

SynCAM1: ein weiteres polysialyliertes
Protein neben NCAM im postnatalen Mäusegehirn

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kaup, Moritz

aus Gelsenkirchen

Gießen 2013

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Schmitz

Gutachter: Prof. Dr. Lochnit

Gutachter: Prof. Dr. Acker

Tag der Disputation: 08.10.2014

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Sialinsäuren	1
1.1.1.	Struktur von Mono -, Di-, Oligo- und PolySia	1
1.1.2.	Vorkommen und Funktionen von PolySia.....	2
1.2.	Das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM.....	5
1.2.1.	Struktur	5
1.2.2.	Vorkommen und Funktionen von NCAM	6
1.2.3.	Eigenschaften und Bindungsverhalten	8
1.3.	Die Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV.....	9
1.3.1.	Struktur	9
1.3.2.	Polysialylierung von NCAM durch ST8SialI / -IV	10
1.3.3.	Einfluss der Polysialyltransferasen auf Medizin und Technik.....	12
1.4.	ST8SialI-, ST8SialIV- und NCAM-defiziente Mäuse	13
1.5.	SynCAM1.....	15
1.5.1.	SynCAM und die Immunglobulinsuperfamilie	15
1.5.2.	Struktur	17
1.5.3.	Vorkommen und Funktionen	17
1.5.4.	Eigenschaften und Bindungsverhalten	19
2.	Zielsetzung	21
3.	Material.....	22
3.1.	Probenmaterial.....	22
3.2.	Antikörper.....	24
3.3.	Enzyme.....	24
3.4.	Geräte.....	24
3.5.	Verbrauchsmaterialien	25
3.6.	Chemikalien	26
4.	Methoden	28
4.1.	Proteinanalytische Methoden	28

4.1.1.	Aufarbeitung der Mäusegehirne	28
4.1.2.	Proteinbestimmung	28
4.1.3.	SDS-Gelelektrophorese	29
4.1.4.	Western Blot	30
4.1.5.	Silberfärbung.....	32
4.1.6.	Immunopräzipitation mittels <i>Magnetic Beads</i>	33
4.2.	Enzymverdau	39
4.2.1.	Abspaltung von PolySia mittels Endoneuraminidase N	39
4.2.2.	Enzymatische Freisetzung von N-Glykanen durch PNGaseF.....	39
4.2.3.	Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel.....	40
4.2.4.	Tryptischer Verdau von gelösten Proteinen.....	42
4.3.	Massenspektrometrie	43
4.3.1.	MALDI-TOF-MS (/MS) Analysen	43
4.3.2.	Auswertung und Datenbanksuche.....	43
4.4.	High Pressure Liquid Chromatography.....	44
4.4.1.	Kettenlängen- / Gesamt-PolySia-Bestimmung	44
5.	Ergebnisse	46
5.1.	Proteinbestimmung	46
5.2.	Nachweis von PolySia in NCAM-KO-Mäusen.....	47
5.3.	Charakterisierung der PolySia in NCAM-KO-Mäusen.....	49
5.4.	NCAM-KO Kinetik-Test	51
5.5.	Immunpräzipitation.....	52
5.6.	Ankonzentrierung der Eluate.....	55
5.7.	Identifikation der PolySia-Träger	57
5.8.	Nachweis von PolySia-SynCAM1 mittels Western Blot	61
5.9.	SynCAM1 wird an N-Glykanen polysialyliert.....	62
5.10.	Identifizierung der polysialylierten N-Glykosylierungsstelle	64
5.11.	SynCAM1 wird auch im Wildtyp polysialyliert.....	67
5.12.	Bestimmung des Anteils an polysialylierten SynCAM1.....	70

6.	Diskussion	72
6.1.	SynCAM1 ist ein Zielobjekt der Polysialylierung	72
7.	Zusammenfassung	81
8.	Summary	83
9.	Abkürzungsverzeichnis	84
10.	Abbildungsverzeichnis	86
11.	Tabellenverzeichnis	87
12.	Literaturverzeichnis	88
13.	Publikationsverzeichnis	101
14.	Erklärung zur Dissertation	102
15.	Danksagung	103

1. Einleitung

1.1. Sialinsäuren

Sialinsäuren lassen sich in den meisten Glykolipiden und Glykoproteinen als terminale Monosialylreste von Glykanen nachweisen. Sie dienen unter anderem zur Regulation der Halbwertszeit von glykosylierten Plasmaproteinen und sind in der Zell-Zelladhäsion sowie Kommunikation involviert. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie ein interessanter Ansatzpunkt bei der Entwicklung neuer Medikamente [1-11]. Im Jahr 1982 wurden Polysialinsäuren (PolySia) zum ersten Mal im sich entwickelnden Säugergehirn, gebunden am neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM, von Jukka Finne beschrieben [12]. Diese Entdeckung eröffnete ein neues Forschungsgebiet für Technik und Medizin, welches sich selbst jetzt - 30 Jahre später – ständig weiterentwickelt und neue Bereiche der Forschung erschließt. Regelmäßig wurden und werden neue Prozesse entdeckt, bei denen die Polysialylierung von NCAM eine Rolle für Adhäsions- und Regulationsmechanismen spielt. Mittlerweile beeinflusst das Forschungsgebiet der Polysialinsäuren große Bereiche der Neurowissenschaften, zu denen auch diese Arbeit gezählt werden kann. So sind Polysialinsäuren direkt an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt, gelten als Malignitätsfaktor bei bestimmten zentralnervösen Tumoren und werden in Zusammenhang mit Schizophrenie diskutiert.

1.1.1. Struktur von Mono -, Di-, Oligo- und PolySia

PolySia setzt sich aus Sialinsäuren zusammen. Zur Familie der Sialinsäuren gehören mehr als 50 verschiedene Komponenten, *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) und Deaminoneuraminsäure sind die drei häufigsten (Abb. 1) [13].

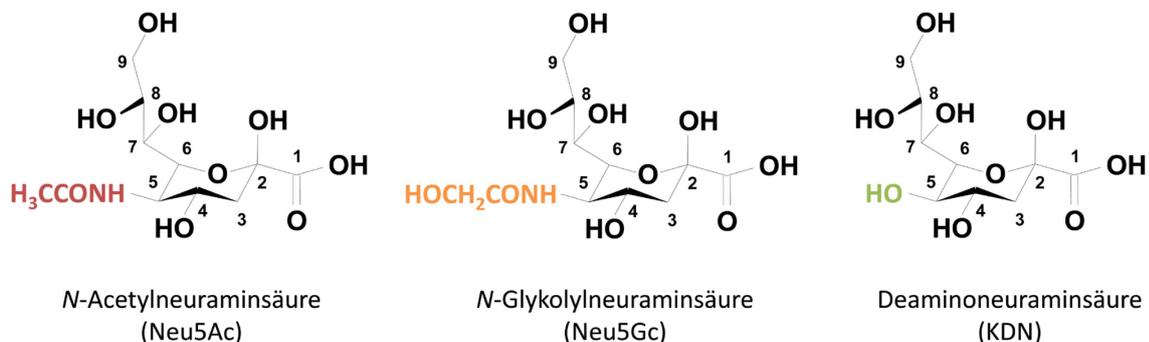


Abbildung 1: Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren

Alle Sialinsäuren sind α -Ketosäuren, welche aus einem C9-Grundgerüst mit einer Carboxylgruppe in C1-, und einer Ketogruppe in C2-Position bestehen. Sie sind an zahlreichen Glykokonjugaten als Monosialylrest vorhanden (s. Abb. 2) [12-14].

Im Gegensatz dazu kommen Di- (2 Sialinsäuren), Oligo- (3-7 Sialinsäuren) und Polysialinreste (≥ 8 Sialinsäuren) nur in wenigen Glykoproteinen in Säugern vor [15]. Oligo- und PolySia werden nach:

1. der Länge der Sialinsäurekette,
2. der Art der Verknüpfung der Sialinsäuren untereinander und
3. der Art der enthaltenen Sialinsäuremoleküle

unterschieden. Durch Substitution bzw. Fehlen der Aminogruppe, vor allem aber durch Substitution der Hydroxylgruppe, entsteht eine große Strukturvielfalt [13, 14]. PolySia ist in den meisten Fällen $\alpha 2,8$ -verknüpft. Es findet sich aber auch $\alpha 2,9$ -verknüpfte und $\alpha 2,5$ -O-glykolylverknüpfte PolySia [16, 17].

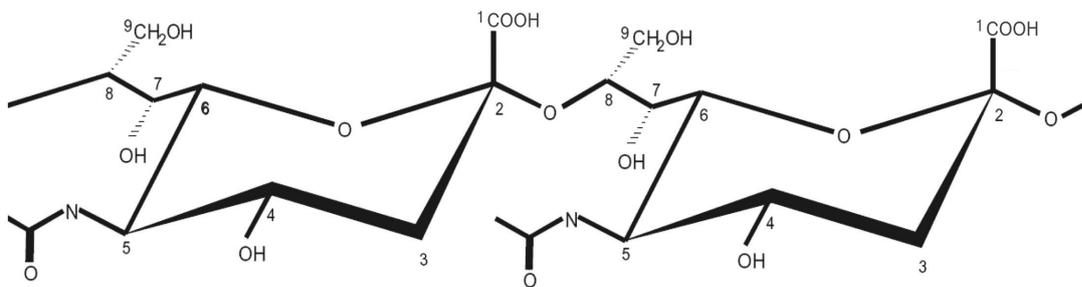


Abbildung 2: Struktur $\alpha 2,8$ -verknüpfter N-Acetylneuraminsäuren

1.1.2. Vorkommen und Funktionen von PolySia

Das Vorkommen und die Expression von PolySia unterliegen einem großen Wandel während der Entwicklung und Reifung des Organismus. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die größte PolySia-Expression während der Frühphase der Entwicklung stattfindet. Zu dieser Zeit kann PolySia in den meisten Geweben von Säugern nachgewiesen werden.

Vor allem im ZNS finden sich hohe PolySia-Konzentrationen [18, 19]. So kontrolliert PolySia molekulare und zelluläre Interaktionen während der Neurogenese, meistens als posttranslationale Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmolekül NCAM [12, 20]. PolySia-Ketten an NCAM können sich aus mehr als 50 Neu5Ac-Resten zusammensetzen [21-24]. Im visuellen Cortex wird durch PolySia beispielsweise die zeitliche Entwicklung und Plastizität von GABAergen Synapsen reguliert. Eine

frühzeitliche Entfernung von PolySia führt hier zu einer vorzeitigen Reifung der Synapsen und einer beschleunigten Zunahme der Plastizität zwischen den Nervenendigungen [25]. PolySia wird auch auf unreifen Neuronen des Gyrus dentatus (Teil des Hippocampus) erwachsener Mäuse und Ratten exprimiert. Diese neurogenetischen Vorläuferzellen können zu reifen Neuronen des Gyrus dentatus differenzieren. Während der Reifung wird ein Verlust der PolySia beobachtet, was auf einen regulatorischen Effekt bei der Entwicklung dieser Neuronen durch PolySia schließen lässt [26]. Im PNS (peripheres Nervensystem) scheint PolySia wichtigen Einfluss auf die Differenzierung von motorischen Endplatten (Muskel-Axon-Kontakte) zu haben. Durch die Anwesenheit von PolySia bilden diese sich zu schnellen Regionen aus, während sich nach vorheriger Entfernung der PolySia mittels EndoN (Endoneuraminidase N) nur noch langsame Regionen ausbilden [27].

Mit zunehmender Maturation der Gewebe nimmt die PolySia-Expression ab. Im ausgereiften Gehirn finden sich nur noch einige PolySia-reiche Regionen. Dazu zählen der Hippocampus, der Bulbus olfactorius, die subventrikuläre Zone (SVZ) und Teile des Hypothalamus [28-32]. Eine Gemeinsamkeit dieser Bereiche ist, dass sie einem ständigen Umbau unterliegen und daher eine hohe Plastizität besitzen. PolySia beeinflusst eben diese Plastizität positiv. Durch eine Erhöhung der Plastizität im adulten Gehirn ermöglicht PolySia den Nervenzellen eine verbesserte Reparatur von beschädigtem Nervengewebe [33]. Eine Transfektion von Astrozyten in verletztem Nervengewebe mit einem viralen Vektor, der eine Polysialyltransferase enkodierte, induzierte eine PolySia-Expression und als Resultate zeigten sich Wachstum und Migration von Axonen in den verletzten Bereichen [34]. Dieser Sachverhalt eröffnet einen interessanten Ansatz für die zukünftige Therapie neuronaler Verletzungen. Eine weitere beachtenswerte Regulation durch PolySia wurde im Nucleus suprachiasmaticus, welcher die zirkadiane Rhythmik reguliert, entdeckt. Als Reaktion auf Lichtreize kann die PolySia-Konzentration innerhalb einer Stunde rapide ansteigen und bei Dunkelheit schnell wieder abfallen [35-37]. Dieser Sachverhalt stellt die ausschließliche de novo Synthese von PolySia-Ketten in Frage.

Doch wie schafft es ein Sialinsäurepolymer -nicht mehr als eine posttranslationale Modifikation- vielfältige Prozesse so grundlegend zu beeinflussen?

Die Antwort liegt in der Struktur. Wie schon beschrieben, kann sich PolySia aus mehr als 50 Sialinsäuren zusammensetzen. Jede PolySia-Kette enthält viele Carboxylgruppen und besitzt somit einen stark polyanionischen Charakter. Das Ergebnis ist ein langes, negativ geladenes und lineares Glykopolymer. Durch die Negativität ist PolySia in der Lage große Mengen an Wasser in seiner Kette

einzulagern, das Resultat ist eine starke Hydrierung. Damit sich zwei Zellen annähern können, muss das Wasser zwischen ihnen jedoch entfernt werden. Gelingt dies nicht ausreichend, wird sich keine, bzw. nur eine geringe Adhäsion ausbilden. Die einfache Regulation des Abstandes zwischen Zellen durch PolySia kontrolliert somit die Fähigkeit der Zellen zur Interaktion miteinander [33, 38-41]. Dieser Regulationsmechanismus kann so neben der reinen Steuerung der Adhäsion unterschiedlichste Prozesse und Reaktionskaskaden beeinflussen und erklärt auch, warum erhöhte PolySia-Konzentration in Studien die Membranfluidität steigern [42, 43]. Eine Auflistung der bisher bekannten polysialylierten Moleküle findet sich in Tabelle 1. In Säugetieren sind bis dato vier Proteine beschrieben, die PolySia als posttranslationale Modifikation tragen.

Tabelle 1: Bisher bekannte PolySia-Träger (Darstellung modifiziert nach Galuska, S. P.)

Trägermolekül	Lokalisation	Anzahl der Sialinsäuren	Referenz
Spannungsabhängiger Natrium-Kanal	Aal, adultes Rattengehirn	≥8	[44, 45]
Neuropilin 2 (NRP-2)	Humane Dendritische Zellen	≥8	[46]
Polysialoganglioside	Seeigelsperma	bis zu 16	[41]
CD 36	Mäuse- und Menschenmilch	bis zu 18	[47]
Flagelliasialin	Seeigelsperma	bis zu 20	[48, 49]
Polysialoglykoprotein (PSGP)	Lachseier	bis zu 24	[50]
NCAM	Neurone von Vertebraten	bis zu 60	[12, 22]
Glykokalyx	Neuroinvasive Bakterien	bis zu 200	[40, 51, 52]

1.2. Das neuronale Zelladhäsionsmolekül NCAM

NCAM gilt bis jetzt als Hauptträger von PolySia und ist ein entscheidender Faktor bei der Migration von neuronalen Vorläuferzellen im pränatalen Gehirn. Besonders die Polysialylierung von NCAM und die Funktionsunterschiede zwischen NCAM und PolySia-NCAM sind nach über 30 Jahren Forschung und den dadurch resultierenden Erkenntnissen weitreichend und eingehend untersucht worden.

1.2.1. Struktur

NCAM gehört zur Immunglobulinsuperfamilie (IGSF) [53-56]. IGSF besteht aus Zelloberflächenrezeptoren wie den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen (NCAMs), interzellulären Adhäsionsmolekülen und Nektinen, bzw. Neclns (*engl. nectin like proteins*). Die verschiedenen IGSF-Moleküle weisen alle charakteristische Immunglobulin ähnliche Domänen auf, sie haben unterschiedlichste Funktionen und fungieren als Adhäsionsmoleküle und Zelloberflächenrezeptoren in Bereichen wie Proliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Zelltod.

NCAM wurde vor über 30 Jahren als Zelloberflächen-Glykoprotein identifiziert [57] und wird in der Maus aus einem einzelnen Gen transkribiert [58]. Durch alternatives Spleißen werden hauptsächlich 3 Isoformen exprimiert, die zwei Transmembranproteine NCAM-140 und NCAM-180 und das mittels Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) in der Membran befestigte NCAM-120 (s. Abb. 3). Der extrazelluläre Teil besteht aus 5 Ig-ähnlichen und 2 Fibronektin Typ III (FNIII)-homologen Domänen. N-Glykane aller drei Isoformen (NCAM-120, -140, -180) können polysialyliert werden [59-61]. Hierbei handelt es sich um die Glykosylierungsstellen fünf und sechs, die beide in der fünften Ig-ähnlichen Domäne lokalisiert sind [62-65].

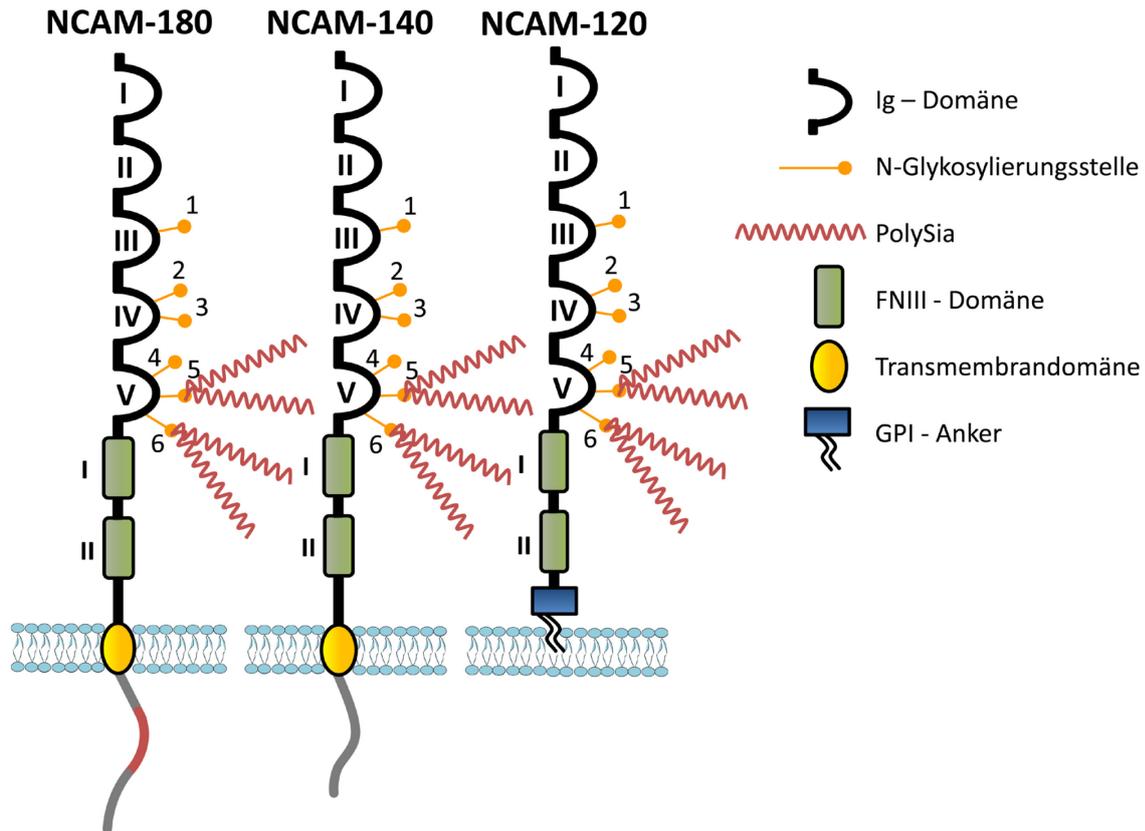


Abbildung 3: Isoformen von NCAM

Alle drei Isoformen können an N-Glykanen der fünften und sechsten N-Glykosylierungsstelle polysialyliert werden. Die FNIII-Domänen sind potentielle O-Glykosylierungsstellen. (Darstellung modifiziert nach Kleene R., *et al.* [39])

1.2.2. Vorkommen und Funktionen von NCAM

NCAM ist der Hauptträger von α 2,8-verknüpfter PolySia im Säuger. PolySia-NCAM fördert die Plastizität durch Reduktion von Zell-Zell- und Zell-EZM (Extrazelluläre Matrix)-Kontakten, wodurch strukturelle Veränderungen und Zellmigrationen stattfinden können [19, 66-68].

Unpolysialyliert ist NCAM an der Signalübermittlung [69], am Transport von synaptischen Vesikeln [70] und wie bereits erwähnt an Adhäsionsprozessen beteiligt.

Polysialyliertes NCAM findet sich hauptsächlich im pränatalen und postnatalen Gehirn. Ab dem achten Tag der Embryonalentwicklung (E8) lässt sich NCAM im Mäusegehirn nachweisen. Die NCAM-Expression steigt danach an und erreicht ihr Maximum in der perinatalen bzw. frühen postnatalen Phase [71-73]. Das Gehirn befindet sich zu diesem Zeitpunkt in seiner intensivsten Entwicklungsphase mit maximaler Neurogenese und Zellmigration, starkem Axonwachstum und hoher synaptischer Plastizität [19, 74]. PolySia-NCAM kann in dieser Phase in fast allen Arealen nachgewiesen werden. Mit der zunehmenden Reifung des Gehirngewebes wird die

Menge immer geringer (s. Abb. 4) [75]. Im adulten Gehirn ist PolySia-NCAM nur in einigen Arealen vorzufinden, nämlich im Hippocampus, im Hypothalamus und im Bulbus olfactorius. Auch im ausgereiften Zustand findet hier noch eine kontinuierliche Neurogenese statt und es herrscht eine hohe Plastizität [28-32]. Im Hippocampus sind Situationen beschrieben, in denen der PolySia-NCAM Level ansteigt. Lernen und Gedächtnistraining beeinflussen beispielsweise die PolySia-NCAM Konzentration kurzfristig [76-79], diverse Krankheiten und chronischer Stress können für einen längerfristigen Anstieg sorgen [80, 81]. Schließlich kommt es während pathologischer Situationen wie Ischämien, M. Alzheimer und Gehirnverletzungen zu einem veränderten PolySia-NCAM-Level [19, 82-87]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PolySia an neuroprotektiven Prozessen beteiligt ist. Hyperthermie erhöht die Expression von PolySia-NCAM im Hippocampus für über eine Woche. Ein Fehlen von PolySia-NCAM führte in den Versuchen zu vermehrten Zellschäden und Zelltod [88].

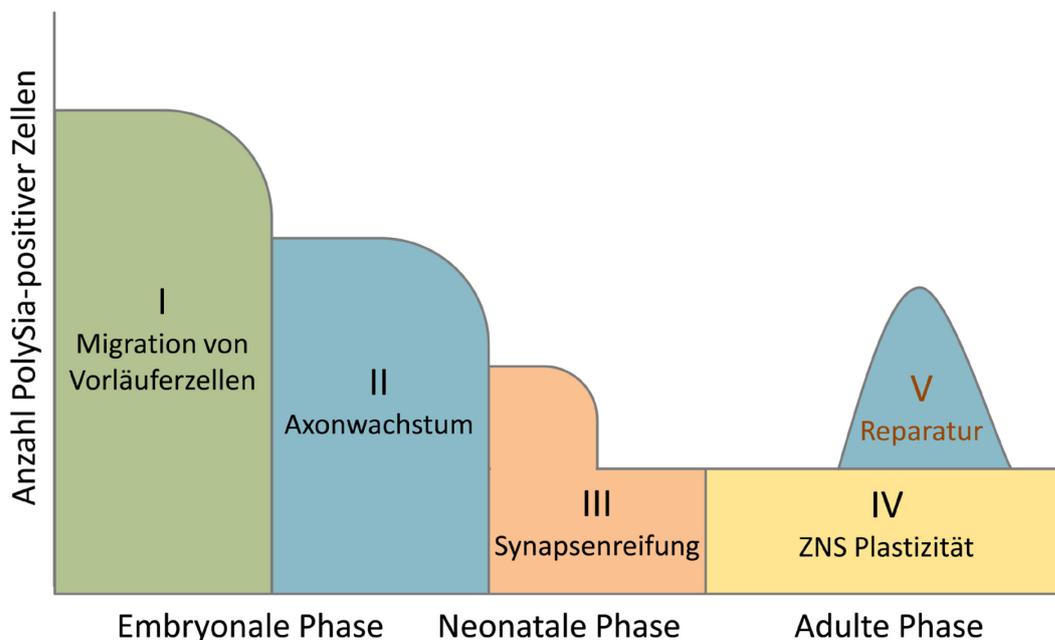


Abbildung 4: Schematisierte Darstellung der PolySia-Expression im Säuger in Abhängigkeit zur Entwicklungsstufe (Darstellung modifiziert nach Rutishauer, U., [33])

NCAM ist ein entscheidender Faktor für die Migration von neuronalen Vorläuferzellen. Bei NCAM-Knock-out-Mäusen, denen NCAM fehlt, findet keine Tangentialmigration von Vorläuferzellen der subventrikulären Zone (SVZ) hin zum Bulbus olfactorius statt [89-91]. Als Resultat besitzen diese Mäuse einen verkleinerten Bulbus olfactorius. Eine andere Studie hat gezeigt, dass PolySia-NCAM als kontra-apoptischer Faktor in unreifen Neuronen der subventrikulären Zone fungiert. Der Verlust von PolySia, sowie

die Inaktivierung von NCAM führten zu einem verkürzten Überleben von Neuronen infolge einer erhöhten p75-Rezeptorexpression. Wahrscheinlich reguliert PolySia-NCAM hier die p75-Rezeptor-Expression [92].

Des Weiteren wurde bewiesen, dass die Reduzierung der Polysialylierung von Oligodendrozyten während der Differenzierung und Entwicklung des Gehirnes Voraussetzung für eine effiziente Myelinisierung von Axonen durch reife Oligodendrozyten ist. Bei ausbleibender Depolysialylierung zeigten sich Axondegenerationen und überflüssiges Myelin, da durch PolySia keine homophilen NCAM-NCAM-Interaktionen zwischen Axon und der Myelinscheide möglich waren [93-96]. Diese Ergebnisse verdeutlichen wie komplex die Funktion Polysialylierung eigentlich ist. Zu Beginn der Gehirnentwicklung beeinflusst PolySia die Maturation positiv, gegen Ende eher negativ. Nur eine genaue Anpassung des Polysialylierungsgrades an den jeweiligen Entwicklungsstand sorgt wahrscheinlich für eine suffiziente und physiologisch ablaufende Entwicklung.

Eine andere wichtige Rolle spielt PolySia-NCAM in der Tumorgenese. PolySia-NCAM wird in einigen Tumoren wie z.B. dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und dem multiplen Myelom reexprimiert [97]. Durch die stark negativ geladene Oberfläche ermöglicht PolySia den Tumorzellen ein signifikant beschleunigtes Wachstum und eine erhöhte Metastasierungsrate [98]. Nicht polysialyliertes NCAM verlangsamt hingegen die Tumorprogression und korreliert umgekehrt zur Malignität [99].

