs. *Biochemistry*; 16 ; 4217-25

Kabir N, Schaefer AW, Nakhost A, Sossin WS, Forscher P (2001) Protein kinase C activation promotes microtubule advance in neuronal growth cones by increasing average microtubule growth lifetimes. *J Cell Biol* 152; 1033-1044

Kamiguchi H, Lemmon V (2000) IgCAMs: bidirectional signals underlying neurite growth. *Cell Biology* 12; 598-605

Kan M, Wang F, Kan M, To B, Gabriel JL, Mc Keehan WL (1996) Divalent cations and heparin/heparin sulfate cooperate to control assembly and activity of the fibroblast growth factor receptor complex. *Journal of Biological Chemistry* 271; 26143-26148

Kemler R (1992) Classical cadherins. *Sem. Cell Biol* 3; 149-155

Kiryushko D, Vladimir B, Elisabeth B (2004) Regulators of neurite outgrowth Role of cell adhesion molecules. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1014; 140-154

Klagsbrun M, Baird A (1991) A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 67; 229-231

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

Kouhara H, Hadary YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J (1997) A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* 89 (5); 693-702

Kyhse-Andersen J (1984) Electrophotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem Biophys Methods.* 10(3-4); 203-9

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227; 680-685

Lau PM, Zucker RX, Bentley D (1999) Induction of filopodia by direct local elevation of intracellular calcium ion concentration. *J. Cell Bio.* 145; 1265-1275

Laur O, Klingelhofer J, Troyanovsky R, Troyanovsky S (2002) Both the dimerization and immunochemical properties of E-cadherin EC1 domain depend on Trp(156) residue. *Arch. Biochem. Biophys.* 400; 141-147

Lemmon MA, Schlessinger J (1994) Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends in Biochemical Science* 19; 459-463

Lin CH, Forscher P (1993) Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *J. Cell Biol.* 121; 1369-1383

Mason I (1994) Do adhesion molecules signal via FGF receptors? *Curr. Biol.* 4; 1158-1161

Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A, Takeichi M (1988) Guidance of optic nerve fibers by N-cadherin adhesion molecules. *Nature* 334; 62-64

McKeehan WL, Wang F, Kan M (1998) The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59; 135-176

Miki T, Bottaro DB, Fleming TP, Smith CL, Burgess WH, Chan AM, Aaronson SA (1992) Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing : two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 (1); 246-250

Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J (1996) Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Molecular and Cellular Biology* 16; 977-989

Mohammadi M, Honegger AM, Rotin D, Fischer R, Bellot F, Li W, Dionne CA, Jaye M, Rubinstein M, Schlessinger J (1991) A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol. Cell. Biol.* 11; 5068-5078

Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR (1996) Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell* 86: 577-587

Moscatelli D (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 131; 123-130

Nieman MT, Prudoff R S, Johnson KR, Wheelock MJ (1999) N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J. Cell Biol.* 147, 631-644

Nose A, Tsuji K, Takeichi M (1990) Localization of specificity-determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 61; 147-155

Obst-Pernberg K, Redies C (1991); Cadherins and synaptic specificity. *Journal of Neuroscience Research* 58; 130-138

Overduin M, Tong K, Kay C, Ikura M (1996) ¹H, ¹⁵N and ¹³C resonance assignments and monomeric structure of the N-terminal extracellular domain of epithelial cadherin. *J. Biomol. NMR* 7, 173-189

Ozawa M (2002) Lateral dimerization of the E-cadherin extracellular domain is necessary but not sufficient for adhesive activity *J. Biol. Chem.* 277; 19600-19608

Pantoliano MW, Horlick RA, Springer BA, Van Dyk DE, Tobery T, Wetmore DR, Lear JD, Nahapetian AT, Bradley JD, Sisk WPs (1994) Multivalent ligand-receptor binding interactions in the fibroblast growth factor system produce a cooperative growth factor and heparin mechanism for receptor dimerisation. *Biochemistry* 33; 10229-10248

Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertie AL, Alonso LG, Kitoh H (1999) Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum. Mutat.* 14; 115-125

Perron JC, Bixby JL (1999) Distinct neurite outgrowth signaling pathways converge on ERK activation. *Mol. Cell. Neurosci.* 13; 362-378

Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR., Mohammadi M. (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell* 1999, 98; 641-650

Pokutta S, Herrenknecht K, Kemler R, Engel J (1994) Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *Eur. J. Biochem* 223; 1019-1026

Powers McLeskey Wellstein (2000) Fibroblast growth factors, their receptors and signalling. *Endocrine-Related Cancer* 7; 165-197

Raffioni S, Thomas D, Fowhr ED, Thompson LM, Bradshaw RA (1999) Comparison of the intracellular signalling responses by three chimeric fibroblast growth factor receptors in PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci* 96; 7178-7183

Redies C, Takeichi M (1993) N- and R- cadherin expression in the optic nerve of the chicken embryo. *Glia* 8; 161-171

Reuss B, von Bohlen und Halbach O (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313; 139-157

Saffell JL, Walsh FS, 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

Saffell JL, Williams EJ, Mason IJ, Walsh FS, Doherty P (1997) Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18; 231-42

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis LB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia *Biotechnology* Vol 24; 476-80

Sanes JR, Yamagata M (1999) Formation of lamina-specific synaptic connections. *Curr. Opin. Neurobil.* 9, 79-87

Schlessinger J, Plotnikov AN, Ibrahimi OA, Eliseenkova AV, Yeh BK, Yayon A, Linhardt RJ, Mohammadi M (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR- heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell* 3; 743-750

Schmid RF, Pruitt WM, Maness PF (2000) An MAP kinase-signaling pathway mediates neurite outgrowth on L1 and requires src-dependent endocytosis. *J. Neurosci.* 20: 4177-4188

Shan WS, Koch A, Murray J, Colman DR, Shapiro L (1999) The adhesive binding site of cadherins revisited. *Biophys. Chem.* 82; 157-163

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Fielsen J, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 374; 327-337

Shapiro L, Kwong PD, Fannon AM, Colman DR, Hendrickson WA (1995) Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. *Proc. Natl. Aca. Sci.* 92, 6793-6797

Sivasankar S, Gumbiner B, Lecknad D (2001) Direct measurements of multiple adhesive alignments and unbinding trajectories between cadherin extracellular domains. *Biophys J.* 80; 1758-68

Skaper S, Moore S, Walsh S. (2001) Cell signalling cascades regulating neuronal growth-promoting and inhibitory cues. *Progress in Neurobiology* 65; 593-608

Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I (1994) Heparin-induced oligomerisation of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerisation, activation and cell proliferation. *Cell* 79, 1015-1024

Stauber DJ, DiGabriele A, Hendrickson W (2000) Structural interactions of fibroblast growth factor receptor with its ligands. *PNAS* 97; 49-54

Sternberg PW, Alberola-Ila J (1998) Conspiracy theory: RAS and RAF do not act alone. *Cell* 95 (4); 447-450

Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridisation probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci* 78(11); 6613-6617

Takeichi M (1990) Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem* 59; 237-252

Takeichi M (1991) Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251; 1451-1455

Tamura K, Shan WS, Hendrickson WA, Colman DR, Shapiro L (1998) Structure-function analysis of cell adhesion by neural (N-)cadherin. *Neuron* 20; 1153-1163

Tepass U, Truong K, Godt D, Ikura M, Pfeifer M (2000) Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1; 91-100

Thisse B, Thisse C (2005) Functions and regulations of fibroblast growth factor signaling during embryonic development. *Developmental Biology* 287; 390-402

Tomschy A, Fauser C, Landwehr R, Engel J (1996) Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a cooperative two-step interaction of N-terminal domains. *EMBO J.* 15; 3507-3514

Trolice MP, Pappalardo A, Pelusa JJ (1997) Basic fibroblast growth factor and N-cadherin maintain rat granulosa cell and ovarian surface epithelial cell viability by stimulating the tyrosine phosphorylation of the fibroblast growth factor receptors. *Endocrinology* 138, 107-113

Uchida N, Honjo Y, Johnson KR, Wheelock MJ, Takeichi M (1996) The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol* 135; 767-779

Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S (1996) Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J. Biol. Chem.* 271 (38); 23512-23519