Des Weiteren wird NCAM auch im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen beschrieben. So spielt eine Dysregulation von NCAM in der Pathophysiologie der Schizophrenie eine wichtige Rolle. Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine unübliche Polysialylierung von NCAM für die Entstehung dieser Krankheit mitverantwortlich ist [100-104]. Dazu passt, dass die morphologischen Veränderungen im Gehirn von NCAM-Knock-out-Mäusen denen von schizophrenen Patienten ähneln [105-108]. Eine Dysfunktion der Polysialylierung wird ebenfalls bei der Pathogenese der Epilepsie diskutiert [109].

1.2.3. Eigenschaften und Bindungsverhalten

NCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül und Regulator von vielfältigen Prozessen. Um seine Funktionen auszuführen, muss es mit anderen Zellen interagieren können. Dies geschieht über Zell-Zell-Kontakte.

Homophile Bindungen zwischen zwei NCAM-Molekülen sind möglich, indem die Ig-ähnlichen Domänen miteinander interagieren [110, 111]. Hierbei sind cis-(NCAM-

NCAM-Wechselwirkungen auf der Oberfläche der gleichen Zelle) und trans-(NCAM-NCAM-Wechselwirkungen zwischen zwei unterschiedlichen Zellen) Interaktionen möglich. Es konnte gezeigt werden, dass bei sehr starker Polysialylierung von NCAM die homophile Bindung komplett inhibiert werden kann [18, 112], der Abstand zwischen zwei Zellen vergrößert sich hierbei um mehr als 10 nm. Auch die durch andere Zelladhäsionsmoleküle (L1-CAM und N-Cadherin) vermittelte Adhäsion der Zelloberflächen wird gestört bzw. aufgehoben [47, 113, 114].

Mittels heterophiler Bindung ist es NCAM möglich mit einer Vielzahl von Liganden zu interagieren. So kann NCAM das neurale Wachstum induzieren, indem es an den Fibroblasten-Wachstums-Faktor-Rezeptor-1 (FGFR-1) und den von Gliazellen abstammenden neurotrophen Faktor (GDNF) bindet [115-117]. Des Weiteren können heterophile Bindungen durch Modulation der Adhäsion von Chondroitin-Sulfat-Proteoglykanen eine Verlängerung von Axonen bewirken [118-121].

Eine Besonderheit von NCAM ist die Dualität zwischen unpolysialylierter und polysialylierter Form. Unpolysialyliertes NCAM fungiert als Adhäsionsmolekül, PolySia-NCAM hingegen wahrscheinlich mehr als Signal- und Regulationsmediator [122].

1.3. Die Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV

Das menschliche Genom enthält wahrscheinlich die genetische Information für mehr als 20 verschiedene Sialyltransferasen (ST). Sie werden in den unterschiedlichsten Geweben und Zellen exprimiert und regulieren dort die zellulären Sialylierungsmuster [123]. Die Expression eines jeden ST-Genes ist genau geregelt. Die Präsenz von PolySia ist immer an eine Expression von ST8SialI und/oder ST8SialIV geknüpft, wodurch anzunehmen ist, dass es sich bei ST8SialI und ST8SialIV um die zwei Schlüsselenzyme für die Synthese von PolySia handelt [124].

1.3.1. Struktur

ST8SialI und ST8SialIV gehören zur eukaryontischen Familie der Sialyltransferasen (ST). Sie sind α 2,8-Sialyltransferasen und haben, wie die anderen ST auch, eine Transmembrandomäne und sind an mehreren Stellen N-glykosyliert. Es gibt auch α 2,3-Sialyltransferasen und α 2,6-Sialyltransferasen - sie benötigen Galaktose, N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalactosamin als Akzeptormolekül. Im Gegensatz zu diesen ST benötigen die α 2,8-ST eine Sialinsäure als Akzeptormolekül. Lokalisiert sind sie beide im Golgi-Apparat der Zelle [123, 125]. Die Aminosäuresequenzen von

ST8SialII und ST8SialIV stimmen zu 59% überein, der Aufbau und die Funktionsweise ähneln sich sehr. Ein Unterschied ist, dass ST8SialII an 6 Asparaginresten N-glykosyliert, ST8SialIV nur an fünf Stellen N-glykosyliert ist (siehe Abb. 5) [126-128].

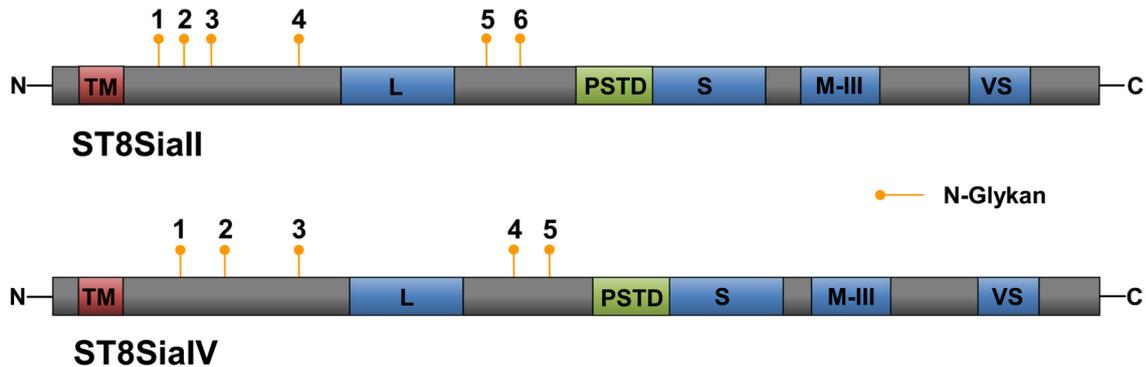


Abbildung 5: Primärstruktur der Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV

Die Sialyltransferasen bestehen aus der Transmembrandomäne (TM), den Sialylierungsmotiven L (large), S (small) und VS (very small), dem hochkonservativem Motiv-III (M-III), der Polysialyltransferasendomäne (PSTD) und den 5 bzw. 6 N-Glykanen.

Um Glykane sialylieren zu können, müssen die Sialyltransferasen an das Akzeptormolekül binden. Dies geschieht über das Sialylierungsmotiv S (SiaM-S) [129, 130]. Mit den Sialylierungsmotiven L und S können die ST das Donorsubstrat - aktivierte Sialinsäuren - binden. Zusätzlich besitzen beide ST noch das SiaM-VS, dessen Histidin für die katalytische Aktivität der Transferasen essentiell ist [131]. Die Funktion des hochkonservativen Motiv-III (M-III) ist bisher noch unbekannt [132, 133]. Beide ST haben im Gegensatz zu allen anderen α 2,8-ST eine Region mit 10 bis 15 basischen Aminosäuren vor dem SiaM-S [134]. Die partielle Entfernung dieser Region bzw. Ausschaltung von Aminosäuren dieser Region ergab, dass die Polysialylierung mit steigender Anzahl von entfernten Aminosäuren abnimmt bzw. ganz verhindert werden kann. Anzunehmen ist eine nötige Interaktion zwischen basischen AS und der PolySia-Kette. Die Domäne wird aus diesem Grund als Polysialyltransferasendomäne (PST-Domäne) bezeichnet.

1.3.2. Polysialylierung von NCAM durch ST8SialII / -IV

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass NCAM von beiden Sialyltransferasen (ST) polysialyliert wird [135-138]. Bekannt ist, dass in PolySia-positiven Arealen mindestens eines der Enzyme exprimiert wird [28, 72, 139-142]. Dies zeigt, dass die beiden ST

unabhängig voneinander arbeiten können. Zusätzlich lassen bisherige Ergebnisse darauf schließen, dass die Expression der beiden Transferasen unabhängig voneinander reguliert werden kann [143-146].

Die Polysialylierung von NCAM beginnt im Mäusegehirn im Durchschnitt am neunten embryonalen Tag (E9), dies ist circa einen Tag nach Beginn der NCAM-Expression [71-73]. Passend zum Beginn der PolySia-Expression lassen sich Transkripte der beiden ST erstmalig um E8,5 nachweisen [71, 141]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die enge Beziehung zwischen NCAM, Sialyltransferasen und PolySia.

Die Expressionslevel der beiden Sialyltransferasen ST8SialII und IV unterscheiden sich deutlich im zeitlichen Verlauf [141, 147]. Zwischen dem ersten und neunten postnatalen Tag (P1-P9) ist das mRNA-Level für ST8SialII deutlich höher als das für ST8SialIV. Beide ST werden ab P1 herunter reguliert, um P9 erreichen sie identische mRNA-Level, danach fällt das ST8SialII-Level unter das von ST8SialIV ab [73, 141]. Die Herunter-Regulation der beiden ST spiegelt sich in einer 70 %igen Abnahme des PolySia-Levels wieder und korreliert mit der Reduktion von PolySia-NCAM zur unpolysialylierten Form von NCAM (siehe Abb. 6).

Beide ST haben unterschiedlichen Einfluss auf den PolySia-Level und dadurch auf die Menge an PolySia-NCAM. In ST8SialII-Knock-out-Mäusen, in denen nur noch ST8SialIV exprimiert wurde, war die PolySia-Gesamtkonzentration im Vergleich zum Wildtyp zwischen P1 und P17 deutlich erniedrigt - sie lag bei durchschnittlich 60 %. Im Gegensatz dazu hat der Verlust von ST8SialIV in ST8SialIV-Knock-out-Mäusen keinen signifikanten Einfluss auf die PolySia-Konzentration während der Gehirnentwicklung. Lediglich im adulten Gehirn konnten leicht verminderte Level von PolySia gefunden werden [73, 148]. Da die NCAM-Expression in beiden Knock-out-Mäusen unbeeinflusst war, zeigte sich im Falle der ST8SialII-Knock-out-Maus eine im Vergleich zum WT 50 %ige Abnahme von polysialyliertem NCAM, wohingegen ST8SialII sogar in Abwesenheit von ST8SialIV in der Lage war den kompletten NCAM-Pool fast identisch zum WT zu polysialylieren [149]. Dieses Ergebnis ist teilweise gegensätzlich zu Ergebnissen von *in vitro* Studien, welche ST8SialIV als das aktivere und flexiblere Molekül identifizierten [124].

In vitro können sich die beiden Polysialyltransferasen selbst autopolysialylieren, obwohl es keine Parallelen hinsichtlich der Aminosäuresequenzen von NCAM und den Polysialyltransferasen gibt [150].

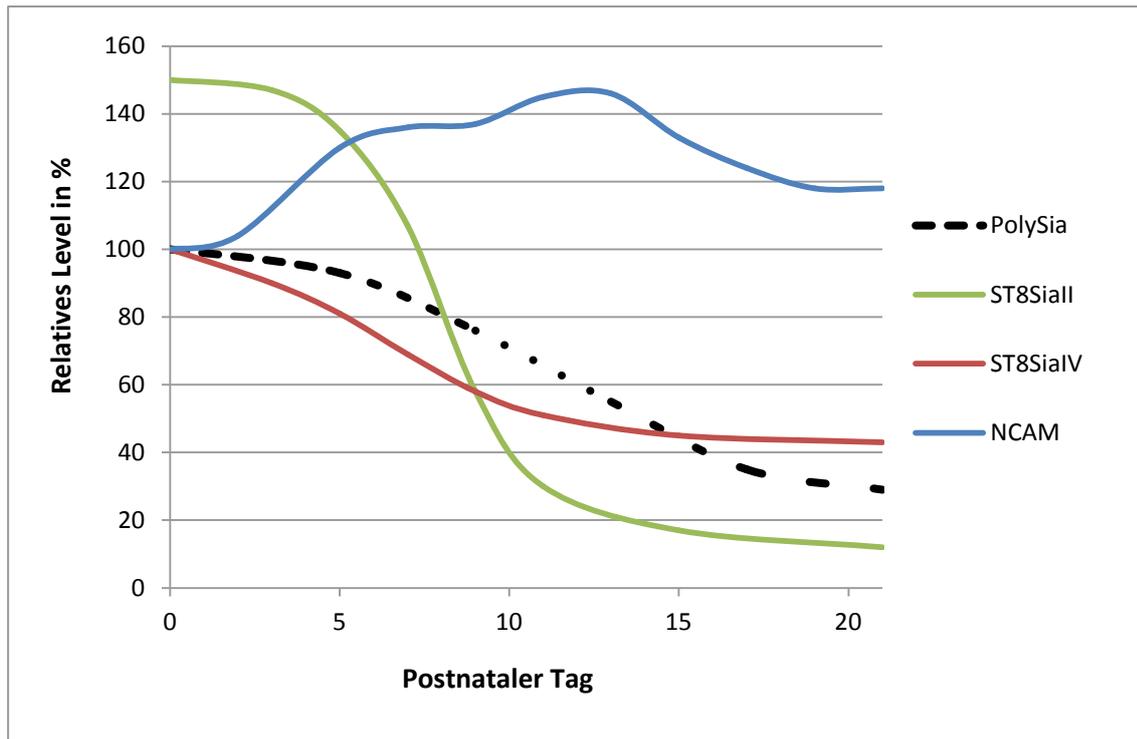


Abbildung 6: Expression von ST8SialII und IV im WT in Relation zum PolySia- und NCAM-Level

Die Daten beziehen sich auf den Zeitraum P1-P21. PolySia- und NCAM-Level entsprechen der rel. Protein-Konzentration, ST8SialII- und IV-Kurve beziehen sich auf die rel. mRNA-Level. Bei der PolySia- und NCAM-Kurve wurden die P1-Level als 100 % gesetzt, bei ST8SialII und IV wurde das ST8SialIV-Level auf 100 % gesetzt. Bei P9 sind die mRNA-Level beider ST identisch. Die PolySia-Konzentration ist an das ST-Level gekoppelt, das NCAM-Level ist unabhängig. (Darstellung modifiziert nach Oltmann-Norden, I., et al. [73] und Mühlenhoff, M., et al. [148])

1.3.3. Einfluss der Polysialyltransferasen auf Medizin und Technik

„*To sialylate, or not to sialylate: that is the question*“ [151] – Mit diesem provokanten Titel wollte der Autor der Publikation unter anderem auf die Bedeutung der Polysialinsäuren bei Bakterien hinweisen. Wie bereits ausführlich beschrieben, spielt PolySia jedoch auch besonders für die Entwicklung und Reifung des Gehirns und während Reparaturprozessen eine entscheidende Rolle. Um den genauen Einfluss von PolySia während Reparaturprozessen zu untersuchen, wurden Schwann-Zellen generiert, welche die Fähigkeit besitzen die Sialyltransferase ST8SialII zu exprimieren [124].

Die ektopische Expression von PolySia verbesserte die Zellmobilität *in vitro* [152] und beschleunigte die Axonregeneration im Mausmodell *in vivo* nach spinalem Trauma [153]. Dabei hatten die veränderten Schwann-Zelleigenschaften keine Auswirkungen auf das Myelinisierungspotential. Dies verdeutlicht, dass allein eine verbesserte

Motilität von Schwann-Zellen die funktionelle Regeneration von beschädigtem Nervengewebe begünstigt.

Eine andere Studie verdeutlichte zudem, dass PolySia die Heilung positiv beeinflussen kann. Nach End-zu-Seit Anastomisierung von durchtrennten peripheren Mäusenerven zeigte sich eine deutlich schnellere Heilung bei der Gruppe, welcher ST8SialI-transfizierte Schwann-Zellen im Anastomosensbereich zugesetzt wurden [154].

Hervorzuheben ist, dass ST8SialI und ST8SialIV unterschiedliche Rollen bei der Regeneration von peripheren Nerven spielen. Bei Single-KO-Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von ST8SialI die Anzahl und die Größe von regenerierten Nervenfasern deutlich reduziert war. Im Gegensatz dazu war die Regeneration bei ST8SialIV-KO-Mäusen zum WT erhöht [155].

1.4. ST8SialI-, ST8SialIV- und NCAM-defiziente Mäuse

Die Deletion von NCAM wurde erstmalig 1994 durchgeführt. Das Resultat war die NCAM-KO-Maus. Schon die erste Studie demonstrierte, dass die NCAM-KO-Maus ein im Vergleich zum Wildtyp erniedrigtes Gehirngewicht und einen um ein Drittel verkleinerten Bulbus olfactorius besitzt (s. Tab. 2) [91]. Weitere Forschungen zeigten, dass PolySia-NCAM essentiell für die Migration neuraler Vorläuferzellen von der subventrikulären Zone (SVZ) zum Bulbus olfactorius ist [156-159]. Interessanterweise weisen NCAM-KO-Mäuse bei der Reifung der Großhirnrinde oder des Kleinhirns keine weiteren eindeutigen Migrations-Defekte auf [160].

NCAM-KO-Mäuse sind vollkommen lebensfähig und fruchtbar, obwohl NCAM viele wichtige regulatorische und adhäsive Funktionen zugeordnet werden. Die Deletion von NCAM führte zu einem nahezu kompletten Verlust von PolySia und einem leicht verringerten Gehirngewicht. Die Zytoarchitektur war bis auf wenige Ausnahmen normal [91]. Wie schon zuvor beschrieben zeigten die NCAM-KO-Mäuse einen signifikant verkleinerten Bulbus olfactorius. Dasselbe Ergebnis ließ sich bei Wildtyp-Mäusen durch eine EndoN-Injektion in die subventrikuläre Zone erzielen, wodurch gezeigt werden konnte, dass das Fehlen von PolySia, und nicht die Abwesenheit von NCAM, für diese strukturelle Störung verantwortlich war [157].

Ein zweiter morphologischer Unterschied von NCAM-KO-Mäusen zum WT war die fehlende Myelinisierung von Moosfasern [90]. Auch dieser Defekt konnte im WT durch EndoN-Injektion kopiert werden [161], was erneut zeigt, dass PolySia und nicht NCAM den regulierenden Faktor darstellt (siehe Tab. 2).

Neben den beschriebenen morphologischen Veränderungen wirkt sich das Fehlen von NCAM auch auf Verhalten und Psyche aus. Im Menschen konnte eine Abnahme von NCAM bei depressiven Patienten demonstriert werden [162]. Diese Beobachtung konnte durch Versuche mit NCAM-KO-Mäusen bestätigt werden. Auch in NCAM-KO-Mäusen wirkt sich das Fehlen von NCAM auf das psychische Verhalten aus. Es konnte herausgefunden werden, dass NCAM-KO-Mäuse einen depressionsähnlichen Phänotyp ausbilden [163]. Zudem weisen NCAM-KO-Mäuse beeinträchtigte Lernprozesse, verstärkte interandrogene Aggressivität und angstähnliches Verhalten auf [91, 164, 165].

ST8SialI- und ST8SialIV-Single-KO-Mäuse - jeweils eine ST ist ausgeschaltet - weisen einen normal entwickelten Bulbus olfactorius auf, was auf eine funktionierende Migration schließen lässt. Dies veranschaulicht, dass die neuronalen Vorläuferzellen der SVZ sowohl durch ST8SialI als auch durch ST8SialIV polysialyliert werden können [166, 167]. Die Inaktivierung jeweils einer Sialyltransferase beeinflusst Lern-, Gedächtnis- und Konditionierungsprozesse, welche mit der Funktion des Hippocampus in Verbindung gebracht werden, unterschiedlich [166-168]. Dies lässt darauf schließen, dass ST8SialI und ST8SialIV unterschiedliche Rollen für die neuronale Plastizität spielen.

Doppel-KO-Mäuse - beide ST sind gleichzeitig ausgeschaltet - zeigen einen gravierenden Phänotyp. Neben einer hohen postnatalen Letalität, nach vier Wochen waren über 80% gestorben, finden sich auffällige Gehirnanomalien [106]. So entwickeln sie einen Hydrozephalus, das Volumen der Capsula interna ist reduziert und die vordere Kommissur und der kortikospinale Trakt sind fehlgebildet [106]. Diese Phänotypen zeigten sich nicht in NCAM-, ST8SialI- und ST8SialIV-Single-KO Mäusen. Wurde in Doppel-KO Mäusen zusätzlich NCAM ausgeschaltet (Triple-KO Maus), starben die Mäuse nicht und entwickelten keine schwerwiegenden Fehlbildungen [106]. Dieser Sachverhalt deutet darauf hin, dass unpolysialyliertes NCAM in PolySialindefizienten Mäusen für die beobachteten pathologischen Veränderungen verantwortlich sein muss.

Tabelle 2: Phänotyp von NCAM-KO-Mäusen

	Phänotyp	Referenz
NCAM-KO-Maus	Leichteres Gehirngewicht Kleinerer Bulbus olfaktorius Geringeres räumliches Lernvermögen	[91]
	Gesteigerte Aggressivität unter Männchen	[169]
	Ängstlicheres Verhalten	[164]
	Störung des Wach-Schlaf-Rhythmus	[69]
	Veränderter Verlauf der Moosfasern im Hippokampus	[170]
	Delaminierte Moosfasern	[171]
	Vesikelbildung an den Synapsen der motorischen Endplatte verringert	[172, 173]

1.5. SynCAM1

1.5.1. SynCAM und die Immunglobulinsuperfamilie

Die Immunglobulinsuperfamilie (IGSF), zu der auch das synaptische Zelladhäsionsmolekül (SynCAM) gehört, ist eine von vier unterschiedlichen Kategorien an Zelladhäsionsmolekülen. Bei den drei anderen handelt es sich um Integrine, Selectine und Cadherine [174].

Das synaptische Zelladhäsionsmolekül (*engl. synaptic cell adhesion molecule*) SynCAM gehört zu den *Nectin-like-proteins* (Necls). Insgesamt sind vier SynCAM-Isoformen beschrieben (s. Tab. 3), welche sich auf Aminosäuren-Level teilweise sehr ähneln (SynCam2 vs 3 = 50%; SynCAM1 vs 3 bzw. 4 = 36%) [175].

Es existieren mehrere Synonyme für SynCAM1 und die verschiedenen Nomenklaturen sind verwirrend. Die zahlreichen Namen ergeben sich aus den unterschiedlichen Eigenschaften und dem Sachverhalt, dass SynCAM1 in vielen Organen und Geweben vorkommt (siehe Tab. 3).

Ursprünglich als IGSF4 bekannt, wurde SynCAM1 von mehreren unabhängigen Forschungsgruppen identifiziert und charakterisiert. Als Resultat der parallelen Entdeckung wurde das Molekül mit mehreren Namen bezeichnet [176]. So wurde SynCAM1 als ein Tumorsuppressor von kleinzelligen Lungentumoren charakterisiert und deshalb als TSLC1 (*engl. tumor suppressor of lung cancer 1*) benannt [177]. Eine andere Gruppe, welche SynCAM1 als Adhäsionsmolekül zwischen Spermatogonien (Vorläuferzellen von Spermien) und Sertolizellen (Stütz- und Versorgerzellen der Spermatogonien) entdeckten, nannten es SgIGSF (*engl. spermatogenic immunoglobulin superfamily member*) [178, 179]. Zusätzlich ist SynCAM 1 auch unter den Namen Necl-2 [180, 181] und RA175 bekannt [182]. Die *Human Genome Organization* (HUGO) benannte diese Gene in *cell adhesion molecules* (Cadms) um. Cadms sind Ca^{2+} unabhängige Immunglobulin (Ig)-ähnliche Adhäsionsmoleküle, die homophil und heterophil interagieren können und dadurch Zell-Zell-Adhäsionen bewirken. Sie bestehen alle aus einer extrazellulären Region mit drei Immunglobulin ähnlichen Schleifen, einer transmembranären- und einer zytoplasmatischen Region.

Tabelle 3: Nomenklatur der CADM – Genfamilie

Auflistung aller Proteine der vier CADM – Gruppen mit Hervorhebung des Schwerpunktes dieser Arbeit (graues Feld)

Humanes Gen	<i>CADM1</i>	<i>CADM2</i>	<i>CADM3</i>	<i>CADM4</i>
Mausgen	<i>Cadm1</i>	<i>Cadm2</i>	<i>Cadm3</i>	<i>Cadm4</i>
SynCAMs	SynCAM1	SynCAM-2	SynCAM-3	SynCAM-4
Alternative Gen- und Proteinamen	Necl2	Necl3	Necl1	Necl4
	IGSF4	IGSF4D	IGSF4B	IGSF4C
	SgIGSF		TSL1 (<i>TSLC 1 - like gene</i>)	TSL2 (<i>TSLC 1 - like gene</i>)
	TSLC1 (<i>Tumor suppressor in lung cancer</i>)			
	RA 175			
Referenzen	[177, 178, 180, 183, 184]	[180]	[180, 185]	[180, 185]

1.5.2. Struktur

Die Aminosäuresequenzen von SynCAM1 aus Maus und Mensch sind zu 98% identisch [175]. Der extrazelluläre Teil von SynCAM1 setzt sich aus einer variablen, einer konstanten und einer intermediären Ig-Domäne sowie einem NH₂-terminalen Signalpeptid zusammen (s. Abb. 7). An den drei Ig-Domänen befinden sich sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen, zwischen I-Typ Domäne und Transmembranregion liegen drei potentielle O-Glykosylierungsstellen.

Die extrazelluläre Domäne zeigt Ca²⁺ unabhängige homophile und heterophile Adhäsionsaktivität. Nach der C-terminalen Transmembrandomäne folgt der intrazellulärer Anteil, welcher sich aus zwei Domänen zusammensetzt, einer FERM- und einer PDZ-Bindungsdomäne. Die PDZ-Bindungsdomäne kann mit anderen Proteinen interagieren, indem sie sequenzspezifisch an kurze Peptide innerhalb anderer Proteine bindet [175, 180, 182].

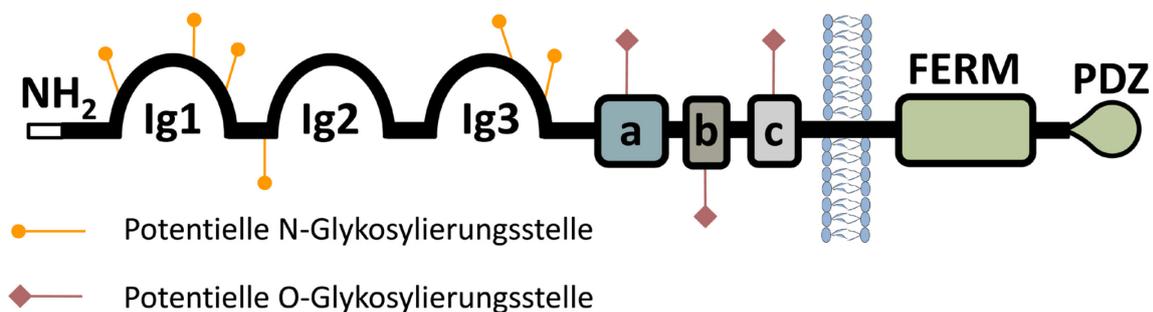


Abbildung 7: Schematische Struktur von SynCAM1

Das extrazelluläre Segment enthält ein NH₂-terminales Signalpeptid (NH₂) und drei Ig-Domänen. Die zytoplasmatische Region besteht aus einer FERM- und PDZ-Bindungsstelle (Darstellung modifiziert nach Maurel, P., et al. [186]; Fogel, A. I., et al. [187] und Rollenhagen, M. et al [188]).

1.5.3. Vorkommen und Funktionen

Umfangreiche Studien haben gezeigt, dass SynCAM1 während der Frühentwicklung von Mäusen in fast allen Epithelien (Haarfollikel, Lunge, Leber, Darm, Zunge, olfaktorisches Epithel, Hinterhorn des Rückenmarks, einige Bereiche des ZNS - Kleinhirn, Thalamus, Cortex) exprimiert wird [184, 189, 190].

Im embryonalen ZNS ist SynCAM1 während der Entwicklung in vielen Neuronen verschiedener Nervenbahnen nachweisbar. Besonders hoch exprimiert wird SynCAM1 in thalamocortikalen Bahnen innerhalb der Capsula interna, in der Retina und dem olfaktorischen System. In allen drei Bereichen findet sich eine Koexpression mit NCAM. Im Rückenmark, ebenfalls einem Teil des ZNS, lässt sich SynCAM1 in Axonen

der vorderen Kommissur (Nervenkreuzung von der rechten auf die linke Seite des Rückenmarkes, bzw. anders herum) und dem Funiculus posterior (Hinterstrang - hier befinden sich überwiegend afferente Nervenbahnen) nachweisen [189].

Ähnlich zu NCAM lassen sich SynCAMs nach der Geburt hauptsächlich in Arealen großer Plastizität finden. SynCAM1 wird besonders im Hippocampus, SynCAM2, 3 und 4 im Gyrus dentatus, dem Bulbus olfactorius und dem Cortex exprimiert [187, 191].

Diese Beobachtungen lassen zusammen mit weiteren Adhäsions- und Expressionsprofilen darauf schließen, dass SynCAMs einen großen Stellenwert bei der Vernetzung und Verschaltung von Synapsen im ZNS haben [191]. Funktionsanalysen im ZNS zeigen zusätzlich, dass SynCAM1 für die Differenzierung und Reifung von Synapsen zum exzitatorischen oder inhibitorischen Phänotyp verantwortlich ist [192]. Durch die laterale Anordnung von SynCAM1 an Neuronen wird die Synapsengröße eingeschränkt. Dies indiziert, dass SynCAM1 nicht nur die Reifung initiieren, sondern auch zur strukturellen Organisation von Synapsen beiträgt [193]. SynCAM1 befindet sich sowohl auf der prä- als auch der postsynaptischen Membran und induziert hier die Differenzierung auf beiden Seiten [180, 187, 194]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass SynCAM1 eine sowohl spontane wie auch eine geregelte Transmitterausschüttung initiieren und an Zonulae occludentes binden kann [194]. SynCAM1 ist damit, den calziumabhängigen β -Neurexin-Neurologin-Komplex ausgenommen, das einzige Protein, welches alleine in der Lage ist eine funktionelle synaptische Differenzierung von Neuronen zu induzieren. Es wird vermutet, dass diese Reifung über die intrazellulär gelegene PDZ-Domäne ausgelöst wird [180]. Im Hypothalamus wird SynCAM1 in Astrozyten und GnRH-Neuronen exprimiert und fördert die Zelladhäsion zwischen beiden durch homophile Interaktionen [195]. Es wird angenommen, dass SynCAM1 über diese Zell-Zell-Kontakte an der hypothalamischen Kontrolle der weiblichen Pubertät beteiligt ist und damit eine wichtige Komponente im genetischen Netzwerk während der sexuellen Differenzierung darstellt [196, 197].

Auch im peripheren Nervensystem (PNS) können SynCAMs nachgewiesen werden. Sie werden von Neuronen und myelinisierenden Schwann-Zellen in sowohl sensorischen wie auch motorischen peripheren Nerven exprimiert [189, 190, 198] und fungieren dort als Mediatoren für Axon-Glia-Interaktionen entlang der Internodien [186]. Weitere Studien zeigten, dass Nervenfunktion und SynCAM1-Level in engem Verhältnis zueinander stehen. Nach Nervendurchtrennung bzw. Nervenquetschung des Ischiasnerven (*nervus ischiadicus*) spiegelten abnehmende SynCAM1-Level den Funktionsverlust bzw. die Zerstörung von Synapsen wider. Im Falle der Quetschung konnten sich die Synapsen gut regenerieren, auch das SynCAM1-Level stieg hier parallel zur sich erholenden Funktion des Nerven wieder an [199, 200].

Wie bereits aufgeführt, findet man SynCAM1 ebenfalls außerhalb des Gehirnes in diversen Organen und Geweben. Hier übernimmt es die Funktion eines Adhäsionsproteins. Zuerst wurde SynCAM1 als Tumorsuppressor bei kleinzelligen Lungentumoren beschrieben (TSLC1) [177]. Bei diesen Lungencarcinomen wird SynCAM1 ausgeschaltet, somit kommt es durch fehlende SynCAM1-Bildung zu Veränderungen der Zellpolarität und der Zell-Zell-Adhäsion. Das Ergebnis ist die ungehemmte neoplastische Tumorgenese mit frühzeitiger Metastasierung [201]. Auch beim primären Neuroblastom [202], dem primären Mammakarzinom [203], dem Hepatozellulären Karzinom (HCC) [204, 205] und dem Ameloblastom [206] bedingt eine verminderte SynCAM1-Expression eine schlechte Prognose bzw. ein schlechtes *outcome*.

Bei der adulten Form der T-Zell-Leukämie (ATL) hingegen scheint die erhöhte SynCAM1-Expression ein wichtiger Faktor für das Wachstum und die Metastasierungsrate der ATL-Zellen zu sein. Eine erhöhte SynCAM1 Expression ging *in vivo* mit erhöhter Tumorformation und wesentlich aggressiverer Organinfiltration und dadurch schlechterer Prognose einher [207]. Wie schon bei NCAM beschrieben, hat PolySia negativen Einfluss auf Zell-Zell Kontakte und begünstigt dadurch die Migration von Tumorzellen.

In den Hoden ist SynCAM1 für die Adhäsion von Spermatozyten und Spermatischen an Sertoli-Zellen und die damit verbundene Differenzierung zu reifen Spermien absolut notwendig [179, 208]. Männliche SynCAM1-KO-Mäuse sind infertil, ihre Hoden wiegen weniger und es können keine reifen Spermien im Samen gefunden werden [208].

In der Leber funktioniert SynCAM1 in Gallengangsepithelzellen als Adhäsionsmolekül, welches postnatal während der Gallengangsentwicklung/-formation exprimiert wird und für die richtige Entwicklung des Gallengangssystems eine entscheidende Rolle zu spielen scheint [209].

1.5.4. Eigenschaften und Bindungsverhalten

Schon die Benennung als *nectin like cell adhesion molecules* impliziert die große Ähnlichkeit zur Gruppe der Nektine. Im Gegensatz zu Nektinen können *Nec1s* allerdings kein Afadin binden [210]. Afadin ist ein Nektin und Aktin bindendes Protein, welches Nektine mit dem Aktinzytoskelet verbindet [211].

Starke und spezifische heterophile Interaktionen definieren jedes SynCAM-Mitglied [187]. SynCAM1 kann sowohl homophile als auch heterophile Verbindung mit anderen SynCAMs eingehen (s. Abb. 8). SynCAMs fungieren im PNS als Mediatoren für Axon-

Glia-Interaktionen entlang der Internodien. SynCAM3/4 Komplexe verbinden hier Schwann-Zellen und Axone miteinander. Diese heterophilen Bindungen sind sehr stabil [186, 212]. An Schmidt-Lantermann-Einkerbung hingegen finden sich ähnlich starke heterophile SynCAM1/3 Komplexe. SynCAM4 spielt bei der Myelinisierung des PNS eine Schlüsselrolle [186]. Im ZNS bildet SynCAM1 mit SynCAM2 ein starkes heterophiles Adhäsionspärchen aus, welches funktionelle Synapsen organisiert und die Neurotransmitter-Freisetzung an exzitatorischen Synapsen verstärkt. Diese Interaktion wird mittels Glykosylierung beeinflusst, was zu der Vermutung führt, dass dieser Adhäsionskomplexes durch posttranslationale Modifikation reguliert wird [187]. Ein vierter Adhäsionskomplex wird durch das SynCAM2/4-Bindungspaar gebildet [191]. SynCAM1 liegt im deglykosylierten Zustand in zwei Varianten von jeweils ~48 und ~65 kDa vor [175, 187, 213]. Die hochglykosylierte Form des Proteins kann sogar ein apparentes Molekulargewicht von über 100 kDa aufweisen [187].

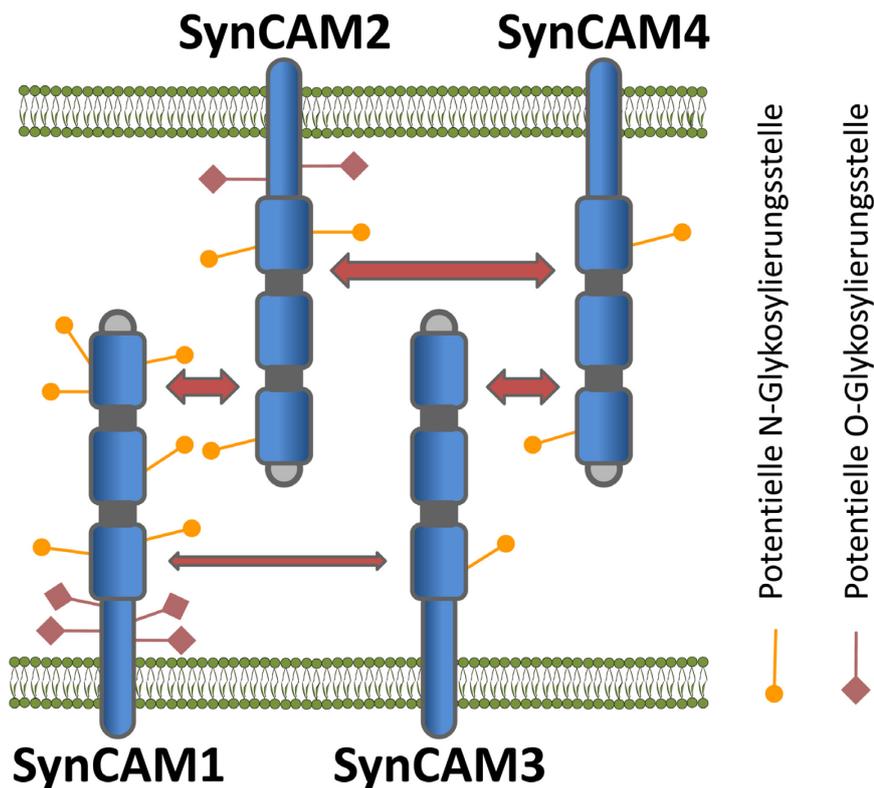


Abbildung 8: Heterophile Interaktionen der SynCAM-Familie

SynCAM 1/2-, 2/4- und 3/4-Komplexe bilden starke Adhäsionspaare aus. Der SynCAM 1/3-Komplex weist eine schwächere Bindung auf. (Darstellung modifiziert nach Fogel, A. I., et al. [187])

2. Zielsetzung

Im postnatalem Gehirn von NCAM-KO-Mäusen konnte trotz Fehlen von NCAM PolySia detektiert werden [91]. Dies bedingt, dass mindestens ein weiteres Protein während der neuronalen Entwicklung polysialyliert werden muss. Aus diesem Grund war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit die Identifizierung und detaillierte Charakterisierung eben dieses bzw. dieser bis dato unbekanntes PolySia-Trägers bzw. Träger.

Mittels Immunpräzipitation sollten alle polysialylierten Proteine aus postnatalen NCAM-KO-Gehirnen aufgereinigt werden, um sie anschließend über *Peptide mass fingerprints* identifizieren zu können. Nach erfolgreicher Identifizierung sollten die Ergebnisse der Datenbanksuche durch Antikörperfärbung gegen die gefundenen Proteine bestätigt werden. Im Anschluss an die Identifizierung war die weitere Charakterisierung geplant. Folgende Fragenstellungen waren bei der weiterführenden Charakterisierung von besonderem Interesse:

- Wie lang sind die PolySia-Ketten in NCAM-KO-Mäusen?
- Werden N- und/oder O-Glykane des polysialylierten Proteines bzw. der polysialylierten Proteine polysialyliert?
- Wo sind die polysialylierten Glykane im Protein lokalisiert?
- Kommt das Protein bzw. kommen die polysialylierten Proteine auch unter WT-Bedingungen vor?
- Wie ist das Verhältnis zwischen polysialylierter und unpolysialylierter Form?

Die erhaltenen Daten sollten dazu dienen, weitere Versuche zu dem bzw. den noch unbekanntes polysialylierten Protein(en) zu ermöglichen.

3. Material

3.1. Probenmaterial

Für diese Arbeit wurden murine Gehirne folgender Genotypen verwendet:

- NCAM^{+/+}, ST8Siall^{+/+}, ST8SiaIV^{+/+} = Wildtyp (WT)
- NCAM^{-/-}, ST8Siall^{+/+}, ST8SiaIV^{+/+} = NCAM-KO

Die Herstellung der Genotypen sowie die Genotypisierung der Mäuse wurde in der Kooperationsarbeitsgruppe von Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn in der Abteilung Zelluläre Chemie, MH Hannover durchgeführt [91]. Die schon entnommenen und im gefrorenen Zustand gelieferten Gehirne wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Protokolle für die Verwendung der Mäuse zu Forschungszwecken entsprechen dem Deutschen Tierschutzgesetz und wurden von den zuständigen Verantwortlichen bewilligt.

Für die Versuche standen 46 NCAM-KO und 12 WT Mäusegehirne zur Verfügung. Eine genaue Auflistung über das Alter der Hirne und den Genotyp zeigen die folgenden Tabellen.

Tabelle 4: WT Gehirne

Geburt	Entnahme	Anzahl	Genotyp PCR	Nr.	Mating	Genotyp Elterntiere
25.09.05	26.09.05 P2	7	6-12= P+/+, S+/+, N+/+ (4.-6.10.05)	6-12	C57B1/ 615/1	♀ P+/+, N+/+, S+/+ ♂ P+/+, N+/+, S+/+
13.10.05	14.10.05 P1/P2	5	5-9 P+/+ (8.11.05) S+/+ (12.12.05) N+/+ (16.11.05)	5-9	C57B1/ 615	♀ P+/+, N+/+, S+/+ ♂ P+/+, N+/+, S+/+

Tabelle 5: NCAM-KO-Gehirne

Geburt	Entnahme	Anzahl	Genotyp PCR	Nr.	Mating	Genotyp Elterntiere
16.01.05	17.01.05 P1/2	5	1-5= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 27.01.05) (S: 21.03.05) (N: 25.01.05)	1-5	TG4-22	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+
6/7.02.05	07.02.05 P1/P2	7	1-7= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 10.02.05) (S: 23.03.05) (N: 14.02.05; 03.03.05)	1-7	Tg4-22	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+
01.03.05	01.03.05 P1	6	1-6= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 17.03.05) (S: 21.03.05) (N: 23.03.05)	1-6	Tg4-22 6. Wurf	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+
21.04.05	21.04.05 P1	5	1-5= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 09.05.05) (S: 12.05.05) (N: 02.05.05)	1-5	Tg4-22 8. Wurf	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+
21.04.05	21.04.05 P1	6	1-6= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 09.05.05) (S: 12.05.05) (N: 02.05.05)	6-11	Tg4-28 4. Wurf	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+
10.06.05	10.06.05 P1	5	1-5= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 16.06.05) (S: 20.06.05) (N: 16.06.05)	1-5	Tg4-39 2. Wurf	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+
21.06.05	21.06.05 P1	6	1-6= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 23.06.05) (S: 27.06.05) (N: 04.07.05)	1-6	Tg4-40 3. Wurf	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+
30.10.05	31.10.05 P2	6	1-6= P-/-, N-/-, S+/+ (P: 08.11.05) (S: 12.12.05) (N: 16.11.05)	1-6	Tg4-39	♀ P-/-, N-/-, S+/+ ♂ P-/-, N-/-, S+/+

3.2. Antikörper

Primärantikörper

Maus Anti-PolySia (735)	monoklonaler Antikörper, erkennt α 2,8-verknüpfte PolySia ab einer Kettenlänge von 8 Sialinsäuren [214], AG GS Hann
Maus Anti-NCAM (H28)	monoklonaler Antikörper [215], AG GS Hann
Rabbit Anti-SynCAM1	polyklonaler Antikörper, Sigma-Aldrich
Chicken Anti-SynCAM1	monoklonaler Antikörper, MBL

Sekundärantikörper

Anti-Mouse-HRP	Dako
Anti-Rat-HRP	Dako
Goat Anti-Rabbit-HRP	Dako

3.3. Enzyme

Endoneuraminidase N (EndoN)	stammt aus einem E. coli K1 Phagen [216], AG GS Hann
PNGase F	Spaltet N-Glykane ab, Roche
Trypsin Gold	Protease, Promega

3.4. Geräte

Analysenwaagen AJ150, PB3000	Mettler Toledo
Schüttelinkubator „Belly Dancer“	Stovall
Vortexer	IKA

Magnetrührer	Hartenstein
Thermomixer	Eppendorf
Speedvac RC 10.22	Jouan
Tischzentrifuge	Eppendorf
Kühlzentrifuge „Universal 32-R“	Hettich
Ultraschallbad TK 52	Bandelin SONOREX
Ultraschallstab „Sonifier“	Branson
Netzgerät „Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL“	GE Healthcare
Elektrophoresekammer „Mini-PROTEAN 3“	Bio-Rad
Blotkammer	Kreutz Labortechnik
Kühlschrank	Bosch
-20°C Gefrierschrank	Bosch, Liebherr
-80°C Gefrierschrank	Sanyo
Blockthermostat	HLC
Eismaschine AF200	Scotsman
Microplate Reader	BIO-TEK
Reinstwasseranlage	Millipore
pH-Meter	Knick
Scanner	Brother
HPLC	Knauer
Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer mit Lifteinheit	Bruker Daltonik

3.5. Verbrauchsmaterialien

Filme	Kodak Biomax XAR film
Filterpapier „Whatman-Paper“	Schleicher & Schuell
Mikrotiterplatten	Roth

Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
Polypropylenröhrchen	Sarstedt
Polyvinylidifluorid (PVDF) –Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 0,5 ml)	Eppendorf
Zentricons (15 ml)	Millipore
Molekulargewichtsmarker „Precision Plus Protein Standard Dual Color“ [kDa] 250; 150; 100; 75; 50; 37; 25	Bio-Rad

3.6. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen.

Das im Labor verwendete Wasser wurde durch eine Elix UV5 Anlage vorgereinigt und durch die Milli-Q Synthesis A10 Anlage (Millipore) analytisch rein aufgearbeitet.

2-Mercaptoethanol	Sigma
Acrylamid „Rotiphorese“	Roth
Aprotinin	Bayer
APS	Serva
Avidin	Fluka
BCA <i>assay kit</i>	Pierce
Blockpuffer „Roti-Block“	Roth
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Sigma
Chemiluminesce „SuperSignal“	Thermo
Chloroform	Promochem
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
<i>Magnetic Beads Protein A</i>	Invitrogen
Ethanol	Merck

Glycin	Roth
Isopropanol	Merck
Iodacetamid	Fluka
Kalium	Merck
Leupeptin	Sigma
Methanol	Merck
Natriumazid	Sigma
Natrium-Deoxycholat	Merck
Natrium-Metaperjodat	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Phenylmethylsulfonylflurid (PMSF)	Sigma
Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat	Sigma
<i>ProteaseMAX Surfactant Trypsin Enhancer</i>	Promega
Salzsäure (HCl)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad
TEMED	Roth
Trifluoressigsäure (TFA)	Pierce
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Sigma

4. Methoden

4.1. Proteinanalytische Methoden

4.1.1. Aufarbeitung der Mäusegehirne

Um das gesuchte Protein aus den NCAM-KO- bzw. WT-Mäusegehirnen für Tests und Experimente zugänglich zu machen, werden die entsprechenden Mäusegehirne lysiert. Die Gehirne werden bereits fertig präpariert und gefroren geliefert, sodass sie den nun folgenden Arbeitsschritten ohne weitere Vorbereitungen zugeführt werden können.

Lysepuffer:

20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA
2,00 % (v/v)	Triton X-100
1 mM	PMSF
1 mM	Aprotinin
1 mM	Leupeptin

Die bei -80 °C gelagerten Gehirne werden einzeln in 2 ml Reaktionsgefäße übertragen und mit 1 ml gekühltem Lysepuffer versetzt. Für die HPLC-Analysen wurden die Hirne separat gewogen und lediglich in Tris/HCl (20 mM; pH=7,5) aufgenommen. In Anschluss werden die Gehirne mit dem Ultraschallstab mit 30-40 Schüben bei maximal mittlerer Stufe schonend homogenisiert. Um die Proteindenaturierung zusätzlich möglichst gering zu halten, wird eine gleichzeitige Kühlung mit Eiswasser durchgeführt. Im Anschluss werden die Lysate bei 4 °C ü.N. im Überkopfschüttler inkubiert. Die Gehirne sind nun fertig lysiert und können nach dem Abzentrifugieren (100.000 g; 1 h; 8 °C) der nicht in Lösung gebundenen Bestandteile entweder eingefroren oder direkt weiterverwendet werden.

4.1.2. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wird das *BCA assay kit* [Pierce] verwendet und nach Herstelleranweisung vorgegangen. Als Standard wird die mitgelieferte BSA-Lösung der Konzentration 2 mg/ml benutzt. Es wird eine 8-Punkt-Kalibration von 0 bis 750 µg/ml

BSA erstellt. Jeweils 25 µl der einzelnen Standards werden als Doppelbestimmung und 25µl der Proben als Dreifachbestimmung in eine 96-Wellplatte pipettiert. Danach werden 200 µl Working-Reagenz in jedes Well dazu gegeben, die Wellplatte für 30 sek geschüttelt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach kurzem Abkühlen wird die Absorption mit dem *Microplate Reader* bei 562 nm gemessen.

Mit Microsft-Excel wird eine Eichgerade erstellt und mit deren Hilfe die Konzentration der Proben berechnet.

4.1.3. SDS-Gelelektrophorese

Das Prinzip aller elektrophoretischen Protein-Trennmethodeen beruht auf der Wanderung der Proteine in einem elektrischen Feld. Die Proteine erhalten durch Zusatz der negativen Detergenz SDS alle die gleiche negative Ladung und wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Große Moleküle werden im Acrylamidnetzwerk stärker retardiert als kleine, wodurch die größenabhängige Trennung gewährleistet werden kann.

Als Trägermaterial für die Gelelektrophorese wurde Polyacrylamid in den Konzentrationen von 8,5 bzw. 10 % für das Trenngel und 4 % für das Sammelgel verwendet.

Acrylamidstammlösung	30 % Acrylamid (gebrauchsfertig von Roth)
Trenngelpuffer	36,3 g Tris-HCl / 100 ml Lösung, pH=8,8
Sammelgelpuffer:	6,0 g Tris-HCl / 100 ml Lösung, pH=6,8
SDS-Lösung	10 % SDS (w/v) (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (AMPS):	0,01 g AMPS / 100 µl H ₂ O, immer frisch ansetzen
Laufpuffer für Elektrophorese:	15 g Tris-HCl + 72 g Glycin / 5000 ml H ₂ O
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethan-1,2-diamin

Für zwei Gele mit 8,5 %igem Acrylamidgehalt werden 3,5 ml Acrylamidstammlösung, 3 ml Trenngelpuffer, 120µl 10 %ige SDS-Lösung und 5,5 ml H₂O gemischt und für 2 min im Ultraschallbad entgast.

Für zwei Gele mit 10 %igem Acrylamidgehalt werden 4,1 ml Acrylamidstammlösung, 3 ml Trenngelpuffer, 120 µl 10 %ige SDS-Lösung und 4,9 ml H₂O benutzt.

Nach dem Entgasen werden 120 µl AMPS-Lösung und 12 µl TEMED [Roth] hinzugegeben, gut vermischt und das gesamte Gemisch sofort bis zu einem Abstand von 1,5 cm zum oberen Rand zwischen die Scheiben gegossen. Anschließend wird das Gemisch mit *Aqua bidest* überschichtet und für 45 min bei RT auspolymerisieren gelassen. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert ist, wird das Wasser mit einem Filterpapier abgesaugt.

Für das Sammelgel mit 4 %igem Acrylamidgehalt werden 6,1 ml H₂O mit 1,3 ml Acrylamidstammlösung, 2,5 ml Sammelgelpuffer und 100 µl 10 %ige SDS-Lösung gemischt und 2 min. im Ultraschallbad entgast. Anschließend werden 100 µl AMPS und 10 µl TEMED dazu gegeben. Das Sammelgelgemisch wird auf das Trenngel gegossen und der Kamm für zehn Probestaschen eingesetzt. Nach einer Polymerisierungszeit von 45 min werden die Kämmen vorsichtig entfernt und die Gele in die Elektrophoresekammer gesetzt. Die innere Kammer wird bis zum Rand mit Laufpuffer befüllt, die äußere Kammer nur soweit, dass der Draht bedeckt ist. Jetzt werden mit einer 100 µl Pipette die Probestaschen mittels des in der inneren Kammer befindlichen Laufpuffer gespült und von Gelresten befreit. Die Proben werden mit zweifachem *Laemmli Sample Buffer* [BioRad] versetzt, für 10 min bei 60°C erhitzt und danach abzentrifugiert. Im Anschluss werden jeweils 10 µl Probe, sowie 5 µl des Standards pro Tasche aufgetragen. Bei Stufe 1 werden die Proben bei 50 Volt für 15 min aufgetrennt, im Anschluss wird Stufe 2 bei 150 Volt für ca. 40 min eingeschaltet.

4.1.4. Western Blot

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der im Gel getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Dieser Prozess wird als Western Blot (Immuno-Blot) bezeichnet. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf dem Filter immobilisiert werden. Unter geeigneten Bedingungen bleibt beim Transfer sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine, z.B. deren enzymatische Aktivität, bestehen. Für die Wahl des Membranmaterials stehen Nitrozellulose (NC) und Polyvinylidenfluorid (PVDF) zur Verfügung. PVDF besitzt eine sehr hohe Proteinbindekapazität, eine hohe Reißfestigkeit und zudem ein gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis mit Chemilumineszenz-Detektionssystemen. Die Proteine werden durch das Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf die Membran überführt. Der Transfer erfolgt senkrecht zur

Trennrichtung, wodurch das Muster der getrennten Proteine auf der Membran genau der des Trennmusters im Gel entspricht. Da die Proteine nach dem Transfer für die Behandlung mit verschiedenen Liganden, Antikörpern, Lectinen oder Enzymsubstraten zugänglich sind, erlaubt der Einsatz der Blotting-Technik nicht nur auf einfache Weise qualitative und quantitative Bestimmungen einzelner Proteine in einem komplexen Gemisch anderer Proteine, sondern auch deren Identifikation.

Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers gibt es mit dem Wet- bzw. Tank-Blot und dem Semi-Dry-Blot zwei Verfahren, die gleichberechtigt nebeneinander existieren. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Semi-Dry-Verfahren mit PVDF-Membran angewandt. Die Blotapparatur besteht aus zwei horizontalen, parallel zueinander liegenden Kohlenstoffelektroden.

Transferpuffer:

39 mM	Glycin
48 mM	Tris
20 % (v/v)	Methanol
1,85 % (w/v)	SDS

Zur Vorbereitung werden pro Gel vier *Whatman*-Filterpapiere in Transferpuffer eingeweicht. Die PVDF-Membran wird 2 min in 100 % Methanol und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Die Elektroden werden mit Transferpuffer befeuchtet, die Gele vorsichtig von der Glasscheibe gelöst und eine Minute in Transferpuffer inkubiert. Anschließend werden die zuvor beschriebenen Komponenten in folgender Reihenfolge geschichtet: zwei *Whatman*-Filterpapiere, PVDF-Membran, Gel und zum Abschluss erneut zwei *Whatman*-Filterpapiere. Mit einer kleinen Rolle werden mögliche Luftblasen vorsichtig ausgerollt. Nach aufsetzen des Kathodendeckels werden die Gele bei 1 mA / cm² 90 min geblottet.

Nach dem Blot wird die PVDF-Membran ü. N. bei 4 °C in Rotiblocklösung (Roth) inkubiert, danach kann sie für die Immunfärbung verwendet werden.