Utton M, Eickholt B, Howell F, Wallis J, Doherty P (2001) Soluble N-cadherin stimulates fibroblast growth factor receptor depend neurite outgrowth and N-cadherin and the fibroblast growth factor receptor co-cluste in cells. *Journal of Neurochemistry* 76; 1421-1430

Valve EM, Nevalainen MT, Nurmi Mj, Laato MK Martinkainen PM, Härkönen PL (2001) Increased expression of FGF-8 isoforms and FGF receptors in human premalignant prostatic intraepithelial neoplasia lesions and prostate cancer. *Lab. Invest.* 81; 815-826

Venkataraman G, Raman R, Sasisekharan V Sasisekharan R (1999) Molecular characteristics of fibroblast growth factor-fibroblast growth factor receptor-heparin-like glycosaminoglycan complex. *PNAS* 96; 3658-3663

Viollet C, Doherty P (1997) CAMs and the FGF receptor: an interacting role in axonal growth. *Cell Tissue Res.* 290; 451-455

Walsh F, Doherty P (1997) Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13; 425-56

Wheelock MJ, Johnson KR (2003) Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 19; 207-235

Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994) Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron* 13; 583-594

Williams EJ, Furness J, Walsh FS, Doherty P (1994) Characterisation of the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by FGF. *Development* 120; 1685-93

Williams EJ, Walsh FS, Doherty P, (1994) The production of arachidonic acid can account for calcium channel activation in the second messenger pathway underlying neurite outgrowth stimulated by NCAM, N-cadherin, and L1. *J. Neurochem.* 62; 1231-1234.

Williams EJ, Williams G, Howell FV, Skaper ST, Walsh FS, Doherty P. (2001) Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth *J. Biol. Chem.* 276 43879-43886

Williams G, Williams EJ, and Doherty P (2002) Dimeric Versions of Two Short N-cadherin Binding Motifs (HAVDI and INPISG) Function as N-cadherin Agonists. *J. of biological chemistry* 277; 4361-4367

Wodarz A, Nusse R (1998) Mechanisms of wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14; 59-88

Zhou F, Cohan C (2003) How actin filaments and microtubules steer growth cones to their targets. *J. Neurobiol* 58; 84-91

12. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua dem.	Aqua demineralisata
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bio	biotinyliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa, ungefähr
Ca ²⁺	Calcium ²⁺ -Ionen
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonuklein acid (Desoxyribonucleinsäure)
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fwd	forward (vorwärts)
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	Hanks-buffered salt solution (Hanks gepufferte Salzlösung)
Ig	Immunglobulin
k	Kilo
K _D	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB	Luria Bertoni-Medium
LM	Lösungsmittel
M	Molar
min	Minute
mod	modifiziert
PBS	phosphate-buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
rb	rabbit (Kaninchen)

rev	revers (rückwärts)
RNA	Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
rpm	rotation pro minute (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
U	units (Enzymeinheit)
μ	mikro
üN	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumen
Vergr.	Vergrößerung
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen der 20 Aminosäuren im Ein- und Drei-Buchstaben-Code:

Abkürzung	Abkürzung	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin erkläre ich, dass die vorgelegte Arbeit noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Volkach, den 27.11.2007

13. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bettina Laymann

Geburtsdatum: Februar 1972

Ausbildung und Beruf

1978-1982	Grundschule in Volkach
1982-1985	Egbert-Gymnasium in Münsterschwarzach
1985-1989	Realschule in Volkach
1989-1991	PTA-Schule in Würzburg
1991-1994	Berufsausübung der PTA
1994-1997	Bayernkolleg zur Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
1997- 2003	Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an höheren Schulen an der Universität Würzburg mit Abschluss des Ersten Staatsexamens
2001	Zulassungsarbeit in der Biologie Thema: Einfluss natürlicher UV-Strahlung auf die Ultrastruktur der Chloroplasten in <i>Hordeum vulgare</i> L. Mutante Ant 287 im Vergleich zur Ultrastruktur der nichtparasitär bedingten Blattverbräunung bei <i>Hordeum vulgare</i> L. cv. Ricarda.
2003-2007	Anfertigen der Promotionsarbeit im Fach Biologie im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg
2007	1. Ausbildungsabschnitt des Referendariats für das Gymnasiallehramt

Volkach, den 27.11.07