Zum Nachweis der Enzym-Antigene wird ein von *Hawkes et al.* entwickelter Immunoassay angewandt [217], der auf dem Einsatz von zwei verschiedenen Antikörpern beruht. Ein an den zweiten Antikörper gekoppeltes Enzym sorgt nach Zugabe des entsprechenden Substrates durch Chemilumineszenz bzw. eine Farbreaktion für die Sichtbarmachung des Antigens.

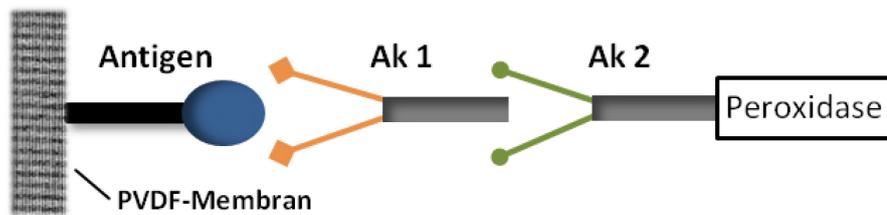


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Antikörperfärbung

Zu Beginn wird die am Vortag geblottete Membran 3 x in Roti-Block auf dem Probenschüttler für 10 min gewaschen. Die Inkubationszeiten der ersten Antikörper beträgt 2 h bei Raumtemperatur (RT) auf dem Probenschüttler, danach wird die Membran 3 x in Roti-Block für jeweils 10 min auf dem Probenschüttler gewaschen. Die Inkubationszeit der zweiten Antikörper beträgt 1 h bei RT auf dem Probenschüttler. Danach wird die Membran 2 x mit Roti-Block und 2 x mit PBS-Tween-Waschpuffer für jeweils 10 min auf dem Probenschüttler gewaschen. Das Bindevermögen der 2. Antikörper wird mit Chemilumineszenz detektiert. Hierzu wird der Blot für 5 min mit vorher frisch zubereitetem Supersignalsubstrat [Pierce, Rockford, Illinois] bedeckt, danach wird das überflüssige Substrat abgegossen und der Blot in eine aufgeklappte Polypropylenfolie gelegt. Nun wird die Membran in eine Filmentwicklerkassette gelegt und kann in der Dunkelkammer entwickelt werden. Je nach Signalintensität dauert die Belichtung zwischen 10 s und 10 min. Nach der Belichtung wird der Streifen mittels Filmentwicklerlösung entwickelt, anschließend erfolgt die Fixierung.

4.1.5. Silberfärbung

Eine sensitive Methode, welche auch geringste Proteinmengen im Gel nachweisen kann, ist die Silberfärbung. Für die Silbergefärbung werden folgende Lösungen benutzt:

Fixierlösung:

500 ml EtOH
100 ml Essigsäure (HAc)
400 ml H₂O
0,5 ml Formaldehyd (37 %)

Waschlösung:

500 ml EtOH
500 ml H₂O

Sensitivlösung:

0,1 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
500 ml H₂O

Färbelösung:

0,4 g AgNO₃
200 ml H₂O

0,15 ml Formaldehyd (37 %)

Entwicklerlösung:

0,15 g Na₂CO₃

0,001 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O

250 ml H₂O

0,125 ml Formaldehyd (37 %)

Stopplösung:

60 ml HAc

220 ml EtOH

220 ml H₂O

Die Gele werden hierzu direkt nach der Gelelektrophorese ü. N. in Fixierlösung bei RT auf dem Probenschüttler inkubiert, dann 2 x 25 min in Waschlösung gewaschen und anschließend 1 min mit der Sensitivlösung inkubiert. Anschließend wird 3 x für 20 s mit *Aqua bidest* gespült. Jetzt wird das Gel 20 min mit Färbelösung auf dem Probenschüttler inkubiert. Nach erneutem dreifachem Spülen mit *Aqua bidest* erfolgt das Entwickeln mittels Entwicklerlösung unter optischer Kontrolle (bis die Banden gut sichtbar sind). Nach 20 s Waschphase mit *Aqua bidest* wird das Gel 10 min in die Stopplösung gelegt und nachfolgend mit Wasser gewaschen.

4.1.6. Immunopräzipitation mittels *Magnetic Beads*

4.1.6.1. Antikörperkopplung an *Magnetic Beads* (MB)

Um das gesuchte Protein identifizieren zu können, muss zunächst eine Aufreinigung bzw. Isolierung durchgeführt werden. Um das Volumen möglichst klein zu halten, werden *Magnetic Beads* (Invitrogen, Carlsbad, Californien) benutzt. An die MB wird im ersten Schritt der monoklonale Antikörper (mAk) -735, welcher spezifisch an PolySia bindet, gekoppelt.

4.1.6.1.1. *Magnetic Beads* – Tosyl aktiviert (kovalent)

Hydrophobe *Magnetic Beads* sind stark magnetische einheitlich große Polymerpartikel mit einem Durchmesser von 2,8 µm, welche mit p-Toluol-sulfonyl Gruppen beschichtet sind. Die Oberfläche der Tosylgruppen ermöglicht die direkte kovalente Bindung von Proteinen oder Peptiden über primäre Amino- oder Sulphydrylgruppen (s. Abb. 10). Über diesen Mechanismus erfolgt die Kopplung von Antikörpern an die MB.

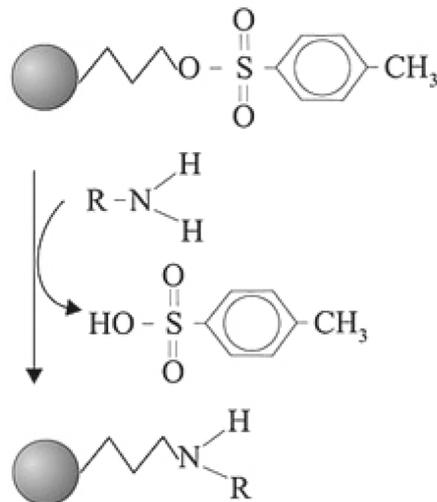


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Kopplung von *Magnetic Beads* und Antikörpern

Kopplung von 735-Ak an *Magnetic Beads*

Kopplungspuffer A: 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH = 7,4

2,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MW: 137,99)

14,42 g Na (MW: 177,99)

mit H_2O auf 1 L auffüllen

Kopplungspuffer B: 0,1 M Boratpuffer pH = 9,5

6,183 g H_3BO_3 (MW: 61,83)

In 800 ml H_2O lösen und mit 5 M NaOH auf pH = 9,5 einstellen

mit H_2O auf 1 L auffüllen

Kopplungspuffer C: PBS pH = 7,4

80 ml Kopplungspuffer A

0,88 g NaCl

100 mg BSA

mit Kopplungspuffer A auf 100 ml auffüllen

Kopplungspuffer D: 0,1 % BSA 0,2 M Tris / HCl pH = 8,5

8 ml 1 M Tris / HCl pH = 8,5

40 mg BSA

Mit H_2O auf 40 ml auffüllen

Die Antikörper werden auf die entsprechende Konzentration ankonzentriert und in Kopplungspuffer C gelöst. Um die Anti-PolySia-Ak (735) an die *Magnetic Beads* koppeln zu können, müssen sie zuerst in Kopplungspuffer B (K-Puffer B) überführt werden. Dieser Vorgang erfolgt mittels 3,5 kD Dialyseeinheiten. Die Antikörper werden 5 h bei RT dialysiert. Jetzt wird die gewünschte Menge an MB in ein für die Menge entsprechendes *Lowbind*-Reaktionsgefäß (500-2000 µl) überführt. Mit einem passenden Magneten werden die MB an den Rand des Reaktionsgefäßes gezogen und die Flüssigkeit mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Im Anschluss werden die *Magnetic Beads* mittels des Antikörpergemisches möglichst schnell resuspendiert. Das Gesamtgemisch wird nun bei 37 °C im Drehschüttler für 24 h inkubiert, um eine maximale Kopplung von Antikörpern und MB zu erreichen. Anschließend wird 2 x mit K-Puffer C für 5 min bei RT schüttelnd gewaschen. Um die eventuell nicht besetzten Tosylgruppen zu blockieren, werden die MB bei 37 °C in K-Puffer D 4 h über Kopf schüttelnd gereinigt. Nach Blockung wird erneut 2 x mit K-Puffer C wie oben beschrieben gewaschen. Zur Lagerung werden die MB in K-Puffer C gegeben. Bei längerer Lagerung wird 0,02 % Natriumazid dazugegeben, um einer möglichen Pilz- oder Bakterienbesiedlung vorzubeugen.

4.1.6.1.2. *Magnetic Beads* – Protein A

Die Protein A gekoppelten *Magnetic Beads* (*Dynabeads Protein A, Invitrogen*) sind magnetische Partikel, an welche ein Protein der Größe 40-60 kDa gekoppelt ist. Dieses Protein stammt ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* und ist in der Lage Immunglobuline durch Interaktion mit der schweren Kette zu binden. An dieses Protein A wurde der entsprechende SynCAM1-Antikörper gebunden und der Komplex mit dem Gewebelysat inkubiert.

Kopplung von SynCAM1-Ak an *Magnetic Beads*

Waschpuffer 1:

20 mM	Tris/HCl pH=8,0
150 mM	NaCl
0,5 % (v/v)	Triton-X-100

Waschpuffer 2:

20 mM	Tris/HCl pH=8,0
150 mM	NaCl

Eluierpuffer:

100 mM	Triethylamin
150 mM	NaCl

Vor dem erstmaligen Gebrauch werden die MB im Originalgefäß resuspendiert. 50 µl davon werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Anlagerung an den Magneten kann der Überstand entnommen werden. Die MB werden je 2 x mit Waschpuffer 1 und 2 x mit Waschpuffer 2 gewaschen. Die gereinigten MB werden im Anschluss in 90 µl Waschpuffer 2 resuspendiert, 10 µl unverdünnte Antikörperlösung hinzugefügt und unter Rotation für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgt die Wiederholung der vorgenannten Waschprozedur.

4.1.6.2. Immunpräzipitation (IP) mit *Magnetic Beads* – Tosyl aktiviert

Dieser Schritt dient der Isolation des gesuchten polysialylierten Proteins aus dem Gesamtgehirnlysat.

Allgemein ist eine Immunpräzipitation eine bioanalytische Methode zur Isolation eines bestimmten Antigens aus einer Vielzahl von sich in Lösung befindlichen Antigenen. Dieses Antigen kann ein Protein oder ein Peptid sein. In der Regel ist der Antikörper dabei *in vitro* an ein festes Substrat gekoppelt und bindet über seine Affinität an ein bestimmtes Antigen.

Die Immunpräzipitationen in dieser Arbeit wurden ausschließlich mit *Magnetic Beads* (siehe vorheriger Abschnitt) durchgeführt. Für die Isolation wird das Gehirnlysat zu den MB dazugegeben, damit die mit Antikörper beschichteten MB polysialylierte Glykoproteine binden können. Mit Hilfe eines Magneten können dann die MB, welche das gesuchte Protein gebunden haben, vom Restlysat getrennt werden.

Waschpuffer 1:

20 mM	Tris/HCl pH=8,0
150 mM	NaCl
0,5 % (v/v)	NP40

Waschpuffer 2:

20 mM	Tris/HCl pH=8,0
150 mM	NaCl

Eluierpuffer:

100 mM	Triethylamin
150 mM	NaCl

Die hier beschriebene Methode wurde überwiegend jeweils mit 10 NCAM-KO-Gehirnen durchgeführt. Im Falle einer Immunpräzipitation mit mehr oder weniger Hirnen wurde analog verfahren.

Die 10 NCAM-KO-Gehirne werden nach vorhergehendem Protokoll lysiert und ü. N. bei 4 °C im Drehschüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden die 10 Hirne bei 4 °C und 100.000 g für 1 h zentrifugiert. Folgend werden alle 10 Überstände zusammen in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach dem Vertexen werden 50 µl als Probe "D0" entnommen.

Die zuvor 2 x in Waschpuffer B gelösten MB werden zu den ca. 10,5 ml Lysat gegeben und das Gemisch ü. N. bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert.

Die Volumina eines jeden Arbeitsschrittes werden in separaten Reaktionsgefäßen (15 ml) aufbewahrt. Dies gewährleistet eine optimale Qualitätskontrolle. Hierzu werden die Reaktionsgefäße nach dem aufgeführten Schema vorbereitet:

Tabelle 6: Reaktionsgefäß-Schema für die Immunpräzipitation

Proben-Nr.	Beschriftung	Volumen
1	Lysat (n x IP)	Gesamtes Lysat
2	D1 Datum, 1. WP-1	9,0 ml
3	D1 Datum, 1. WP-2	9,0 ml
4	D1 Datum, 1. WP-3	9,0 ml
5	D1 Datum, 2. WP-1	9,0 ml
6	D1 Datum, 2. WP-2	9,0 ml
7	D1 Datum, 2. WP-3	9,0 ml
8	Datum, Eluat 1	1,8 ml in 2 ml RG
9	Datum, Eluat 2	1,8 ml in 2 ml RG
10	Datum, Eluat 1	50 µl in 500 µl RG
11	Datum, Eluat 2	50 µl in 500 µl RG
12	Waschen	2 x WP 2 zum säubern der MB
13	D1 Datum, 1. WP-1	50 µl in 500 µl RG
14	D1 Datum, 1. WP-2	50 µl in 500 µl RG

Anschließend folgt der erste Waschzyklus. Das Lysat wird mit Hilfe des Magneten in das Lysat-Reaktionsgefäß überführt. Nun werden die MB 3 x mit 9 ml Waschpuffer 1 vorsichtig gewaschen. Schaumbildung ist zu vermeiden. Die jeweiligen Waschreste werden in den Reaktionsgefäßen Nr. 2-4 aufbewahrt. Auch von diesen Proben werden jeweils 50 µl abgenommen und in die Reaktionsgefäße 13 und 14 gegeben.

Im Anschluss wird ein zweites Mal gewaschen. Der Ablauf ist mit dem ersten Waschzyklus nahezu identisch, einziger Unterschied ist, dass anstelle von Waschpuffer 1 jetzt Waschpuffer 2 benutzt wird. Die Waschreste werden in den Reaktionsgefäßen 5-7 aufbewahrt.

Die an die MB gebundenen Proteine können dann eluiert, d.h. von den MB gelöst werden. Hierzu werden 1,8 ml Eluierpuffer zu den MB pipettiert, behutsam geschüttelt und das Protein enthaltende Eluat in Reaktionsgefäß Nr. 8 (zuvor mit 200 µl 1 M Tris/HCl pH = 8,0 befüllt) gegeben. Erneut werden 50 µl zur Überprüfung abpipettiert und in Reaktionsgefäß Nr. 10 aufbewahrt. Um sicher zu sein, dass sich alle Proteine gelöst haben, folgt ein zweiter Eluivorgang.

Um die MB von dem basischen und damit schädigenden Triethylaminpuffer zu reinigen, folgt ein dritter Waschschrift, bei dem die MB 2 x mit 9 ml Waschpuffer 2 gewaschen werden. Hierdurch werden sie regeneriert.

Folgt eine erneute Aufreinigung von polysialylierten Proteinen, so wird das Lysat aus dem Lysat-Reaktionsgefäß wieder zu den MB pipettiert und ü. N. im Drehschüttler bei 4 °C inkubiert. Die Testproben, die Eluate und die Waschpuffer werden mit Stickstoff eingefroren und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

Insgesamt werden die MB 3 x an das Hirnlysat, welches aus 2 x 10 und 1 x 15 Mäusegehirnen besteht, gekoppelt. Dieser Prozess dauert von der Vorbereitung der Hirne bis zum 4. Eluivorgang jeweils 4 Tage.

Nach der durchgeführten Immunpräzipitation folgt die Überprüfung und weitere Verwertung der eluierten Proteine mittels Gelelektrophorese, Western Blot, Silbergel und Massenspektrometrie.

4.1.6.3. Immunpräzipitation (IP) mit *Magnetic Beads* – Protein A

Nach der Kopplung der SynCAM1-Antikörper wird der resultierende MB-Protein-A-Antikörper-Komplex mit dem vorbereiteten Gewebelysat für mindestens 1 h inkubiert.

Nach den Waschschriften erfolgt die abschließende Eluierung, bei der Antigen und Antikörper von den MB getrennt werden. Der Eluierpuffer hat dabei ebenfalls einen basischen Charakter, der die reversible Bindung, sowohl des Antikörpers als auch des

Antigens löst. Das gewonnene Eluat wird auf Reaktionsgefäße verteilt, mit Stickstoff versetzt und in der *speedvac* trocken gezogen.

4.1.6.4. Ankonzentrierung der immunpräzipitierten Gehirnlysate

Durch den nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritt werden die Eluate gepoolt und das gesuchte Protein ankonzentriert. Es werden 15 ml Zentricons mit einer Filtergröße von 10 kD verwendet.

Als Vorbereitung werden die Eluate bei 4 °C im Wasserbad aufgetaut und zwei Zentricons werden mit 14 ml Tris / HCl-Puffer (50 mM; pH=8,0) bei 4000 x g und 4 °C vorzentrifugiert.

Die Zentricons werden nun mit den Eluaten befüllt. Dabei ist darauf zu achten, dass maximal jeweils 14 ml in das Zentricon gefüllt werden. Die Zentricons werden solange bei 3500 x g und 4 °C zentrifugiert bis nur noch ca. 200 µl im Zentricon verbleiben. Nach jedem Lauf werden die Zentricons mit Tris/HCL-Puffer auf 14 ml aufgefüllt.

Direkt im Anschluss werden die resultierenden Proben kurz gevirlt, in Reaktionsgefäße pipettiert, danach mit Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2. Enzymverdau

4.2.1. Abspaltung von PolySia mittels Endoneuraminidase N

Endoneuraminidase N (EndoN) ist ein Enzym, das hochspezifisch Polysialinsäuren degradiert [216]. Hierdurch lässt sich zum einen überprüfen, ob der PolySia-Antikörper 735 spezifisch an PolySia bindet (Negativkontrolle), zum anderen lässt sich aber auch die Größe von Proteinen durch die Abspaltung der Zuckerreste in der anschließenden Gelelektrophorese genauer bestimmen, da nun die langen heterogenen Polysialinketten das Molekulargewicht nicht mehr beeinflussen. Um das Gehirnlysate mit EndoN zu verdauen, werden zu jeweils 100 µl Probe je 2 µl EndoN gegeben und das Gemisch ü. N. bei 8 °C im Schüttler inkubiert. Nach dem Verdau kann die Probe für weitere Analysen direkt weiterverwendet werden.

4.2.2. Enzymatische Freisetzung von N-Glykanen durch PNGaseF

Um herauszufinden, ob die Polysialinsäuren an N-Glykanen oder O-Glykanen gebunden sind, wird das gesuchte Protein mit PNGaseF behandelt. Die Freisetzung von N-Glykanen unter Erhalt des reduzierenden Endes kann sowohl enzymatisch als auch auf chemischem Wege erfolgen. Für die enzymatische Abspaltung werden die beiden N-Glykosidasen PNGaseF und A verwendet, die als rekombinante Enzyme

kommerziell erhältlich sind. Zur chemischen Freisetzung von N-Glykanen wird die Hydrazinolyse angewendet.

In dieser Arbeit wird ausschließlich PNGaseF für die Freisetzung verwendet. Damit das Enzym arbeiten kann, muss die Probe in Natrium-Phosphat-Puffer vorliegen. Dies kann erreicht werden, indem die ursprüngliche Probe lyophilisiert und anschließend in Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM) aufgenommen wird. Bei einem Volumen von 50 μ l werden dann 5 μ l Denaturierungspuffer dazu pipettiert und das ganze 10 min bei 100 °C gekocht. Anschließend werden 5,5 μ l 10 %iges NP40 dazugegeben und die Probe abgekühlt. Zuletzt werden 10 μ l PNGaseF (Roche), dies entspricht 5000 Units, dazu pipettiert und ü. N. bei 37 °C im Drehschüttler inkubiert. Zuletzt erfolgt die Zip-Tip Aufreinigung, dann können die Proben weiterverwendet werden.

4.2.3. Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

Für den In-Gel-Verdau werden käufliche Gele benutzt (10%; BioRad). Der tryptische Verdau muss je nach Größe des Gelstückes angepasst werden.

Nach der Elektrophorese wird der gewünschte Bereich aus dem Gel mit Hilfe eines Skalpell's ausgeschnitten, in ein mit 100 μ l *Aqua bidest* gefülltes LoBind-Reaktionsgefäß überführt und 10 min unter Schütteln gewaschen. Das Wasser wird ausgetauscht und der Vorgang wiederholt. Am Ende wird das Wasser abpipettiert.

Waschvorgang:

Zu dem Gelstück werden 100 μ l 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer und ACN in einem Verhältnis von 1:1 gegeben und das Gemisch 15 min bei RT geschüttelt. Danach wird der Überstand abgenommen, das Gel mit 50 μ l Acetonitril (AcN) bedeckt und für 1 min geschrumpft. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das Gel mit 50 μ l NH_4HCO_3 -Puffer rehydriert. Nach 5 min werden 50 μ l AcN zugegeben, 15 min inkubiert und der Überstand abgenommen. Der letzte beschriebene Zyklus wird noch einmal wiederholt, dann wird das Gelstück wieder mit AcN geschrumpft, der Überstand abgenommen und das Gel in der SpeedVac getrocknet.

Reduktion und Alkylierung:

Das Gelstück wird nun mit 50 μ l DTT (10 mM in 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer) 30 min bei RT inkubiert, der Überstand abgenommen und sofort mit 50 μ l Jodacetamid (55 mM in

50 mM NH_4HCO_3 -Puffer) bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wird der Überstand abgenommen und mit 100 μl 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer unter Schütteln für 15 min gewaschen. Der Überstand wird abgenommen und 100 μl 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer und AcN in einem Verhältnis von 1:1 zugegeben. Erneut wird 15 min unter Schütteln gewaschen, danach wird das Gel mit 50 μl AcN bedeckt, 1 min geschrumpft, der Überstand abpipettiert und anschließend in der SpeedVac getrocknet.

Verdau nach Promega mittels *ProteaseMAX Surfactant Trypsin Enhancer*:

Für den Verdau der eluierten und ankonzentrierten Proteine wird *ProteaseMAX Surfactant Trypsin Enhancer* (Promega) benutzt. *ProteaseMAX Surfactant* löst Proteine und ermöglicht einen verbesserten Verdau mit Proteasen wie Trypsin oder Chymotrypsin. Für den In-Gel Verdau verbessert *ProteaseMAX Surfactant* zusätzlich die Ausbeute von Peptiden. Besonders lange Peptide, die unter normalen Bedingungen in der Gelmatrix gehalten würden, lösen sich nun besser.

Die Funktion von *ProteaseMAX Surfactant* beruht auf dem Prinzip, dass die Proteinspaltstellen für die Proteasen besser zugänglich gemacht werden, welche durch Proteinfaltung normalerweise schlecht erreichbar sind. Hierdurch kann die normale Verdauzeit bei Trypsin von 12 h auf 3 h reduziert werden.

Zu dem getrockneten Gelstück werden 20 μl Trypsin (12 ng / μl) in 0,025 % *ProteaseMAX Surfactant* / 50 mM NH_4HCO_3 pipettiert und das Gel für 10 min rehydriert. Danach wird das Ganze mit 10 μl 0,025 % *ProteaseMAX Surfactant* / 50 mM NH_4HCO_3 überschichtet und 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Verdau wird das LoBind-Reaktionsgefäß 10 s zentrifugiert, um mögliches Kondensat von den Wänden zu lösen. Nun werden 10 μl 0,01 % *ProteaseMAX Surfactant* in NANOpure Wasser dazugegeben und die Peptide bei mittlerer Vortexgeschwindigkeit 5 min lang extrahiert. Die so extrahierten Peptide werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem verbliebenen Gelstück werden 20 μl 0,01 % *ProteaseMAX Surfactant* / 1 % TFA gegeben und der Extraktionsvorgang wie zuvor beschrieben wiederholt. Die so extrahierten Peptide werden zu denen aus der ersten Extraktion dazupipettiert und für 2 min bei RT inkubiert.

Peptid-Entsalzung:

Um die Menge an Degradierungsprodukten zu reduzieren, wird eine Aufreinigung mittels 10 μl Zip-Tip Pipettenspitzen (Omnix), beschichtet mit C-18 Material, durchgeführt.

Zuerst werden die Zip-Tips nach folgendem Protokoll gereinigt:

3 x 80 % AcN

3 x 60 % AcN

3 x 40 % AcN

10 x 0,1 % TFA

Jetzt wird die Probe nach dem folgenden Protokoll langsam 10 x aspiriert und extrahiert, dann kurz gevirlt. Dieser Vorgang wird 4 x wiederholt. Um überschüssiges Salz und Verunreinigungen zu entfernen, werden 10 x 0,1 % TFA aspiriert und in das anfängliche Probenreaktionsgefäß gegeben. Das Eluieren wird wie folgt durchgeführt:

1 x 40 % AcN

1 x 60 % AcN

1 x 80 % AcN

Diese insgesamt ca. 30 µl Volumen werden in einem neuen LoBind-Reaktionsgefäß gesammelt, gevertext, kurz anzentrifugiert und möglichst schnell auf das Target aufgetragen.

4.2.4. Tryptischer Verdau von gelösten Proteinen

Der tryptische Verdau gelöster Proteine dient der Probenaufbereitung für massenspektroskopische Untersuchungen. Die entsprechende Probe sollte in NH_4HCO_3 -Puffer gelöst sein (100 mM; pH = 8,0). In den folgenden Schritten wird jeweils immer das Ausgangsvolumen der Probe von den entsprechenden Lösungen dazugegeben.

Zuerst erfolgt die Carbamidomethylierung, bei 50 µl Probenvolumen werden entsprechend der Volumenäquivalenz 50 µl DTT (10 mM in 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer) dazu pipettiert und 30 min bei 50 °C inkubiert. Im Anschluss werden 50 µl Iodacetamid (45 mM in 50 mM NH_4HCO_3 -Puffer) dazugegeben und im Dunkeln bei 18°C für 30 min inkubiert. Für den Verdau wird dann das Trypsin (ca. 1:1000) zur Probe dazu pipettiert und ü.N. inkubiert. Am nächsten Tag wird der Verdau dann mittels 2,3 µl PMSF für 1 h bei 37 °C abgestoppt. Der tryptische Verdau ist abgeschlossen, die Probe kann nun der massenspektroskopischen Untersuchung zugeführt werden.

4.3. Massenspektrometrie

4.3.1. MALDI-TOF-MS (/MS) Analysen

Die Massenspektrometrischen Analysen wurden mit einem Ultraflex TOF Massenspektrometer (Bruker-Daltonik, Bremen, Deutschland), ausgestattet mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS Einheit, durchgeführt. Das Massenspektrometer wurde im positiven Reflektormodus betrieben, Fragmentanalysen mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) wurden nach Laser-induzierter Ionisation (LID) ausgeführt.

Als Software wurde FlexControl Version 3.0 von Bruker Daltonics benutzt. Die externe Kalibrierung erfolgte mittels eines Peptid-Kalibrierungsstandards (Bruker-Daltonik).

Für die Messungen wurden 1 µl entsalzene Peptide aus dem In-Gel Verdau auf ein vorgespottetes Anchorchip Target (PAC, Bruker-Daltonik) aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde der Spot mit 10 µl 20 mM Ammoniumphosphatpuffer / 0,1 % TFA gewaschen. Die isolierten polysialylierten Glykopeptide wurden auf ein Stainless Steel Target in 1 µl Wasser gemischt und mit 1 µl Matrix (10 mg / ml 2,5-Dihydroxybenzolsäure in 50 % ACN, 1 % O-Phosphorsäure) jeweils vor und nach Deglykosylierung mit PNGaseF aufgetragen.

Insgesamt wurden in den positiven MS und MS/MS Modi zwischen 500 und 5000 Schüsse aufaddiert.

4.3.2. Auswertung und Datenbanksuche

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde die Software FlexAnalysis 3.0 von Bruker Daltonik benutzt. Hier wurden die detektierten Signale annotiert.

Für die Suche der Peptid-Fingerprints wurden die MALDI-MS(/MS) Daten über die Mascot data search (MSDS) database (200608313239079 Sequenzen) mit Hilfe des Mascot Programmes (<http://www.matrixscience.com>) bei folgenden Einstellungen benutzt: Begrenzung auf *mus musculus*; Peptidmassentoleranz 25 ppm; bis zu eine fehlerhafte Spaltung erlaubt; als feste Modifikation wird berücksichtigt: Cysteine Carbamidomethylierung; als variable Modifikation wird berücksichtigt: Methionine Oxidation.

Für die Identifikation der polysialylierten N-Glykosylierungsstellen wurde die Massentoleranz auf 15 ppm erniedrigt und potentielle Deaminierungen von Asparagin und Glutamin als erlaubte Modifikationen eingestellt.

4.4. High Pressure Liquid Chromatography

α -Ketocarbonsäuren können durch 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol (DMB) fluoreszenzmarkiert und anschließend mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) detektiert werden. In einer Eintopfreaktion werden Oligo- und PolySia-Ketten unter sauren Bedingungen vom Glykokonjugat abgespalten und im Anschluss mittels DMB das reduzierende Ende markiert. Die resultierenden DMB-markierten Oligo- und PolySia-Ketten werden anschließend nach Anzahl der Sialinsäuren mittels Anionenaustauscher-Chromatographie aufgetrennt. Hierdurch kann nicht nur die Anwesenheit von Oligo- und PolySia nachgewiesen, sondern auch eine Aussage über die Länge der Ketten gemacht werden. Unvermeidlich ist bei dieser Methode jedoch die teilweise auftretende hydrolytische Spaltung interner Sialylverbindungen, die aufgrund der sauren Bedingungen erfolgt.

4.4.1. Kettenlängen- / Gesamt-PolySia-Bestimmung

DMB-Puffer:

9 mM	Na-Hydrogensulfit
500 mM	Mercaptoethanol
20 mM	TFA
+1,2 mg	DMB / ml DMB-Puffer

Zur Vorbereitung werden jeweils ein WT- bzw. NCAM-KO-Gehirn abgewogen und 500 μ l 20 mM Tris/HCl (pH=7,5) dazugegeben. Die Gehirne werden nun mit der Ultraschallsonde homogenisiert. Jetzt werden die Konzentrationen durch Zupipettieren von Lysepuffer angepasst. Im Anschluss erfolgt eine Chloroform-Methanol-Extraktion, durch die Lipide und wässrige Bestandteile entfernt werden können. Hierzu werden 1000 μ l Chloroform-MeOH (1:2) zu jedem Gehirnlisat gegeben, das Gemisch geschüttelt und bei 14000 rpm bei 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Es bildet sich ein Proteinpellet, der Über- und Unterstand wird abpipettiert. Nun werden 500 μ l Wasser dazugegeben und das Pellet wird mittels Ultraschallsonde rehomogenisiert. Im Anschluss erfolgt eine erneute Zugabe von Chloroform-MeOH (1:2), es schließt sich eine erneute Abzentrifugation an (14000 rpm, 4 °C, 20 min). Der Über- und Unterstand wird abermals abpipettiert. Es werden 500 μ l EtOH (80 %) zum Pellet hinzugegeben und dieses mit dem Ultraschallstab homogenisiert. Das Gemisch wird nun in der Speedvac lyophilisiert. Wenn die Probe trocken ist, werden 120 μ l DMB-Puffer und 120 μ l Tris / HCl (20 mM, pH=8,0) dazugegeben und bei 4°C für 48 h im Schüttler

inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird die Reaktion für 20 min abgedunkelt, im Anschluss mit 60 µl NaOH (1 N) abgestoppt. Hiernach wird die Probe abzentrifugiert (14000 rpm, 30 min). Der Überstand kann nun mittels HPLC gemessen werden. Das HPLC-System ist mit einer DNAPac PA-100 Säule ausgestattet, der Fluoreszenzdetektor ist auf 372 nm Extinktion und 456 nm Emission eingestellt. MilliQ-Wasser und 4 M Ammoniumazetat (E2) werden als Eluat in folgenden Gradienten-Konzentrationen verwendet:

$T_{0\text{min}}=0\%$ (v/v) E2; $T_{15\text{min}}=8\%$ (v/v) E2; $T_{40\text{min}}=12\%$ (v/v) E2; $T_{160\text{min}}=23\%$ (v/v) E2. Die Säule wurde mit 100 % (v/v) E2 für 10 min gewaschen. Der Standard wurde aus einer 10 µg / ml Colominsäure-Standardlösung 1:400 in einem DMB-Tris/HCl Gemisch (v/v) verdünnt.

5. Ergebnisse

5.1. Proteinbestimmung

Für vergleichende Analysen zwischen WT- und NCAM-KO-Mäusen musste die Proteinkonzentration der Proteinextrakte ermittelt werden. Durch die Bestimmung und die anschließende Anpassung der Konzentrationen konnten identische Proteinkonzentrationen für SDS-Gelelektrophoresen verwendet werden. Durch diesen Schritt können die erhaltenen Ergebnisse in Beziehung zum WT gesetzt und mit diesem verglichen werden. Für die Bestimmung wurden die gefrorenen Mäusegehirne mit Lysepuffer versetzt und mit der Ultraschallsonde bei Kühlung homogenisiert. Abschließend wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Mittels *BCA assay kit* wurden die Konzentrationen des Standards und der Proben im *Micro Plate Reader* bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anschließend per Standardreihe berechnet (siehe Abb. 11).

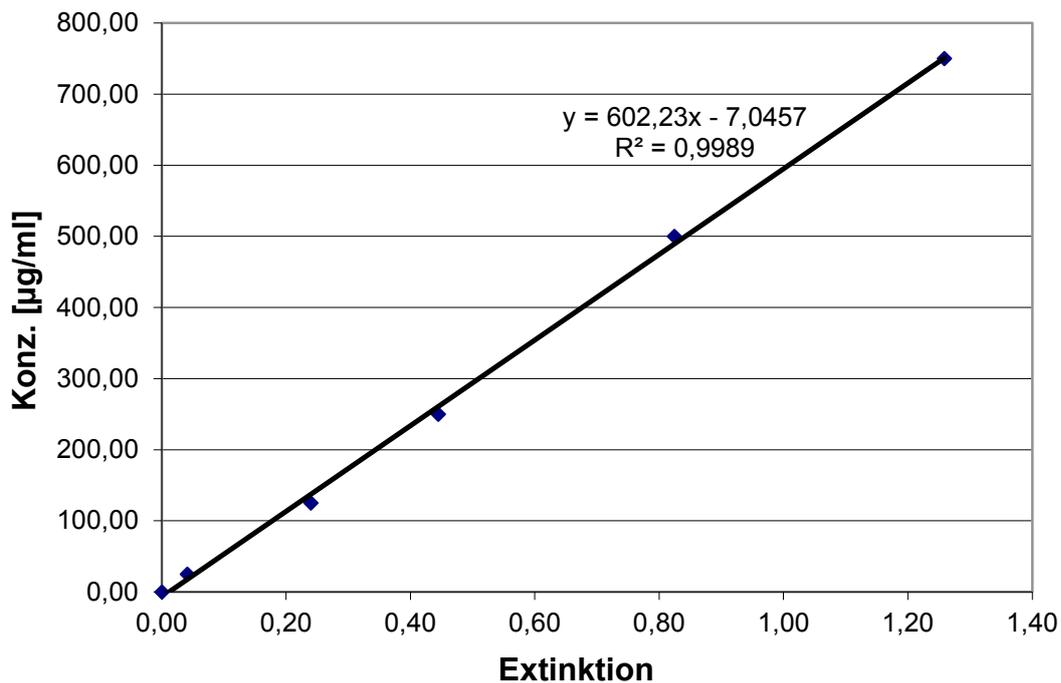


Abbildung 11: Beispiel einer Kalibriergrade zur Bestimmung der Proteinkonzentration

5.2. Nachweis von PolySia in NCAM-KO-Mäusen

Mittels eines Anti-PolySia-Antikörpers konnten schon *Cremer et al.* sehr geringe Mengen von PolySia im Gehirn von NCAM-KO-Mäusen nachweisen [91]. Der erste Schritt dieser Doktorarbeit bestand in der Bestätigung dieses Ergebnis und der Überprüfung, ob sich auch in unseren NCAM-KO-Mäusegehirnen PolySia nachweisen lässt. Zudem sollte zur Absicherung gezeigt werden, dass die NCAM-KO-Mäusegehirne kein NCAM enthalten.

Zu diesem Zweck wurden je ein WT- und NCAM-KO-Gehirn mit Lysepuffer versetzt und nach Protokoll mittels Ultraschallsonde homogenisiert. Die Proben wurden danach geteilt und jeweils eine mit Endoneuraminidase N (EndoN) versetzt. EndoN degradiert α 2,8-verknüpfte PolySia, sodass Ketten von maximal sieben Sialinsäuren entstehen [218]. Der verwendete Antikörper gegen PolySia mAk 735 benötigt eine minimale Sialinsäurekettenlänge von acht Sialinsäureresten um binden zu können. Folglich kann er nach EndoN-Behandlung keine PolySia mehr detektieren. Dieser Schritt dient als Negativkontrolle. Er soll zeigen, dass der verwendete Anti-PolySia-Antikörper spezifisch an PolySia bindet.

Jeweils 10 μ l Probe wurden pro Tasche aufgetragen. Aufgrund des anzunehmenden großen Mengenunterschiedes von PolySia im WT und der NCAM-KO-Maus wurde die WT Probe 1:10 verdünnt. Daraus resultiert eine effektive Menge an Gehirnlisat pro Bande von 4 μ g beim WT und 40 μ g bei der NCAM-KO-Maus. Dieses Vorgehen vereinfacht die Entwicklungsprozedur durch Vermeidung einer zu starken Überbelichtung des WT. Nach der Elektrophorese erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran, welche anschließend mit dem PolySia spezifischen Antikörper 735 aus der Maus gefärbt wurde. Dieser mAk 735 wurde anschließend von einem Meererrich-Peroxidase gekoppelten Anti-Maus Sekundärantikörper aus der Ziege erkannt und mit Chemilumineszenz-Detektion entwickelt.

Der Western Blot in Abbildung 12 zeigt eindeutig die Existenz von PolySia im Gehirn von NCAM-KO-Mäusen und bestätigte die bereits bestehenden Ergebnisse [91]. Trotz der 10-fachen Verdünnung des WT zeigt sich eine deutliche Mehrbelichtung der WT Bande im Vergleich zur NCAM-KO-Bande. Beim WT liegt die signalgebende Bande zwischen 200 und 260 kDa. Diese relativ undeutliche und diffuse Bande resultiert aus den zwei unterschiedlich stark polysialylierten Isoformen NCAM-140 und -180 und ist typisch für polysialylierte Proteine, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Im Gegensatz zum WT zeigt sich bei der NCAM-KO-Maus eine Bande bei 100 - 120 kDa. Auch diese Bande ist verhältnismäßig diffus, was auf eine unterschiedliche Polysialylierung des gesuchten Proteins hindeutet. Beide Signale waren nicht

mehr erkennbar nachdem PolySia mittels EndoN degradiert wurde. Dies zeigt, dass das Immunsignal spezifisch war.

Durch den Western Blot in Abbildung 13 konnte bestätigt werden, dass in den gelieferten NCAM-KO-Gehirnen kein NCAM exprimiert wurde. Die Banden der NCAM-KO-Maus zeigten weder vor noch nach der Behandlung mit EndoN ein Signal.

Im Gegensatz hierzu finden sich beim WT deutliche signalgebende Banden. Ohne EndoN stellt sich ähnlich wie in Abbildung 12 nur eine Bande dar. Sie zeigt die beiden unterschiedlich stark polysialylierten Isoformen NCAM-140 und -180. Nach EndoN-Behandlung sind zwei scharfe Banden bei ~140 und ~180 kDa zu erkennen. Diese entsprechen den unpolysialylierten Isoformen NCAM-140 und -180.

Durch diese zwei Western Blots konnte somit die Existenz von PolySia in der NCAM-KO-Maus bestätigt werden. Zudem wurde gezeigt, dass die untersuchten Genotypen kein NCAM exprimieren.

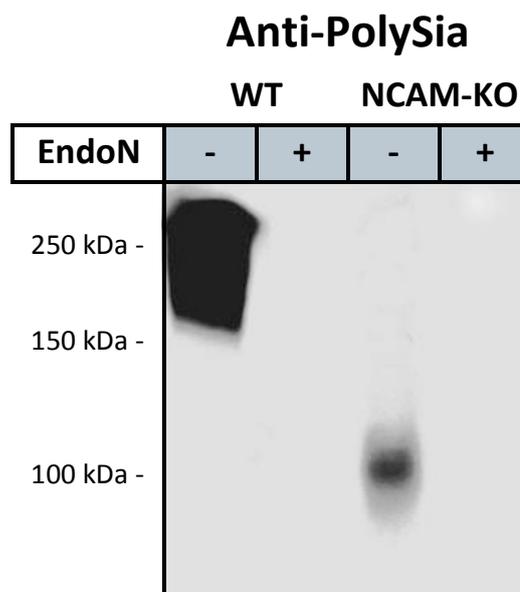


Abbildung 12: SDS-Gel und Western Blot von Wildtyp- (WT) und NCAM-KO-Mäuse-gehirnen

Der Anti-PolySia-mAk 735 zeigt PolySia als breite diffuse hochmolekulare Bande. Die Gehirne wurden mit und ohne (+/-) EndoN behandelt.

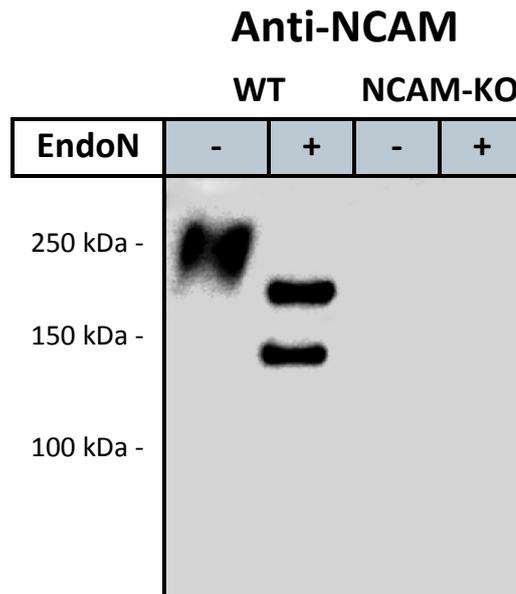


Abbildung 13: SDS-Gel und Western Blot von Wild-Typ- (WT) und NCAM-KO-Mäuse-gehirnen

Der Anti-NCAM-mAk H28 zeigt, dass bei der NCAM-KO-Maus kein NCAM vorhanden ist. Die Gehirne wurden mit und ohne (+/-) EndoN behandelt.

5.3. Charakterisierung der PolySia in NCAM-KO-Mäusen

Nachdem gezeigt wurde, dass auch in NCAM-KO-Mäusen PolySia synthetisiert wird, sollten weitere Analysen durchgeführt werden. Es sollte zum einen bestimmt werden, wieviel PolySia im Gehirn von NCAM-KO- im Vergleich zu WT-Mäusen gebildet wird und zum anderen herausgefunden werden, wie lang die synthetisierten PolySia-Ketten sind.

Für die Klärung dieser Fragen wurde die „milde“ DMB-HPLC Methode eingesetzt. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass sich diese Methode sehr gut zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung von PolySia eignet [23, 149, 219].

Für die Analyse wurden die mittels Chloroform-Methanol-Extraktion entfetteten Gehirnhomogenate der WT- und NCAM-KO-Gehirne mit DMB-Puffer versetzt und die freigesetzten und fluoreszenzmarkierten PolySia-Ketten mittels Anionenaustauschchromatographie nach der Länge der Sialinsäureketten aufgetrennt. Für die quantitative Bestimmung der Menge an PolySia wurden 9 % des Gesamtgehirnhomogenates eines Gehirnes, dies entspricht 7 mg Gehirngewebe, injiziert. Um die maximale detektierbare Kettenlänge zu bestimmen, wurden 86 % des Aliquots, dies entspricht 69 mg Gehirngewebe, verwendet.

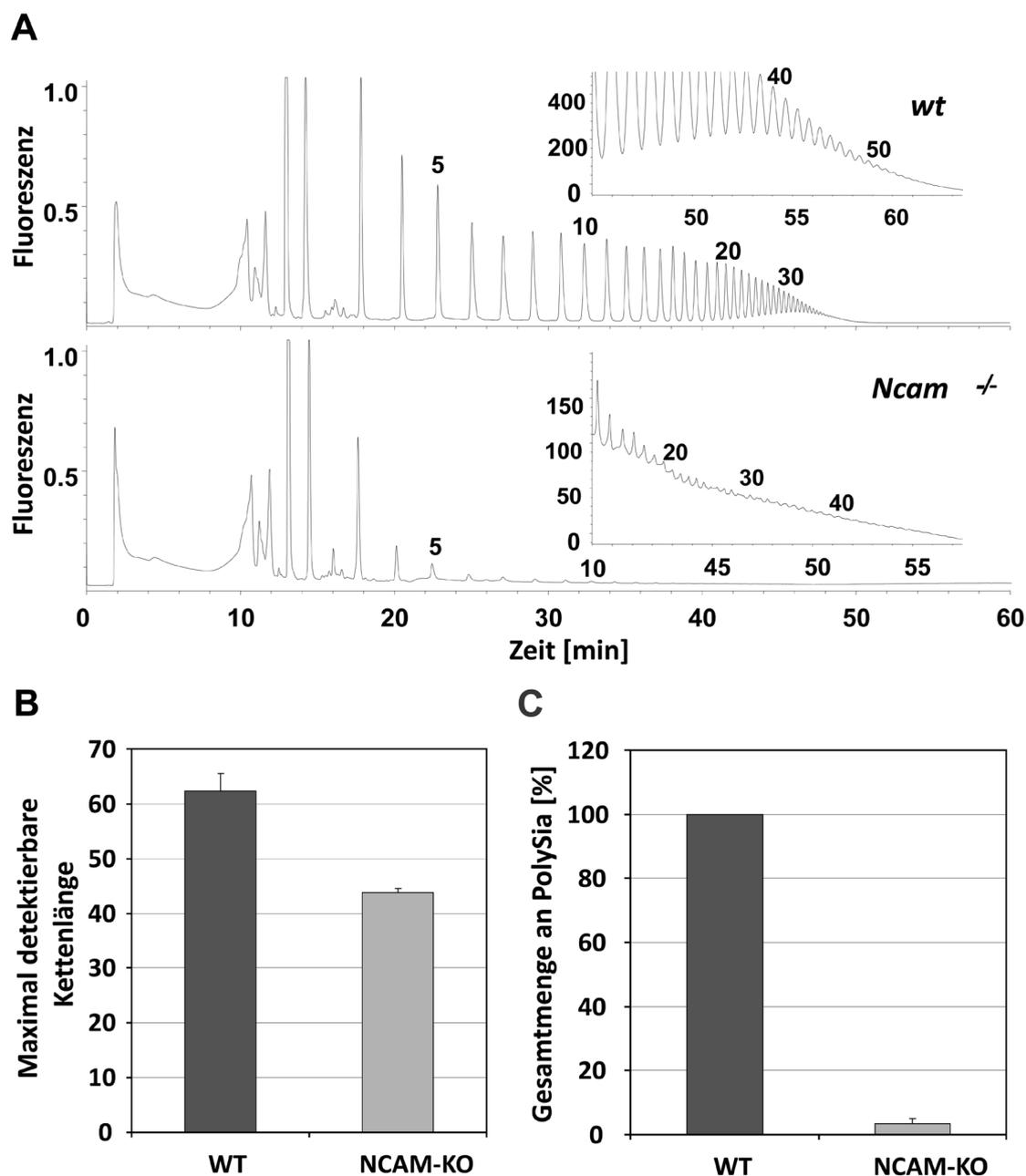


Abbildung 14: DMB-HPLC Analysen von WT- und NCAM-KO-Mäusegehirnen

(A) Kettenlängenbestimmung aus 90 % des Aliquots. Die Nummern entsprechen der Kettenlänge. (B) Maximale detektierbare Kettenlänge von WT (~62) und NCAM-KO (~44). (C) PolySia Ketten mit mehr als 8 Sialinsäuren wurden aufaddiert, um den Gesamtgehalt an PolySia zu errechnen. Im Vergleich zum WT finden sich im NCAM-KO-Gehirn nur ~3,5 % PolySia.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse (s. Abb. 14) zeigte sich, dass die Menge an PolySia im Gehirn der NCAM-KO-Maus erniedrigt ist.

Im Vergleich zum WT (auf 100 % gesetzt) enthält die NCAM-KO-Maus ~3,5 % soviel PolySia (siehe C). Die Analysen zur Bestimmung der Kettenlängen ergaben, dass beim

WT Kettenlängen von bis zu 62 Sialinsäuren detektierbar waren, bei der NCAM-KO-Maus waren Kettenlängen bis 44 Sialinsäuren nachweisbar (siehe B). Dies macht einen Unterschied von 18 Sialinsäureresten.

5.4. NCAM-KO Kinetik-Test

Die bisherigen Versuche wurden alle mit frischen NCAM-KO-Gehirnlysaten durchgeführt, die Proben bzw. Gehirne immer direkt nach dem Lysieren der jeweiligen Analyse zugeführt. Während der geplanten Immunpräzipitation mussten die Lysate über einen Zeitraum von jeweils zwei bis drei Tagen inkubiert werden. Hier stellte sich die Frage, ob beispielsweise Sialidasen PolySia abbauen und somit die PolySia-Konzentration sinkt.

Aus diesem Grund wurde eine Testreihe durchgeführt und ein NCAM-KO-Gehirn nach Protokoll lysiert und auf sechs Proben mit gleichem Volumen aufgeteilt. Diese wurden anschließend im Thermomixer bei 37 °C inkubiert. Die Temperatur von 37 °C wurde gewählt, um mögliche Bindungsbrüche oder PolySia-Zerfälle zu beschleunigen. Hierdurch konnten die Zeitintervalle im Sinne eines Zeitraffers verkürzt bzw. simuliert werden.

Alle 30 Minuten wurde eine Probe aus dem Thermomixer entnommen und gekühlt gelagert. Die Proben wurden im Anschluss nach bereits beschriebenem Protokoll auf ein Gel aufgetragen, geblottet und per Chemilumineszenz entwickelt. Der Westen Blot (s. Abb. 15) zeigt ein nahezu unverändertes PolySia-Signal bei allen Proben, die Bindung zwischen PolySia-Ketten und dem gesuchten Protein ist stabil.

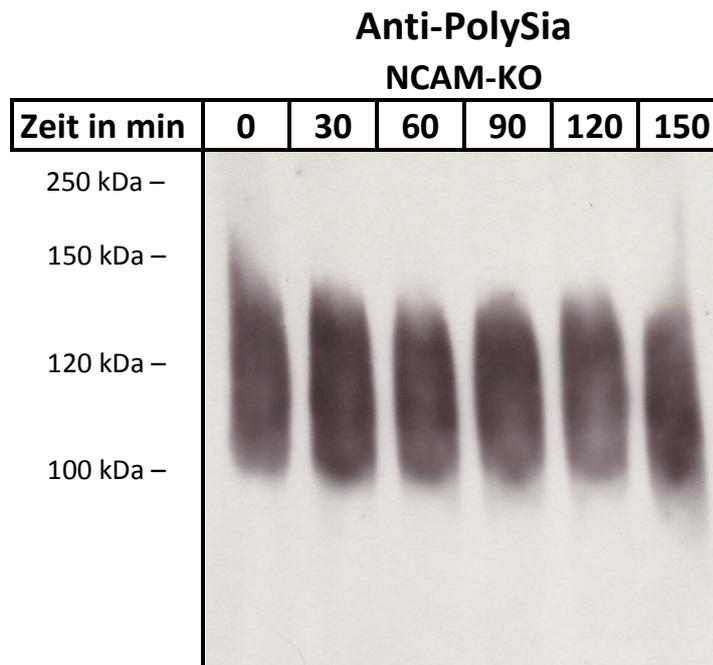


Abbildung 15: Beständigkeitsprüfung des polysialylierten Proteins

Für den Western Blot wurde ein NCAM-KO-Gehirn lysiert und auf sechs Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese wurden bei 37 °C für 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten inkubiert. Die resultierenden Proben wurden per Elektrophorese aufgetrennt und mit mAk 735 angefärbt und mit Chemilumineszenz entwickelt.

5.5. Immunpräzipitation

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte gezeigt werden, dass ein Protein bzw. mehrere Proteine in der NCAM-KO-Maus polysialyliert vorkommen. Zusätzlich haben die Western Blot Analysen gezeigt, dass das neue Protein vermutlich kleiner bzw. gleich 110 kDa sein musste. Durch die HPLC Ergebnisse konnte belegt werden, dass die PolySia im Vergleich zum WT nahezu identische Kettenlängen erreicht, jedoch der Gesamtgehalt an PolySia stark erniedrigt ist.

Für diese bisherigen Analysen wurde das Gesamtgehirnlysat verwendet. In diesem Lysat gelöst befinden sich alle Proteine aus dem Mäusegehirn. Dieser Zustand macht die Identifikation eines einzelnen Proteins ohne weitere Hinweise auf das gesuchte Protein nahezu unmöglich.

Für eine erfolgreiche Identifikation musste das gesuchte Protein also aus der Vielzahl von sich im Hirnlysat befindlichen Proteine isoliert werden. Um dies bewerkstelligen zu können, wurde der PolySia-Träger mittels Anti-PolySia-mAk isoliert.

Für die Immunpräzipitation wurden *Magnetic Beads* verwendet. An die MB wurde der monoklonale Anti-PolySia-Antikörper 735 irreversibel gekoppelt.

Die gekoppelten MB wurden nun zu den vorher lysierten Gehirnen gegeben. Insgesamt wurden 35 NCAM-KO-Gehirne, aufgeteilt auf drei Aliquots, immunpräzipitiert. Nachdem die Antikörper an das Antigen PolySia gebunden hatten, konnten sie mitsamt dem gesuchten Protein durch einen Magneten vom Gesamtlysate getrennt werden. Mittels basischem Eluierpuffer (pH=14) wurde dann der Komplex zwischen Antikörper und gesuchtem Protein wieder getrennt, wodurch im Endeffekt das gesuchte Protein isoliert werden konnte. Die Eluate wurden direkt mit Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Um die Verunreinigung so gering wie möglich zu halten, wurde vor dem zweifachen Eluieren mit zwei verschiedenen Waschpuffern je dreimal gewaschen. Diese Form der Immunpräzipitation wurde in unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal durchgeführt. Aus diesem Grund war eine genaue Qualitätskontrolle notwendig, um verlässlich zeigen zu können, dass diese Methode unter den gewählten Bedingungen funktioniert. Zu diesem Zweck wurden bei jedem Schritt der Isolation Proben entnommen und diese nach jeder der drei zeitlich separierten Aufreinigungen analysiert. Zur Analyse wurden Western Blots und Silbergele angefertigt.

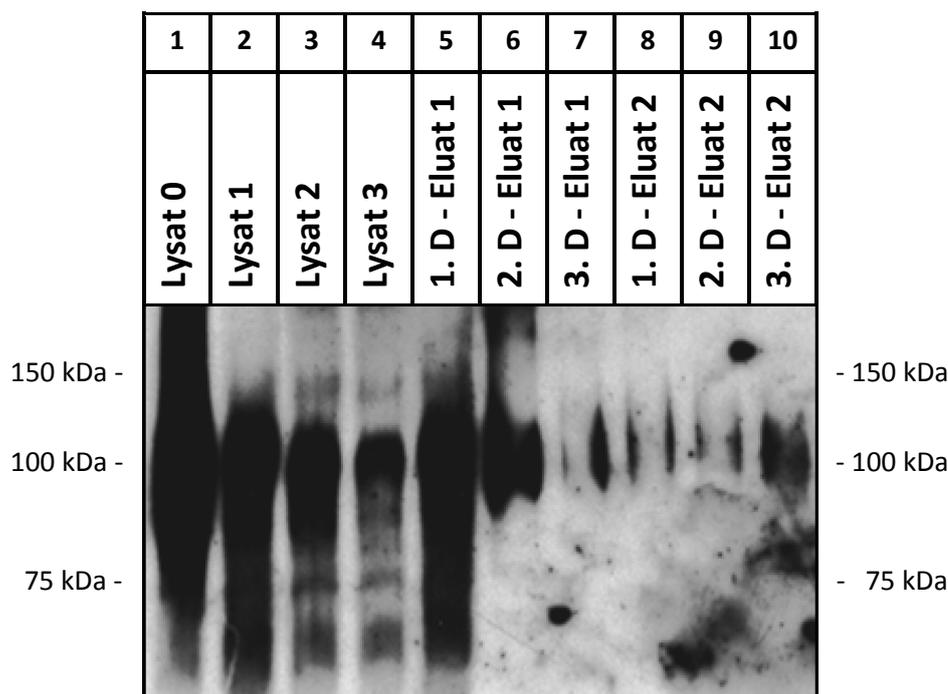


Abbildung 16: Kontroll - Western Blot nach der ersten Immunpräzipitation

Verwendet wurde der Anti-PolySia mAk 735. Lysat 0 entspricht der PolySia Konzentration im Gesamtgehirnlysate vor Immunpräzipitation. Die Lysat-Banden 1-3 zeigen die Anfärbung von PolySia im Gehirnllysate nach jedem Aufreinigungsschritt. Die Eluat-Banden zeigen die qualitativen PolySia-Konzentrationen in den Eluaten der jeweiligen Durchgänge.

Um zu zeigen, dass das gesuchte Protein mittels MB isoliert werden konnte, wurden Proben der Lysate und Eluate mittels Elektrophorese aufgetrennt und geblottet. Im Anschluss wurde mit dem Anti-PolySia-Antikörper mAk 735 angefärbt. Dieser mAk 735 wurde anschließend von einem Anti-Maus Sekundärantikörper erkannt und mit Chemilumineszenz-Detektion entwickelt (s. Abb. 16). Die Bande 1 zeigt die PolySia im Ausgangslysat nach Homogenisierung. Lysat 1, 2 und 3 (Bande 2-4) zeigen die PolySia im Gesamtylat jeweils nach dem ersten, zweiten und dritten Durchgang der ersten Aufreinigung. Wie zu erwarten, ist die PolySia-Konzentration im Rohlysat am höchsten und nimmt mit jedem Durchgang ab. Auch kann man erkennen, dass der Großteil der PolySia schon nach den ersten beiden Durchgängen aus dem Lysat entfernt werden konnte. Um zu belegen, dass sich diese PolySia auch wirklich in den Eluaten befindet und nicht bei den Waschvorgängen ausgespült wurde, wurden die Eluate ebenfalls aufgetragen. Es zeigt sich eine starke PolySia-Färbung in den jeweils ersten Eluaten des ersten und zweiten Zyklus (Bande 5-6). Dieses Ergebnis korreliert mit der zuvor beschriebenen Abnahme von PolySia in den Gesamtylaten (Bande 1-4). Die nur noch geringe Anfärbung von PolySia in den Eluaten der nachfolgenden Durchgänge (Bande 7-10) lässt sich dadurch erklären, dass die MB bereits nach zwei Durchgängen ihr Maximum erreicht haben. Die PolySia-Konzentration in den nachfolgenden Lysaten ist danach zu gering für die *Beads*, sodass nur noch kleine Mengen gebunden werden.

Mithilfe eines Silbergels (s. Abb. 17) wurde überprüft, wie hoch die Verunreinigung mit Fremdproteinen in den Eluaten ist und wie gut die Waschpuffer diese Verunreinigungen entfernen. Schon die jeweils ersten Waschpuffer (Bande 7-9) der jeweiligen Durchgänge entfernen nahezu alle sichtbaren Verunreinigungen, sodass fast keine Verunreinigungen in den jeweils zweiten Waschpuffern (Bande 10-12) verbleiben. Passend dazu lassen sich keine Verunreinigungen in den Eluaten anfärben. Die Ergebnisse aus Western Blot und Silbergel belegen somit die Effizienz der durchgeführten Immunpräzipitation mittels MB. Es konnte eine hohe Ausbeute bei sehr geringer Verunreinigung erzielt werden.

Zusätzlich zeigten die Kontrollen, dass sich das gesuchte Protein mittels Silbergel nicht nachweisen ließ. Retrospektiv lag dies wahrscheinlich an der geringen Menge und an dem Sachverhalt, dass glykosylierte Proteine mittels Silbergel nur schwer anzufärben sind.

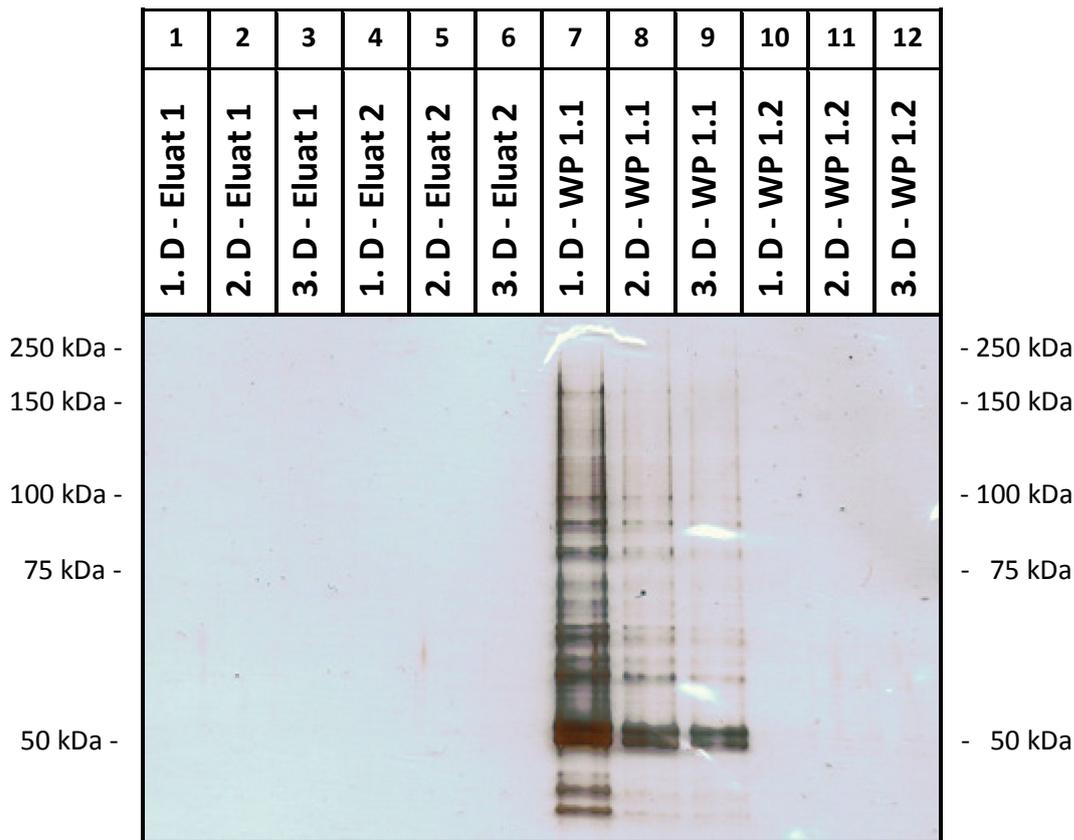


Abbildung 17: Kontroll-Silbergel nach der ersten Immunpräzipitation

Durch den ersten Waschpuffer (Bande 7) konnte der Hauptteil der Verunreinigungen entfernt werden. Als Resultat zeigen die Eluate (Bande 1-6) nur minimale Verunreinigungen.

In analoger Weise wurde die Aufreinigung noch zweimal durchgeführt und kontrolliert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass keine relevanten Verunreinigungen detektiert und die polysialylierten Proteine mit dem beschriebenen Versuchsaufbau isoliert werden konnten.

5.6. Ankonzentrierung der Eluate

Insgesamt wurden durch die Immunpräzipitation 35 Mäusegehirne mittels *Magnetic Beads* aufgereinigt. Das Volumen eines Eluat-Reaktionsgefäßes (Eluat-RG) betrug ca. 1,8 ml, insgesamt ergaben die 24 Eluat-RG somit ein Volumen von ca. 44 ml. Da das gesuchte polysialylierte Protein in sehr geringer Konzentration vorliegt, war eine Ankonzentrierung der Immunpräzipitate erforderlich. Diese wurde mittels 15 ml Zentricons mit einer Filtergröße von 10 kDa durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, dass der Puffer den Filter des Zentricon passieren kann, jedoch Proteine größer ~10 kDa, also auch das gesuchte polysialylierte Protein mit einer vermuteten Größe von ~100 kDa, zurückgehalten werden und somit ankonzentriert werden können. Nach

einem Spüldurchlauf, bei dem die Zentricons mit Tris/HCl befüllt wurden, wurden sie schrittweise nach dem unten abgebildeten Schema (s. Tab. 7) mit den Eluaten befüllt und bei 4 °C abzentrifugiert. Durch die Ankonzentrierung konnte das Volumen von 44 ml auf 200 µl in RG-A (sehr hohe PolySia-Konzentration), 200 µl in RG-B (mittlere PolySia-Konzentration) und 260 µl im PNGaseF-RG (niedrige PolySia-Konzentration mit PNGaseF-Puffer) reduziert werden. Aus dem PNGaseF-RG wurden nun noch 200 µl für einen PNGaseF-Verdau mit anschließendem Western Blot entnommen, aus RG-B wurden 20 µl für eine Silbergefärbung entnommen.

Tabelle 7: Schema der Ankonzentrierung

Lauf-Nr.	Zentricon A - Eluate	Zentricon B - Eluate
1	1. Lauf: Eluat 1 - 1.Durchgang 1. Lauf: Eluat 1 - 2.Durchgang 2. Lauf: Eluat 1 - 1.Durchgang 3. Lauf: Eluat 1 - 1.Durchgang 3. Lauf: Eluat 1 - 2.Durchgang auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen	1. Lauf: Eluat 1 - 3.Durchgang 1. Lauf: Eluat 1 - 4.Durchgang 1. Lauf: Eluat 2 - 1.Durchgang 1. Lauf: Eluat 2 - 2.Durchgang 1. Lauf: Eluat 2 - 3.Durchgang 1. Lauf: Eluat 2 - 4.Durchgang 2. Lauf: Eluat 1 - 2.Durchgang
2	die RG von Lauf 1 mit Tris/HCl spülen und ins Zentricon geben auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen	2. Lauf: Eluat 1 - 3.Durchgang 2. Lauf: Eluat 1 - 4.Durchgang 2. Lauf: Eluat 2 - 1.Durchgang 2. Lauf: Eluat 2 - 2.Durchgang 2. Lauf: Eluat 2 - 3.Durchgang 2. Lauf: Eluat 2 - 4.Durchgang 3. Lauf: Eluat 1 - 3.Durchgang
3	auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen	3. Lauf: Eluat 1 - 4.Durchgang 3. Lauf: Eluat 2 - 1.Durchgang 3. Lauf: Eluat 2 - 2.Durchgang 3. Lauf: Eluat 2 - 3.Durchgang 3. Lauf: Eluat 2 - 4.Durchgang auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen
4	auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen	die RG von Lauf 1 bis 3 mit Tris/HCl spülen und ins Zentricon geben (14ml)
5	auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen	die RG von Lauf 1 bis 3 mit Tris/HCl spülen und ins Zentricon geben (14ml)
6	die ca. 200µl Ankonzentrat in LoBind-RG (500µl) übertragen – RG-A auf ca. 14ml mit Na/Phosphat auffüllen	von den 200µl Ankonzentrat 50µl in Zentricon A übertragen auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen

7	auf ca. 14ml mit Na/Phosphat auffüllen	auf ca. 14ml mit Tris/HCl auffüllen
8	die ca. 260µl Ankonzentrat in LoBind-RG (500µl) übertragen – PNGaseF-RG	die ca. 200µl Ankonzentrat in LoBind-RG(500µl) übertragen – RG-B

5.7. Identifikation der PolySia-Träger

Vorversuche haben gezeigt, dass die Identifikation des gesuchten Proteins aufgrund seiner sehr geringen Konzentration erheblich erschwert wurde. Kleinste Verunreinigungen mit Fremdproteinen (Keratin der Haut) reichten schon aus, um die Identifikation unmöglich zu machen. Aus diesem Grund wurden die folgenden Schritte unter sehr sauberen Bedingungen durchgeführt. Die Einmalhandschuhe wurden regelmäßig gewechselt und vor jedem Schritt desinfiziert, die Pipettenspitzen und Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden unter äußerster Vorsicht ausgepackt und verwendet. Zudem wurden industriell hergestellte Verbrauchsmaterialien wie z.B. Gel und SDS-Puffer verwendet, um möglichen Verunreinigungen bei der eigenen Herstellung vorzubeugen.

Für die Identifikation wurden 25 % (50 µl) von RG-A, welches die höchste PolySia-Konzentration enthielt, verwendet. Nach dem Lyophilisieren wurde die Probe in 20 µl SDS-Puffer aufgenommen, von denen dann 18 µl auf die erste Spur und 2 µl auf die zweite Spur eines 10 % gekauften SDS-Gels aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt wurde. Hiernach wurden die erste und zweite Spur mittels Skalpell getrennt und jeweils separaten Arbeitsschritten zugeführt.

Die zweite Spur wurde geblottet, mit mAk 735 (Anti-PolySia) und Sekundärantikörper angefärbt und mittels Chemilumineszenz entwickelt. Als Ergebnis zeigte sich, dass das gesuchte polysialylierte Protein im Bereich zwischen 100 und 150 kDa lag. Dieses Wissen wurde nun genutzt, um eben diesen Bereich aus der mittlerweile Coomassie-fixierten ersten Bande auszuschneiden.

Das mit einem Skalpell ausgeschnittene Gelstück wurde im Anschluss einem tryptischen In-Gel Verdau mit vorhergehender Reduktion und Carbamidomethylierung unterzogen. Um eine möglichst große Ausbeute an Peptiden zu erzielen, wurde außerdem das zu diesem Zeitpunkt neue *ProteasMax-Surfactant* verwendet. Mit dieser Detergenz-Lösung konnte in Vorversuchen eine wesentlich verbesserte Signalqualität in der Massenspektrometrie erzielt werden. Im Anschluss an den tryptischen Verdau wurde die resultierende Probe einer Aufreinigung mit Zip-Tip Pipettenspitzen, welche mit C-18 Material beschichtet waren, unterzogen.

Ein Teil der Probe wurde darauffolgend direkt auf ein vorgespottetes *anchorship* Target aufgetragen, der Rest wurde eingefroren und bei -80 °C gelagert. Für die MALDI-TOF-MS(/MS) Analysen wurden jeweils 500-5000 Schüsse aufaddiert und ausgewertet. Die Analyse der resultierenden Peptide mittels *peptide mass fingerprint* und Fragmentationsanalyse resultierte in der Identifikation von SynCAM1.

Die in Abbildung 18 dargestellte Mascot Datensuchen des dargestellten *fingerprints* ergab einen signifikanten Score von 78. Der Score für *fingerprints* ist der negative dekadische Logarithmus der Wahrscheinlichkeit mit welcher das observierte Ergebnis zufällig aufgetreten ist, in diesem Fall ist $p < 0,05$. Für den abgebildeten *fingerprint* bedeutet dies, dass ein Score von > 62 ein signifikantes Ergebnis darstellen würde.

Um das Ergebnis zu bestätigen und abzusichern wurden Fragmentierungsanalysen der zwei Peaks mit der höchsten Intensität durchgeführt (2805,49 bzw. 2888,43). Die dazugehörigen Spektren sind in Abbildung 19 dargestellt. Die ebenfalls abgebildete Mascot Datensuche bestätigte erneut die Identifikation durch einen signifikanten Score von 186. Der Score bei Lifts errechnet sich analog zu dem bei *fingerprints*. Bereits ab einem Score von > 29 würde ein signifikantes Ergebnis vorliegen.

Durch die massenspektrometrischen Analysen konnte somit zum ersten Mal ein zweites polysialyliertes Protein neben NCAM im juvenilen Mäusegehirn nachgewiesen werden.

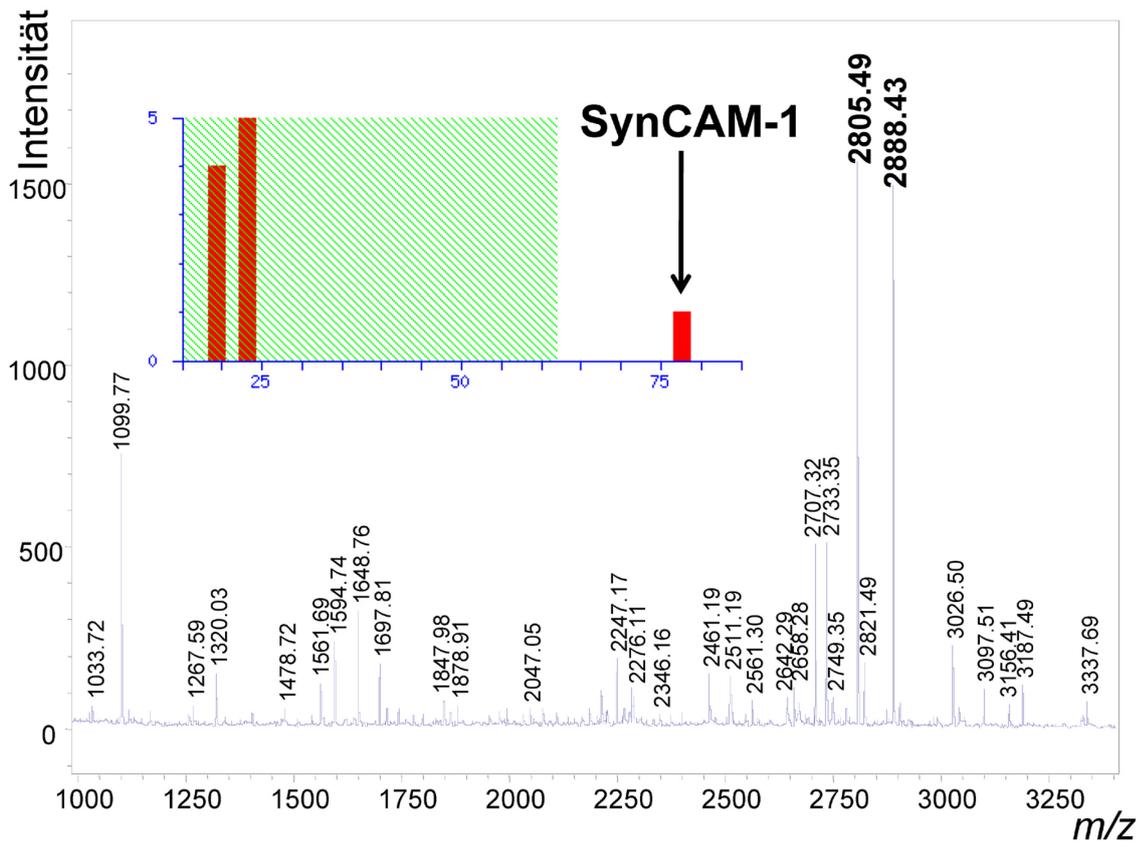


Abbildung 18: Identifikation des polysialylierten Proteins mittels Massenspektrometrie

Das immunpräzipitierte polysialylierte Protein wurde im 10 %igen SDS-Gel separiert und ein Gelstück (80-125 kDa) wurde ausgeschnitten. Nach Reduktion, Carbamidomethylierung und tryptischem Verdau wurden die resultierenden Peptide mit MALDI-TOF-MS analysiert. Die Datensuche des *peptide fingerprint* ergab signifikant SynCAM1 als das gesuchte Protein. Die zwei fett dargestellten Peaks wurden für anschließende Lift-Analysen verwendet.

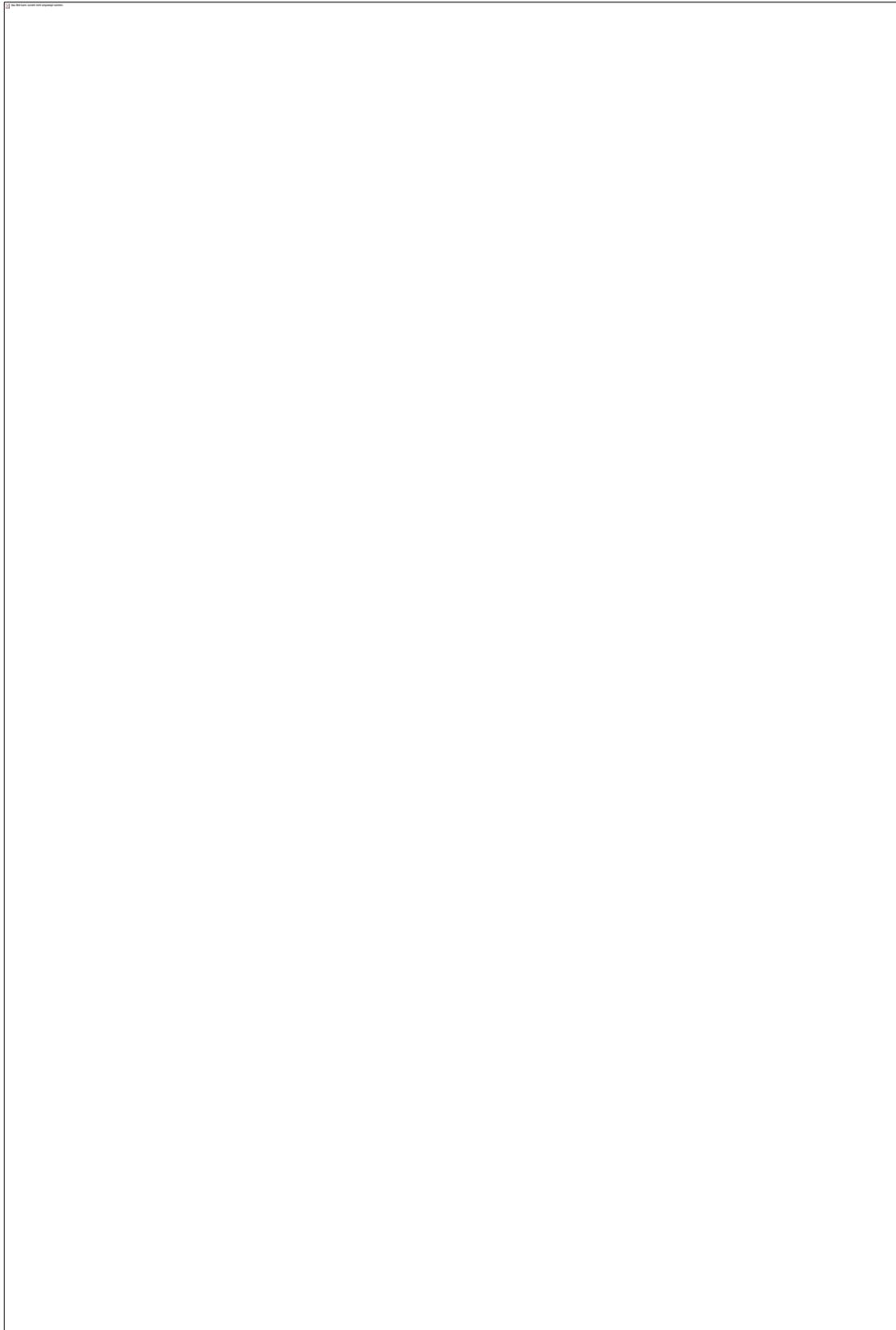


Abbildung 19: Identifikation des polysialylierten Proteins mittels Massenspektrometrie
Lifts der in Abbildung 20 dargestellten (A) 2888,43 m/z und (B) 2805,49 m/z Peaks. (C) Die kombinierte Fragmentationsanalyse aus (A) und (B) ergab signifikant SynCAM1 als das gesuchte Protein.

5.8. Nachweis von PolySia-SynCAM1 mittels Western Blot

Zur Bestätigung und Absicherung der massenspektrometrischen Ergebnisse wurde ein Western Blot mit Antikörperfärbung gegen SynCAM1 angefertigt. Zu diesem Zweck wurden die mit mAk 735 immunpräzipitierten Proteine nach bekanntem Protokoll auf ein Gel aufgegeben, geblottet und mittels Anti-SynCAM1 Antikörper vor und nach EndoN Verdau angefärbt. Anschließend wurde mit Chemilumineszens angefärbt und der Western Blot entwickelt.

Wie in Abbildung 20 zu erkennen ist, wurde ohne EndoN Verdau eine breite Bande mit einer Masse von 90-120 kDa angefärbt. Dies korreliert mit den bisherigen Ergebnissen der Anti-PolySia Western Blots. Nach PolySia Abspaltung mittels EndoN verbreitert sich das Signal und mehrere Banden mit apparenten Molekularmassen zwischen 80-110 kDa können unterschieden werden. Dies begründet sich durch die heterogene Glykosylierung von SynCAM1 an dessen N- und O-Glykanen sowie durch das Vorliegen von verschiedenen Isoformen [175, 187].

Durch den Western Blot konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem angefärbten Protein um den gesuchten PolySia-Träger handelt. Zum einen befindet sich SynCAM1 vor der PolySia-Abspaltung genau in dem vorher angenommenen Bereich, zum anderen zeigt sich ein Shift nach PolySia-Entfernung mit erkennbarem Bandenmuster, ähnlich dem NCAM Muster im Wildtyp.

Anti-SynCAM nach IP Anti-PolySia NCAM-KO

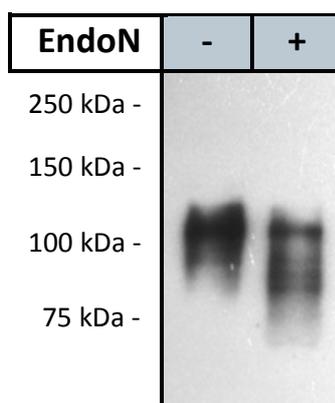


Abbildung 20: Western Blot gegen SynCAM1 nach Immunpräzipitation mit mAk 735

Ohne EndoN-Verdau (-) zeigt sich eine breite Bande zwischen 90-120 kDa. Nach EndoN-Verdau (+) verringert sich die Größe und mehrere Banden zwischen 85-110 kDa können unterschieden werden.

5.9. SynCAM1 wird an N-Glykanen polysialyliert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei SynCAM1 um das gesuchte Protein handelt, welches im postnatalen NCAM-KO-Mäusegehirn polysialyliert wird, sollte untersucht werden, ob die Polysialylierung an N- und/oder an O-Glykanen stattfindet.

Zu diesem Zweck wurde das PolySia-SynCAM1 aus der vorher beschriebenen Immunpräzipitation (PNGaseF-RG) lyophilisiert und mit N-Glykosidase F (PNGaseF) verdaut. Wie schon beschrieben, ist das Enzym PNGaseF in der Lage, verknüpfte N-Glykane freizusetzen. Nach dem Verdau wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit mAk 735 und Sekundärantikörper angefärbt. Im Anschluss wurde mittels Chemilumineszenz entwickelt.

Wie in Abbildung 21 zu erkennen ist, zeigt sich ohne PNGaseF-Verdau, wie schon in vorherigen Western Blots gezeigt, eine breite Bande (Schmier) zwischen 90-135 kDa. Nach PNGaseF-Behandlung ist nahezu keine Anfärbung mehr zu detektieren. Dieser Sachverhalt lässt darauf schließen, dass die PolySia Ketten nahezu vollständig an N-Glykane gebunden waren. Es ist anzunehmen, dass die schwache Restbande im Bereich von ~100 kDa aus einem unvollständigen PNGaseF-Verdau resultiert, da dieses Enzym am besten an Peptiden arbeitet.

Die parallele Anfärbung des immunpräzipitierten SynCAM1 aus RG-B mit Anti-SynCAM1-Antikörpern (Abbildung 22) bestätigt diese Vermutung. Ohne PNGaseF-Behandlung stellt sich die schon bekannte breite Bande um 100 kDa dar, der Western Blot zeigt aber zusätzlich, dass die Abspaltung der N-Glykane vom PolySia-SynCAM1 in zwei prominenten Banden resultiert. Die beiden Banden haben Molekülmassen von ~48 und ~65 kDa. Diese Massen passen zu den bisher beschriebenen Massen der unglykosylierten und ausschließlich O-glykosylierten SynCAM1 Varianten [175, 187, 213].

In Kombination konnte also sowohl über die Negativkontrolle mittels Anti-PolySia-Antikörper in Abbildung 21, als auch über die Positivkontrolle durch Anti-SynCAM1-Färbung in Abbildung 22 gezeigt werden, dass die PolySia des PolySia-SynCAM1 nahezu vollständig an N-Glykanen gebunden ist.

**Anti-PolySia nach
IP Anti-PolySia
NCAM-KO**

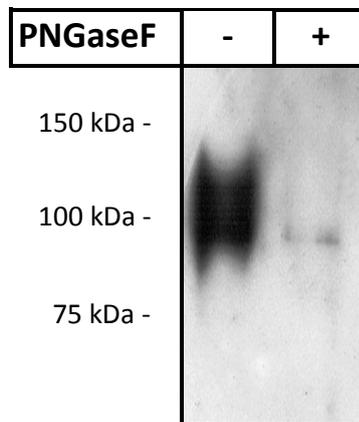


Abbildung 21: Anti-PolySia Western Blot nach PNGaseF-Verdau und IP Anti-PolySia
Zur Anfärbung wurde der Anti-PolySia-mAk 735 verwendet. SynCAM1 wurde ohne (-) und mit (+) PNGaseF-Verdau aufgetragen. Ohne Verdau zeigt sich die klassische breite Bande zwischen 100-135 kDa, nach Verdau wird nur eine schwache Bande angefärbt.

**Anti-SynCAM1 nach
IP Anti-PolySia
NCAM-KO**

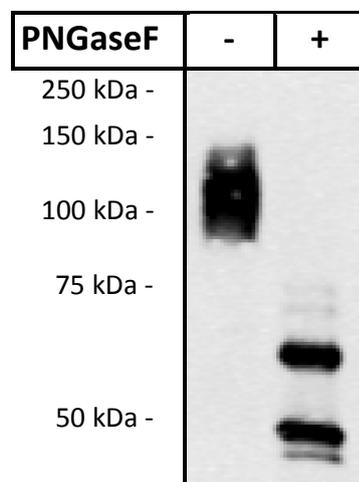


Abbildung 22: Anti-SynCAM1 Western Blot nach PNGaseF-Verdau und IP Anti-PolySia
Mittels mAk 735 immunpräzipitiertes SynCAM1 wurde mit Anti-SynCAM1-Antikörper angefärbt. Ohne Verdau (-) zeigt sich die typische breite Bande, nach Verdau (+) zeigen sich zwei prominente Banden mit Massen von ~48 und ~65 kDa.

5.10. Identifizierung der polysialylierten N-Glykosylierungsstelle

Nachdem gezeigt wurde, dass die PolySia nahezu ausschließlich an N-Glykane des SynCAM1 gebunden war, sollte im nächsten Arbeitsschritt untersucht werden, welche N-Glykosylierungsstelle bzw. -stellen polysialyliert wurde bzw. wurden. Zu diesem Zweck wurde zu Beginn eine Datenbanksuche auf www.uniprot.org durchgeführt. Die Suche ergab, dass SynCAM1 sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt (s. Abb 23), welche an den Positionen 70, 104, 116, 168, 307 und 320 liegen. Der nächste Schritt bestand darin, einen tryptischen Verdau mit SynCAM1 zu simulieren. Dieser lieferte die Massen derjenigen tryptischen Peptide, welche die möglichen N-Glykosylierungsstellen enthielten (s. Tab. 8). Der theoretische Verdau zeigte, dass zwei der sechs Glykosylierungsstellen an Schnittpunkten des Trypsins lagen. Folglich konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch die sterische Inhibition der PolySia-Kette an einer dieser beiden Glykosylierungsstellen eine unvollständige Spaltung durch Trypsin stattfindet. Bei Auftreten würden längere Peptide detektiert werden.

Zur Bestimmung wurde eine erneute Immunpräzipitation durchgeführt. Diesmal wurden allerdings nur vier NCAM-KO-Mäusegehirne verwendet. Diese wurden nach bekanntem Protokoll lysiert und mit Iodacetamid carbamidomethyliert. Das Lysat wurde danach mit Ammoniumbicarbonat-Puffer verdünnt und die Proteine mit Trypsin verdaut. Das Trypsin wurde nach dem Verdau mit Phenylmethylsulfonylfluorid inaktiviert und die resultierenden Peptide mit einer P4-Biogel Säule entsalzen. Im Anschluss wurden die Peptide zu den mit mAK 735 gekoppelten *Magnetic Beads* gegeben und inkubiert. Das Eluieren wurde nach bekanntem Protokoll durchgeführt, die isolierten Peptide auf zwei Proben aufgeteilt und lyophilisiert.

Die PolySia-Glykopeptide der Proben wurden durch eine milde Hydrolyse mit Essigsäure desialyliert. Im Anschluss wurden die Peptide von einer Probe mit PNGaseF nach bekanntem Protokoll deglykosyliert. Die deglykosylierten Glykopeptide wurden mit C-18 OMIX-Tip Pipettenspitzen entsalzen.

Die isolierten Peptide wurden nun auf ein *stainless steel* Target in 1 µl Wasser mit 1 µl Matrix aufgetragen. Die aufgenommenen MALDI-TOF-MS Spektren vor und nach PNGaseF-Verdau sind in Abbildung 24 A dargestellt. Nach Entfernung der N-Glykane mittels PNGaseF ließ sich nur ein zusätzliches Signal bei m/z 1377,7 detektieren. Dieses Signal korrespondiert mit einem deglykosylierten tryptischen SynCAM1 Peptid, welches sich in der dritten N-Glykosylierungsstelle (Asn₁₁₆) befindet. Durch den PNGaseF-Verdau wurde das glykosylierte Asn zu Asp konvertiert.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde ein Lift dieses Peptides durchgeführt (Abbildung 24 B). Die MALDI-TOF-MS/MS Analyse bestätigte die Sequenz des zuvor

beschriebenen Peptides als V₁₁₂SLTDVSI~~S~~DEGR₁₂₄. Dieses Resultat demonstriert, dass SynCAM1 an N-Glykanen bei Asn₁₁₆ polysialyliert wird. Zudem konnte durch den vor der Immunpräzipitation durchgeführten tryptischen Verdau gezeigt werden, dass wohl keine weiteren Proteine Träger von N-Glykan gebundener PolySia in postnatalen NCAM-KO-Gehirnen sind.

10	20	30	40	50	60
MASAVLPSGS	QCAAAAAVAA	AAAPPGLRLR	LLLLLLSAAA	LIPTGDGQNL	F'TKDVTVIEG
70	80	90	100	110	120
EVATISCQVN	NKS DDSVIQLL	NPNRQTIYFR	DFRPLKDSRF	QLL NFS SSEL	KVSLT NVS IS
130	140	150	160	170	180
DEGRYFCQLY	TDPPQESYTT	ITVLVPPRNL	MIDIQKDTAV	EGEEIEV NCT	AMASKPATTI
190	200	210	220	230	240
RWFKGNKELK	GKSEVEEWS	MYTVTSQLML	KVHKEDDGVP	VICQVEHPAV	TGNLQ T QRYL
250	260	270	280	290	300
EVQYKPOVHI	QMTYPLQGLT	REGDAFELTC	EAIGKQPVM	VTWVRVDDM	PQHAVLSGPN
310	320	330	340	350	360
LFINNL NKT D	NGT YRCEASN	IVGKAHSDYM	LYVYDPPTTI	PPPTTTTTTT	TTTTTTILTI
370	380	390	400	410	420
ITD T TATTEP	AVHDSRAGEE	GTIGAVDHAV	IGGVVAVVVF	AMLCLLIILG	RYFARHKGT
430	440	450			
FTHEAKGADD	AADADTAIIN	AEGGQNNSEE	KKEYFI		

Abbildung 23: Aminosäuresequenz von SynCAM1

SynCAM1 besteht aus 156 Aminosäuren und hat eine Masse von 49,788 kDa. Die gelb hervorgehobenen Bereiche zeigen die sechs potentiellen N-Glykosylierungsstellen bei Position 70, 104, 116, 168, 307 und 320.

Tabelle 8: SynCAM1-Peptidmassen nach simuliertem tryptischen Verdau

Die gelb hervorgehobenen Massen und die jeweils korrespondierende Aminosäureposition zeigen die potentiellen N-Glykosylierungsstellen. (Quelle: www.expasy.org)

Masse	Position	Modifikationen	Peptidsequenz
5626.7520	325-376		AHSDYMLYVYDPPTTIPPT TTTTTTTTTTTTILTIITDT TATTEPAVHDSR
3462.9214	377-411	Cys_CAM: 404 ⁻ 3519.9429	AGEEGTIGAVDHAIVGGVVA VVVFAMLCLLIILGR
2831.3960	125-148	Cys_CAM: 127 ⁻ 2888.4175	YFCQLYDPPQESYTTITVL VPPR
2805.4756	239-261		YLEVQYKPQVHIQMTYPLQG LTR
2676.3160	262-285	Cys_CAM: 270 ⁻ 2733.3374	EGDAFELTCEAIGKPQPMV TWVR
2636.2542	157-181	Cys_CAM: 169 ⁻ 2693.2756	DTAVEGEEIEVNCTAMASKP ATTIR
2605.2674	215-238	Cys_CAM: 223 ⁻ 2662.2889	EDDGVVICQVEHPAVTGNL QTQR
2565.2765	286-308		VDDEMPQHAVLSGPNLFINN LNK
2476.0706	427-451		GADDAADADTAIINAEGGQN NSEEK
2276.0461	193-211		SEVEEWSDMYTVTSQLMLK
1904.9633	54-71	Cys_CAM: 67 ⁻ 1961.9848	DVTVIEGEVATISCQVNK
1470.7547	72-84		SDDSVIQLLNPNR
1412.7420	100-111		FQLLNFSSELK
1376.7016	112-124		VSLTNVSISDEGR
1053.5000	418-426		GTYFTHEAK
974.5339	149-156		NLMIDIQK
920.4506	316-324	Cys_CAM: 316 ⁻ 977.4720	CEASNIVGK
827.4410	85-90		QTIYFR
826.3690	309-315		TDNGTYR
775.4461	91-96		DFRPLK
750.4144	48-53		QNLFTK
571.2762	453-456		EYFI
556.2878	412-415		YFAR

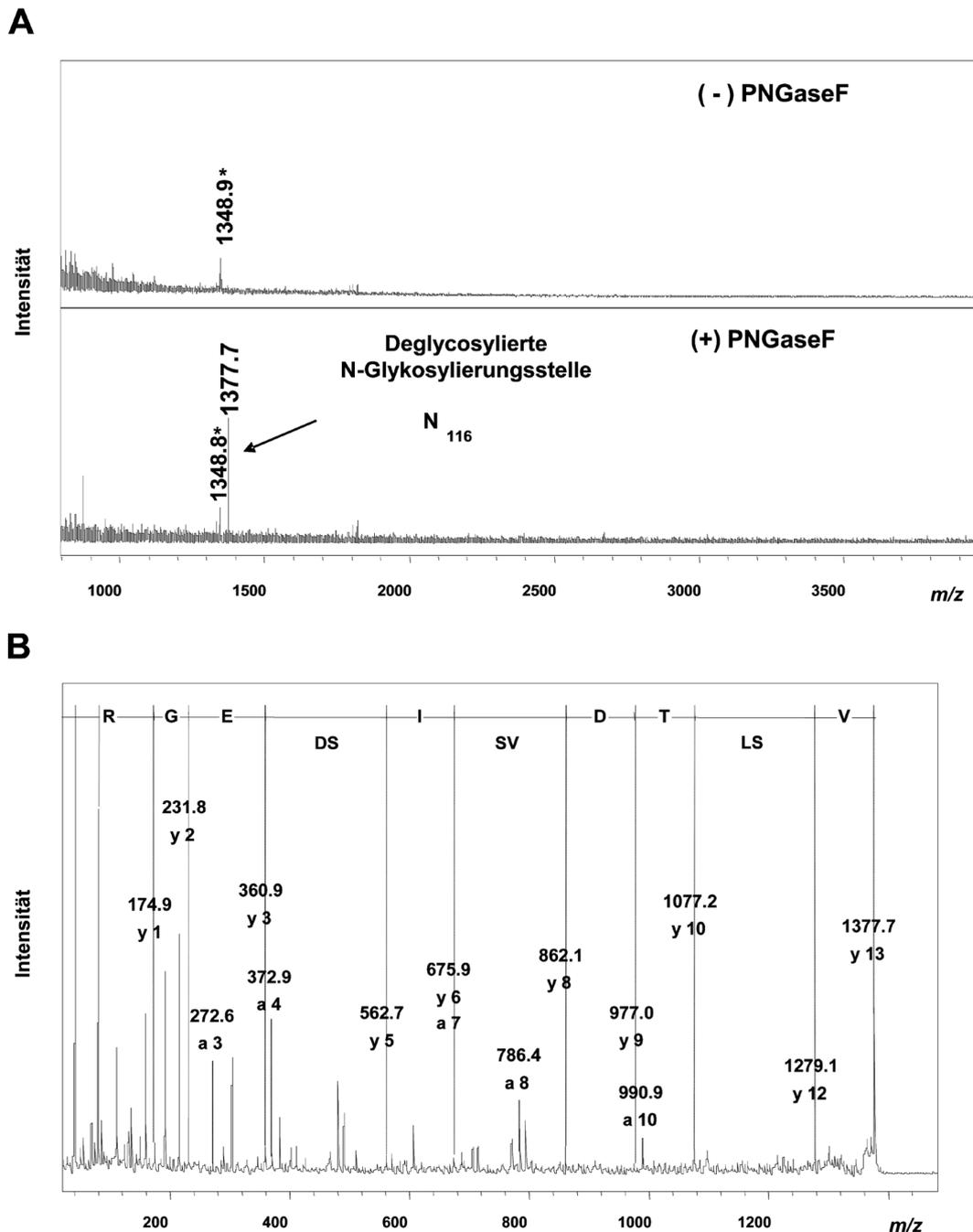


Abbildung 24: Identifikation der N-Glykosylierungsstelle

(A) MALDI-TOF-MS Spektren von immunpräzipitierten polysialylierten Glykopeptiden vor (-) und nach (+) PNGaseF-Verdau. Monoisotopische Massen der pseudomolekularen Ionen $[M+H]^+$ sind angegeben. Unbekannte Verunreinigung ist angegeben (*). (B) MALDI-TOF-MS/MS Spektrum des in (A) dargestellten $1377,7 \text{ m/z}$ Peaks.

5.11. SynCAM1 wird auch im Wildtyp polysialyliert

Alle bisherigen SynCAM1-Experimente wurden ausschließlich an NCAM-KO-Mäusen durchgeführt. Dies ließ die Frage offen, ob es sich bei der Polysialylierung von SynCAM1 in der NCAM-KO-Maus lediglich um einen kompensatorischen

Mechanismus aufgrund des fehlenden NCAM handelte. Um diese Frage beantworten zu können, wurde nun die Polysialylierung von SynCAM1 im perinatalen Wildtyp Mäusegehirn untersucht.

Der erste Versuch bestand aus der Anfertigung eines vergleichenden Western Blots zwischen WT- und NCAM-KO-Maus. Zu diesem Zweck wurden je ein WT- und NCAM-KO-Mäusegehirn nach Schema lysiert und das resultierende Homogenat mittels Elektrophorese und Western Blot weiter verwendet. Im Unterschied zu den bisherigen Experimenten (s. Abb 12) wurde diesmal die zehnfache Menge des WT-Gehirnlysates auf das Gel aufgetragen. Unter diesen Konditionen zeigte sich nicht nur das dominierende hochmolekulare PolySia-Signal im Massenbereich von PolySia-NCAM, sondern ebenfalls ein Signal im Massenbereich von 110 kDa, also im Bereich des PolySia-SynCAM1 (s. Abb. 25).

Um zu beweisen, dass es sich bei dieser Bande wirklich um PolySia-SynCAM1 handelt und nicht um ein Zerfallsprodukt, welches bei der Lysierung des WT-Gehirnes anfällt, wurde eine Immunpräzipitation mit Anti-SynCAM1-Antikörpern durchgeführt. Hierzu wurden Anti-SynCAM1-Antikörper an *Magnetic Beads* gekoppelt. Dieser Schritt erfolgte ähnlich zu der Kopplung von mAk 735 an MB, diesmal jedoch mit Protein A gekoppelten MB (vgl. Methodenteil).

Für die eigentliche Immunpräzipitation wurden gleiche Mengen von WT- und NCAM-KO-Gehirnlysat aus je einem perinatalen Gehirn verwendet, jeweils 60 mg vom Nassgewicht. Die Wasch- und Eluierprozeduren wurden analog zur Isolation mit mAk 735 MB durchgeführt. Die so erhaltenen Immunpräzipitate von WT- und NCAM-KO-Maus wurden auf jeweils zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt und je einer von beiden Genotypen wurde einem EndoN-Verdau unterzogen. Alle vier Proben wurden im Anschluss per Elektrophorese aufgetrennt, geblottet und mit Anti-PolySia-mAk 735 visualisiert.

Der dazugehörige Western Blot (s. Abb. 26) zeigt, dass sich sowohl im perinatalen Wildtyp- als auch im NCAM-KO-Gehirn vergleichbare Mengen an PolySia-SynCAM1 detektieren lassen. Die angefärbten Banden liegen im Massenbereich von 90-140 kDa. Insgesamt demonstrieren diese Daten, dass SynCAM1 ein neuer, NCAM-unabhängiger PolySia-Träger ist, da er sich identisch zur NCAM-KO-Maus auch im WT nachweisen lässt.

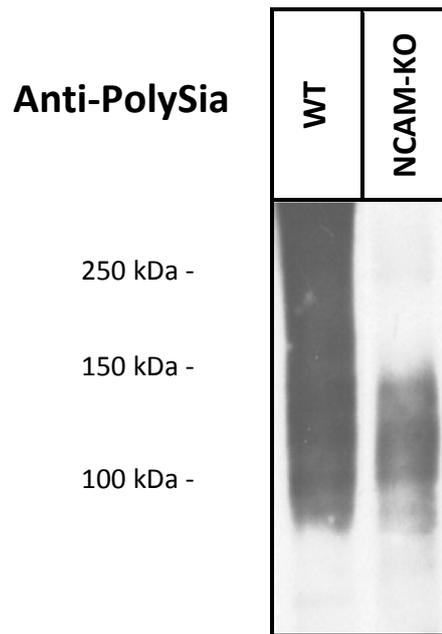


Abbildung 25: Nachweis von PolySia-SynCAM1 in WT- und NCAM-KO-Maus

Western Blot vom WT- und NCAM-KO-Gehirn mittels mAk 735 mit 10-facher Menge an WT-Lysat. Neben der typischen PolySia-NCAM-Bande zeigt sich beim WT jetzt auch eine Bande im Bereich des PolySia-SynCAM1 ähnlich zur NCAM-KO-Maus.

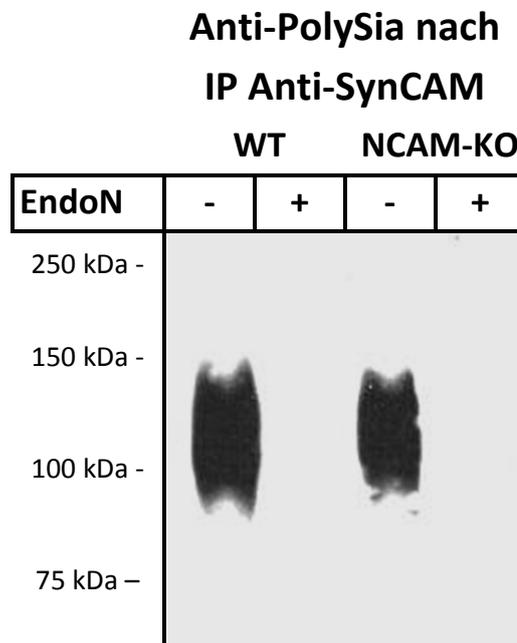


Abbildung 26: Nachweis von PolySia-SynCAM1 im WT

Nach Immunpräzipitation mittels Anti-SynCAM1-Antikörper von WT- und NCAM-KO-Maus wurde mit mAk 735 gegen PolySia angefärbt. Vor EndoN-Verdau (-) zeigen sich nahezu identische Banden im Bereich zwischen 90 und 140 kDa bei WT- und NCAM-KO-Maus.

5.12. Bestimmung des Anteils an polysialylierten SynCAM1

In den bisherigen Versuchen wurde ausschließlich der polysialylierte SynCAM1-Pool untersucht und analysiert. Offen blieb noch die Frage, wie groß das Verhältnis zwischen polysialyliertem und nicht-polysialyliertem SynCAM1 ist. Die schon durchgeführten Versuche hatten gezeigt, dass PolySia-SynCAM1 in sehr geringer Konzentration vorlag. Aus diesem Grund war unsere Vermutung, dass nur ein geringer Anteil des Gesamtpools an SynCAM1 polysialyliert sein könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine erneute Immunpräzipitation durchgeführt, bei der ein NCAM-KO Gehirn nach Protokoll lysiert und mit an Anti-PolySia-mAk 735 gekoppelten *Magnetic Beads* inkubiert wurde. Durch diesen Schritt sollte erreicht werden, dass der gesamte polysialylierte SynCAM1-Pool aus dem Gesamtlysate entfernt wurde. Jeweils Proben des Gesamtgehirnlysates vor (-) und nach (+) Immunpräzipitation wurden auf drei verschiedene Gele aufgetragen und geblottet. Im Anschluss wurde mit Anti-PolySia-, Anti-SynCAM- und Anti-SynCAM1-Antikörpern angefärbt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 27 und 28 dargestellt.

Abbildung 27 zeigt, dass nach Immunpräzipitation keine PolySia mehr detektierbar ist, während sich vor der Isolation die typische PolySia-SynCAM1 Bande darstellt. Dieser Schritt diente der Kontrolle, da er beweist, dass der gesamte PolySia-SynCAM1-Pool durch die Isolation aus dem Gesamtgehirnlysate entfernt wurde. Schlussfolgernd befindet sich also nur noch unpolysialyliertes SynCAM1 im immunpräzipitierten Gehirnlysate.

Für die Western Blots in Abbildung 28 wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet. Zum einen ein Anti-SynCAM-Antikörper (A), welcher alle SynCAM-Isoformen bindet, zum anderen ein spezifisch an SynCAM1 bindender Anti-SynCAM1-Antikörper (B). Durch dieses Vorgehen kann gezeigt werden, dass nur SynCAM1 und keine anderen Isoformen polysialyliert werden. In (A) werden mehrere Banden angefärbt, sowohl vor als auch nach Immunpräzipitation. Im Bereich von 90-120 kDa war nach Isolation eine Abnahme der Intensität erkennbar und die restlichen Banden waren unverändert. In (B) war hauptsächlich nur eine Bande im Bereich von 90-120 kDa detektierbar, welche derjenigen aus (A) sehr stark ähnelt. Auch hier war eine leichte Abnahme der Intensität erkennbar. Aufgrund der geringen Intensitätsunterschiede zwischen den Banden vor und nach Isolation konnte gezeigt werden, dass nur ein kleiner Anteil des SynCAM1-Pools polysialyliert wird. Durch den spezifisch gegen SynCAM1 gerichteten Antikörper in (B) wurde zudem bestätigt, dass nur SynCAM1 im perinatalen NCAM-KO-Mäusegehirn polysialyliert wird.

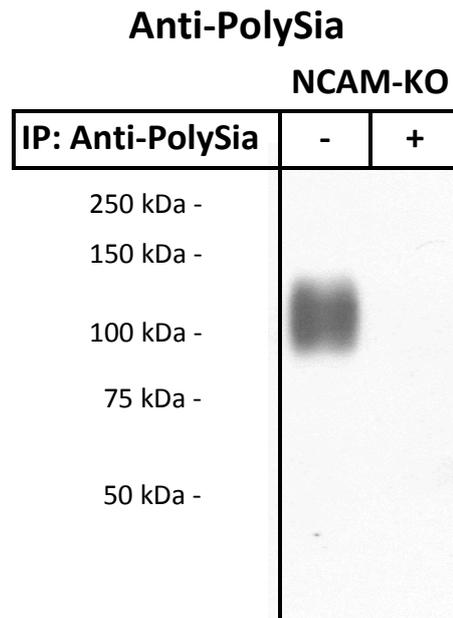
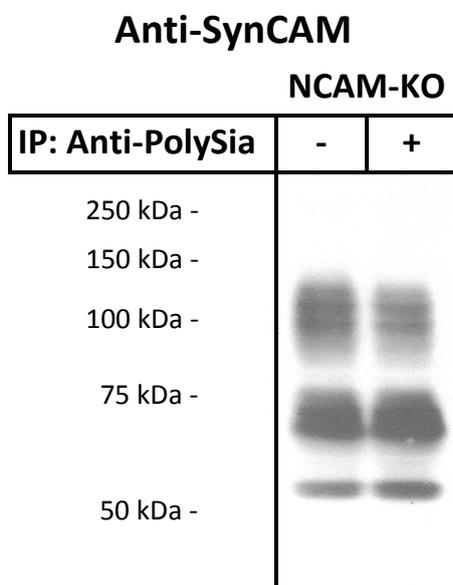


Abbildung 27: Anfärbung von PolySia vor (-) und nach (+) Immunpräzipitation

Verwendet wurde das Gesamtgehirnlysat vor und nach IP, welches mit mAk 735 angefärbt wurde. Vor IP zeigt sich die typische PolySia-SynCAM1-Bande, nach IP ist keine PolySia detektierbar.

A



B

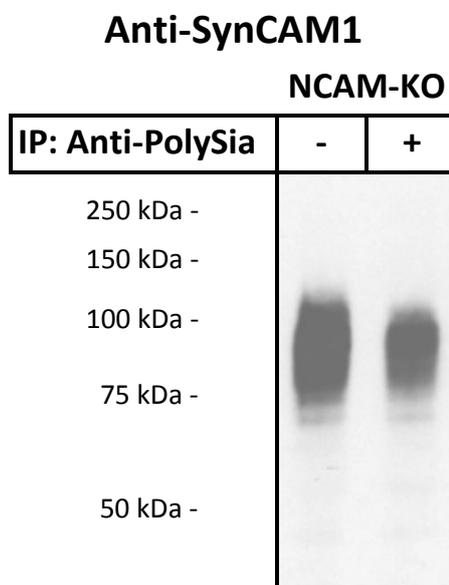


Abbildung 28: Anfärbung von (A) SynCAM und (B) SynCAM1 vor (-) und nach (+) Immunpräzipitation

Verwendet wurde das Gesamtgehirnlysat vor und nach IP. In (A) wurde der gesamte SynCAM-Pool und in (B) wurde spezifisch SynCAM1 angefärbt. Es zeigt sich eine leichte Abnahme der SynCAM1-Bande in beiden Fällen.

6. Diskussion

6.1. SynCAM1 ist ein Zielobjekt der Polysialylierung

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM1 ein Zielobjekt für die Polysialylierung im sich entwickelnden Mäusegehirn darstellt. Wie schon *Cremer et al.* 1994 [91] konnte auch in dieser Arbeit PolySia im Gehirn von NCAM-KO-Mäusen nachgewiesen und dadurch das vorbestehende Ergebnis bestätigt werden (s. Abb. 12).

Bei einer Proteingröße von circa 100 kDa konnte mit einer hohen Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um PolySia-NCAM (~200 kDa) handeln konnte. Eine negative Anti-NCAM-Färbung bestätigte, dass keine der beschriebenen NCAM-Isoformen in den verwendeten Mäusen aktiv war (s. Abb. 13). Zudem ließ die qualitative Auswertung der Western Blots vermuten, dass es sich im Vergleich zum WT in der NCAM-KO-Maus nur um geringe Mengen an PolySia handelt. Hinweis darauf war die 10 x höhere Konzentration, mit der das Lysat der NCAM-KO-Mäuse aufgetragen werden musste. Nur so waren deutliche und verwertbare Banden in der Chemolumineszenz-Detektion zu detektieren.

In der quantitativen Analyse mittels HPLC bestätigte sich diese Hypothese (s. Abb. 14). Die Gesamtmenge an PolySia entsprach nur ca. 3,5 % der Menge an PolySia, welche im WT detektierbar war. Dabei zeigten die Versuche mittels HPLC aber auch, dass die PolySia-Kettenlängen des NCAM-KO-Gehirnes nahezu der Länge von PolySia-NCAM entsprechen könnten, vorausgesetzt man nimmt an, dass die maximal detektierbaren Längen der PolySia-Ketten mit zunehmender Menge an Ausgangsmaterial zunehmen. Führt man sich also vor Augen, dass die Detektion von langen PolySia-Ketten stark von der aufgegebenen Menge an Material (Gehirnlysat) abhängig ist, so relativiert sich der Unterschied [220]. Mit diesem Hintergrundwissen ist sogar anzunehmen, dass die synthetisierten PolySia-Ketten von WT- und NCAM-KO-Gehirn gleiche Längen besitzen könnten.

Durch eine Immunpräzipitation mittels *Magnetic Beads* gelang es schließlich ausreichende Mengen an polysialyliertem Protein bzw. PolySia-SynCAM1 aufzureinigen. Auf eine klassische Ligandenchromatographie (z.B. mit Saccharose) wurde verzichtet, da für die Aufreinigung mit diesem Ansatz deutlich größere Gesamtvolumina und damit auch größere Mengen an Immunpräzipitat und Antikörper benötigt worden wären.

Für die Immunpräzipitation des gesuchten Proteins aus dem Gesamtgehirnlysat wurden Tosyl aktivierte MB verwendet. Dies hatte folgende Gründe:

- Tosyl-aktivierte MB bieten den Vorteil, dass sie mehrfach verwendet werden können, da der Antikörper (in diesem Fall mAk 735) kovalent und damit irreversibel gebunden wird. Dies macht sie kosteneffizienter und die Handhabung wird vereinfacht.
- Ein weiterer wichtiger Vorteil der Tosyl-aktivierten MB ist, dass sie durch die irreversible Bindung nicht das Eluat verunreinigen bzw. in den Versuchen (z.B. Western Blot) nicht das Signal des gesuchten Proteins überlagern.

Für die spätere Immunpräzipitation mittels spezifischem SynCAM1-Ak wurden hingegen Protein A gekoppelte MB verwendet, die Gründe hierfür waren:

- Protein A gekoppelte MB binden spezifisch den Fc-Teil der gekoppelten Antikörper. Hierdurch wird eine höhere Rate an intakten Antikörpern und dadurch eine größere Ausbeute des immunpräzipitierten Antigens (in diesem Fall SynCAM1) erreicht.
- Die Verunreinigung durch die mit-eluierten Antikörper spielte keine Rolle und beeinflusste die weiteren Forschungen nicht.
- Diese Aufreinigung wurde nur einfach durchgeführt, der Verlust der Antikörper beim Eluieren war deswegen ohne Bedeutung.

Der nächste Schritt bestand darin, das aufgereinigte Protein mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Grundsätzlich sind Membranproteine mit klassischen Proteomics-Applikationen schwer zu identifizieren. Hier ergaben sich die meisten Probleme. Das Hauptproblem dieser Forschungsarbeit lag letztendlich jedoch darin, dass das gesuchte Protein selbst nach der Immunpräzipitation und Ankonzentrierung von 35 NCAM-KO-Gehirnlysaten in einer sehr niedrigen Konzentration vorlag. Dieser Sachverhalt bedingte das daraus resultierende Problem: Bereits kleinste Verunreinigungen sorgten dafür, dass das gesuchte Protein massenspektrometrisch nicht mehr detektiert werden konnte.

Die störenden Verunreinigungen, vor allem Keratin, wurden durch sauberes Arbeiten und industriell hergestellte Verbrauchsmaterialien (gekaufte Gele, unbenutzte Chemikalien) versucht auf ein Minimum zu reduzieren. Da der Fakt der niedrigen Konzentration des gesuchten Proteins aufgrund einer beschränkten Menge an NCAM-KO-Gehirnen (N=35) nicht verbessert werden konnte, mussten die Versuche bzw. Methoden optimiert werden. Diese Vorgehensweise sollte eine maximale Ausbeute an Material für die Massenspektrometrie generieren.

Die erste Idee war, die Proteine mittels Silbergel aufzutrennen, die entsprechende(n) Bande(n) dann auszuschneiden und nach tryptischem Verdau mittels MALDI-TOF zu identifizieren (nicht dargestellt). Nach zweimaligem Ausprobieren zeigte sich, dass diese Methode nicht zur Identifikation führen würde. In den Massenspektrogrammen konnten nur Verunreinigungen detektiert werden. Wahrscheinlich lag dies an der durch die Silberfärbung verursachten Quervernetzung der Proteine untereinander, die einen tryptischen Verdau und die Herauslösung der Proteine aus dem Gel behinderte bzw. unmöglich machte.

Auf eine Trennung der gesuchten Proteine mittels 2D-Elektrophorese (2DE) wurde aus nachfolgend erklärten Gründen verzichtet:

- Die meisten integralen Membranproteine können nicht bzw. nur schwer mittels 2DE aufgetrennt werden, sondern präzipitieren irreversibel im IEF-Gel [221]. Da auch NCAM ein Membranprotein ist, war mit einer hohen Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass das gesuchte Protein ebenfalls ein Membranprotein ist.
- Aufgrund der heterogenen Polysialylierung des gesuchten Proteins und der dadurch unterschiedlichen elektrischen Ladungen hätte eine isoelektrische Fokussierung eine weitere Auftrennung der sowieso schon geringen Menge des gesuchten Proteins bedeutet.
- Die 2DE ist eine Methode mit nur mäßiger Reproduzierbarkeit [222]. Der Ansatz dieser Arbeit erforderte jedoch Methoden, welche zuverlässig ähnliche Ergebnisse lieferten.

Deswegen wurde eine weitere Strategie entwickelt, bei der die Verunreinigung minimal war und das Protein anders als bei der Silberfärbung nur minimal verändert wurde. Mittels Gelelektrophorese wurde das polysialylierte Protein in zwei Spuren getrennt. Eine Spur wurde für einen Western Blot mit Anti-PolySia-Ak (735) und Chemolumineszenz-Entwicklung benutzt und diente zur Identifikation des Bereiches in dem das gesuchte Protein im Gel lag. Dieser Größenbereich wurde aus der zweiten inzwischen Coomassie-gefärbten Spur ausgeschnitten und nach tryptischen Verdau mittels ProteasMax-Enhancer und Zip-Tip-Aufreinigung im MALDI-TOF gemessen. Resultierend konnte SynCAM1 sowohl durch die MALDI-TOF-MS-Analyse als auch in der anschließenden Fragmentationsanalyse (MALDI-TOF-MS/MS) (s. Abb. 18 u. 19) identifiziert werden. Die Ergebnisse waren eindeutig signifikant. Um die massenspektrometrischen Ergebnisse zu bestätigen, wurden im Anschluss Immunfärbungen mit SynCAM-Antikörpern durchgeführt (s. Abb. 20-22). Zum einen wurde ein SynCAM-Ak benutzt, welcher an alle SynCAM-Isoformen bindet, im anderen Fall wurde ein

SynCAM1 spezifischer Ak verwendet. Zudem wurde eine erneute Immunpräzipitation, diesmal mit SynCAM1 *Magnetic Beads*, durchgeführt, um eindeutig sicherzugehen, dass es sich bei SynCAM1 um das polysialylierte Protein handelt. Alle Ergebnisse bestätigten die vorherigen Resultate und zeigten, dass die anderen Isoformen sehr wahrscheinlich nicht oder nur sehr gering polysialyliert vorlagen. Die Ergebnisse der Western Blots zeigten zudem, dass nur ein geringer Anteil des SynCAM1-Pools im Gehirn polysialyliert wurde.

Da die Polysialyltransferasen ST8SialII und ST8SialIV die Fähigkeit besitzen sich *in vitro* selbst zu polysialylieren [150], bestand bis zur Identifikation von PolySia-SynCAM1 trotz eigentlich nicht passender Molekülgrößen die Möglichkeit, dass es sich bei dem gesuchten Protein nur um autopolsialylierte Fragmente von ST8SialII und ST8SialIV handelte. Mit dem Nachweis von PolySia-SynCAM1 mittels Massenspektrometrie konnte diese Hypothese wiederlegt werden.

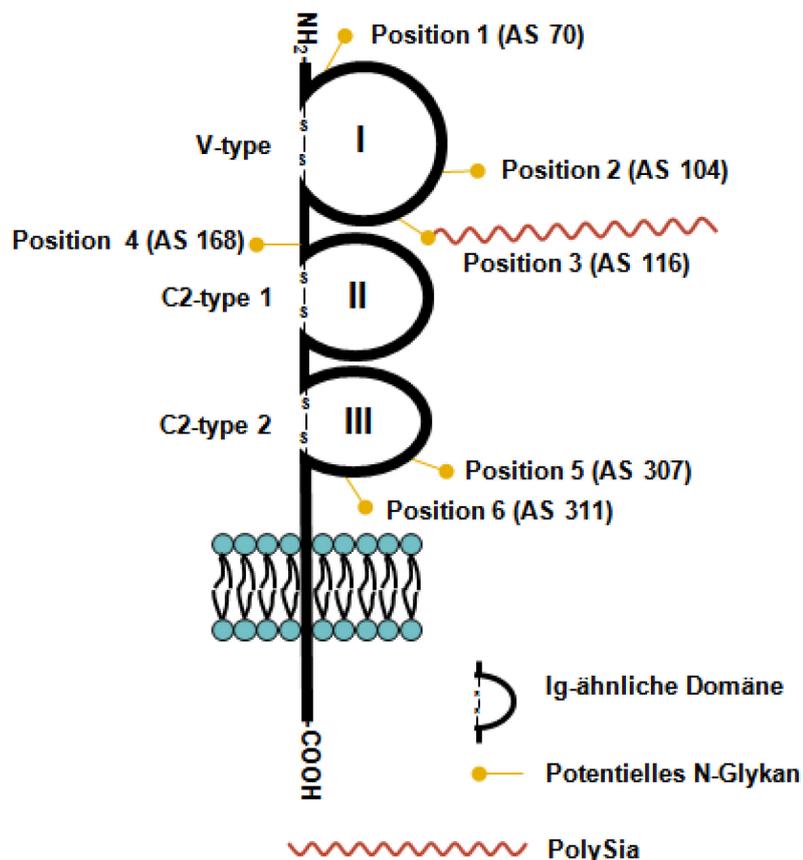


Abbildung 29: Schematische Darstellung von SynCAM1 und seiner potentiellen N-Glykosylierungsstellen

Die Abbildung zeigt eine PolySia-Kette an der dritten Position der ersten Ig-Domäne. Insgesamt besitzt SynCAM1 sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen

Im Anschluss stellte sich die Frage, an welcher Stelle bzw. welchen Stellen SynCAM1 polysialyliert wird. Die Datenbanksuche ergab, dass SynCAM1 sechs potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt. Um die Bindungsstelle(n) zu identifizieren, wurde PolySia-SynCAM1 tryptisch verdaut und jeweils vor und nach PNGaseF-Verdau mittels Massenspektrometrie gemessen (s. Abb. 24 u. Tab. 8). Nach Verdau zeigte sich eine zusätzliche Masse bei m/z 1377. Die anschließende Fragmentierungsanalyse bestätigte, dass es sich um die dritte N-Glykosylierungsstelle der ersten Ig-Domäne handelte. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass weitere N-Glykosylierungsstellen polysialyliert werden, die angewandten Methoden jedoch nicht sensitiv genug waren, um diese zu identifizieren. Für diesen Fall ist allerdings anzunehmen, dass die Menge der PolySia an diesen Glykosylierungsstellen sehr gering ist.

Nur 12 Aminosäuren entfernt liegt die zweite N-Glykosylierungsstelle, welche essentiell für eine homophile Interaktion von zwei SynCAM1-Molekülen ist. Aus diesem Grund liegt es nahe, dass die homophile Interaktion von SynCAM1 ähnlich wie bei NCAM durch die Polysialylierung inhibiert wird. Um diese mögliche Beeinflussung des SynCAM1-Bindungsverhaltens durch PolySia zu untersuchen, wurde weiterführend ein *Bead*-Aggregationsassay bei unserem Kooperationspartner in Hannover durchgeführt (s. Abb. 30). Im Falle einer Nicht-Polysialylierung konnte eine starke Aggregation durch homophile SynCAM1-Interaktionen demonstriert werden. Nach einer *in vitro* Polysialylierung durch die Polysialyltransferase ST8Siall oder IV konnte die Aggregation inhibiert bzw. vollständig aufgehoben werden, sodass nur noch *Monobeads* sichtbar waren. Die Entfernung von PolySia durch EndoN-Zugabe führte wiederum zu einer starken Aggregation zwischen den SynCAM1-Molekülen. Dieses Experiment zeigte, dass die Polysialylierung von SynCAM1 die homophilen Interaktionen einschränkt bzw. verhindert. Dies lässt vermuten, dass die PolySia eine regulierende Rolle in der Modulation von SynCAM1-Interaktionen spielt. Ferner könnte durch die Polysialylierung von SynCAM1 die Kommunikation zwischen NG2-Zellen und Neuronen reguliert werden. Dies ist anzunehmen, da bekannt ist, dass PolySia die Öffnungswahrscheinlichkeit von AMPA-Typ-Glutamatrezeptoren, jene Rezeptoren, durch die NG-Zellen synaptischen Input erhalten, steigert.

Um aber letztendlich sicherzugehen, dass die Polysialylierung von SynCAM1 nicht nur ein Artefakt nach dem KO von NCAM ist, sollte überprüft werden, ob PolySia-SynCAM1 auch im perinatalen Gehirn von WT-Mäusen exprimiert wird. Hierfür wurde die gesamte SynCAM-Fraktion aus WT- und NCAM-KO-Mäusen mittels Immunpräzipitation isoliert und für einen Western Blot gegen PolySia verwendet (s. Abb. 26). Dieser zeigte, dass SynCAM1 auch im Wildtyp polysialyliert wird und die Menge mit

der von NCAM-KO-Mäusen vergleichbar war. Somit wird SynCAM1 auch unter normalen physiologischen Bedingungen polysialyliert.

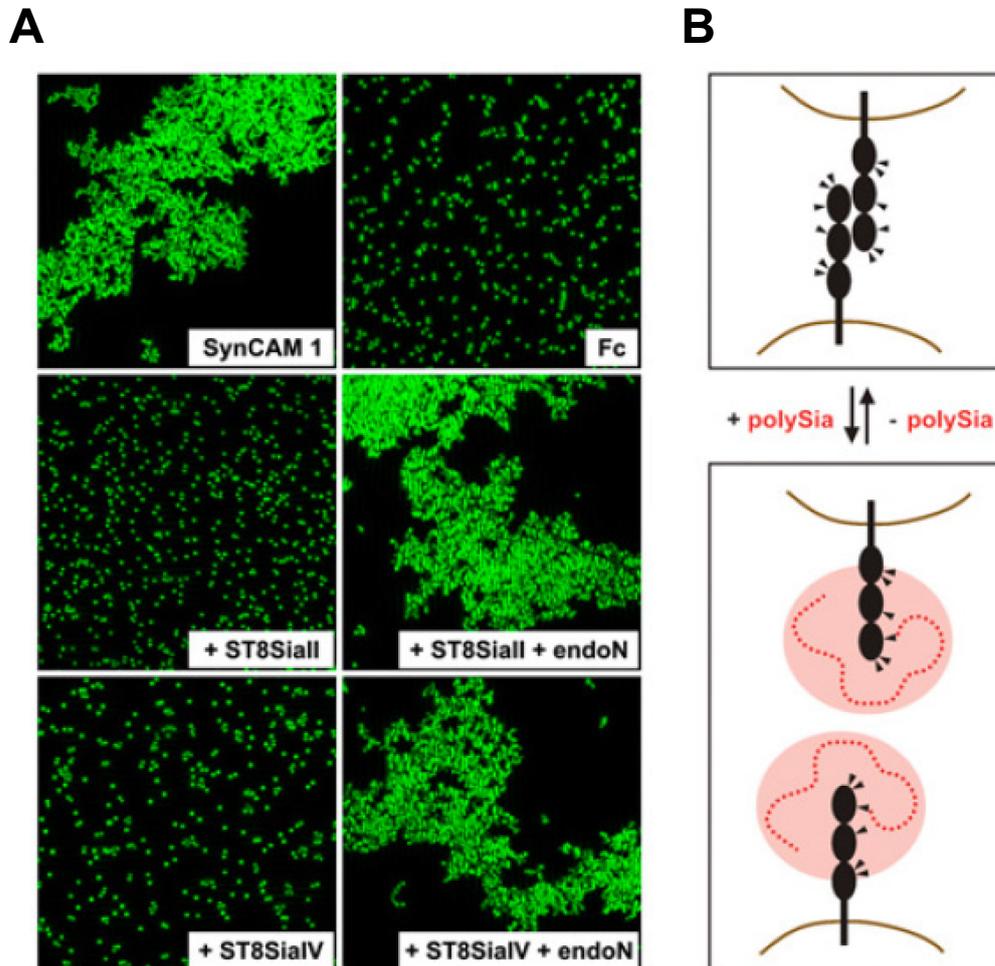


Abbildung 30: *in vitro* Polysialylierung von SynCAM1 im Bead-Aggregationsassay

In vitro Polysialylierung von SynCAM1 mittels ST8SialI und ST8SialIV. (A) Die homophilen SynCAM1-Bindungen werden durch Polysialylierung aufgehoben. Fluoreszierende Protein-A Beads wurden mit aufgereinigten SynCAM1-Fc-Chimären bzw. mit isolierten Fc-Fragmenten zur Kontrolle beladen. Das ausgeprägte SynCAM1-Clustering konnte durch ST8SialI- und ST8SialIV-Polysialylierung komplett aufgehoben werden. Nach PolySia-Entfernung mittels EndoN-Zugabe konnte dieser Effekt vollständig rückgängig gemacht werden. (B) Prospektives Model zur Veranschaulichung der Aufhebung von homophilen SynCAM1-Bindungen durch PolySia [223].

Doch welche Zellen im postnatalen murinen Gehirn exprimieren polysialyliertes SynCAM1? Dieser Fragestellung sind ebenfalls unsere Kooperationspartner aus Hannover nachgegangen. Die Versuche zeigten, dass PolySia-SynCAM1 exklusiv auf einer Untergruppe von NG2-Zellen exprimiert wurde (s. Abb. 31). Diese Gliazellen unterscheiden sich in ihren Oberflächenmarkern und Funktionen von reifen

Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia und machen bis zu 5-10% aller Glia im sich entwickelnden und reifen ZNS aus. Sie sind im gesamten unreifen und reifen Gehirn in der grauen und weißen Substanz verstreut und werden als multipotenter Vorläuferpool angesehen, welcher sich in jedem Alter zu Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen entwickeln kann. Aus diesem Grund werden sie auch als *oligodendrocyte progenitor cells* (OPCs) bezeichnet [224-230]. Eine Gemeinsamkeit der OPCs ist, dass sie das Proteoglykan NG2 exprimieren, welches zur Identifikation genutzt wird. Studien konnten zeigen, dass bestimmte neuronale Vorläuferzellen in der SVZ neben NG2 auch PolySia-NCAM koexprimieren [229, 231]. Ein möglicher Ansatz für weitere Projekte könnte hier aus Studien bestehen, welche prüfen, ob eine synchrone Expression von PolySia-SynCAM1 und PolySia-NCAM auf diesen NG2 Zellen nachgewiesen werden kann. Des Weiteren wäre die Erforschung von NCAM-SynCAM1-Interaktionen ein interessanter Ansatz.

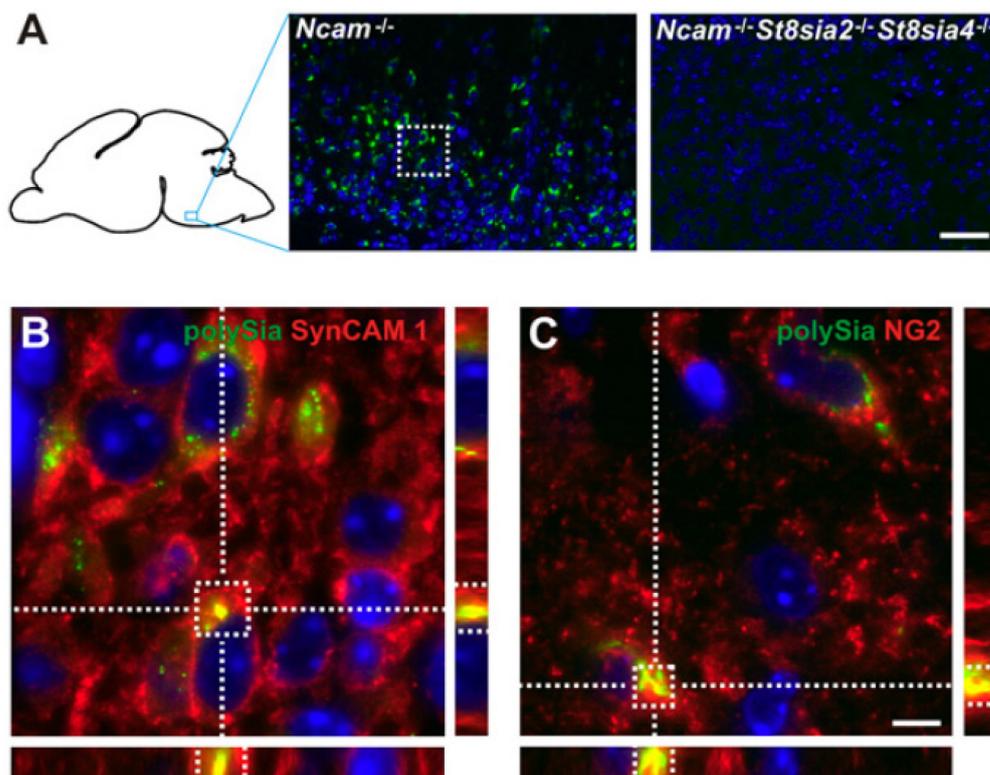


Abbildung 31: PolySia-SynCAM1 wird auf NG2-Zellen exprimiert

(A) zeigt reichlich PolySia (angefärbt mit mAb 735; grün). Die Negativkontrolle in der Triple-KO-Maus zeigt keine Anfärbung. (B) Die Vergrößerung des markierten Bereiches aus A zeigt die Besiedlung mit PolySia (mAb 735; grün) und SynCAM1 (mAb 3E1; rot). (C) Besiedlung mit PolySia (grün) und NG2 (NG2-Ab). Die Zellkerne sind blau angefärbt [223].

Bemerkenswerterweise kann eine Untergruppe der NG2-Zellen die präsynaptische Spezialisierung zu Neuronen begünstigen, was zu einer einzigartigen Verbindung zwischen NG2-Zellen und Neuronen führt [232].

Ferner hat PolySia das Potential die Kommunikation zwischen NG2-Zellen und Neuronen zu regulieren, da bekannt ist, dass PolySia die Öffnungswahrscheinlichkeit von AMPA-Typ Glutamat-Rezeptoren, jene Rezeptoren, durch die NG-Zellen synaptischen Input erhalten, steigert [233-235]. Diese Studien zeigen auch, dass der Effekt altersabhängig ist und hauptsächlich im frühen postnatalen Hippokampus detektiert werden kann, genau der Region in der auch SynCAM1 exprimiert wird. Da AMPA-Rezeptoren wichtige Rollen bei der synaptischen Plastizität zugeschrieben werden, könnte über diesen Mechanismus eine Regulation erfolgen.

Darüber hinaus führt eine Aktivierung der Glutamat-Rezeptoren auf NG2-Zellen zu einer Hemmung der Zellproliferation. Ein Dauerstimulus kann die Degeneration der betroffenen Zellen bedeuten [236, 237]. PolySia könnte somit eine Proliferationshemmung der NG2-Zellen bewirken und somit am ehesten negativen Einfluss auf die Regeneration von Hirnläsionen haben. Unterstützt werden diese Theorien durch Ergebnisse welche zeigen, dass eine Reduktion von PolySia zu einer vermehrten Differenzierung von OPCs führt und dadurch eine beschleunigte initiale Remyelinisierung registriert werden kann [238].

Der wirkliche Einfluss bzw. die Funktion von polysialyliertem SynCAM1 auf NG2-Zellen und auch das mögliche Vorhandensein von polysialylierten SynCAM1 auf anderen Zelltypen sowie deren pathologische Relevanz bedarf jedoch noch weiterführenden Studien.

Basierend auf den beschriebenen Ergebnissen dieser Arbeit konnten weiterführende Forschungen unserer Gruppe und unserer Kooperationspartnern von der MHH zeigen, dass murines SynCAM1 anscheinend ausschließlich von der Polysialyltransferase ST8Siall polysialyliert wird [188]. Dies demonstriert wie spezifisch und selektiv die Polysialylierung ist. Innerhalb dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass alle acht während dieser Zeit transkribierten Isoformen polysialyliert werden, für eine funktionierende Polysialylierung aber mindestens die erste und zweite Ig-Domäne vorhanden sein müssen. Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass die Polysialylierung von Molekülen, unabhängig davon ob physiologisch oder pathologisch, im Gehirn oder in anderen Körperabschnitten, sehr selektiv abzulaufen scheint.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass SynCAM1 neben dem seit langem bekannten NCAM ein neues Ziel der Polysialylierung im perinatalen Mäusegehirn darstellt. Mittels verschiedener biochemischer Methoden gelangen die Identifikation der Glykosylierungsstelle, eine quantitative Beurteilung der gebundenen PolySia sowie der Nachweis, dass PolySia-SynCAM1 die Adhäsion zwischen neuronalen Zellen reguliert.

7. Zusammenfassung

Sialinsäuren lassen sich als posttranslationale Modifikationen in fast allen Glykokonjugaten von Vertebraten in Form von Monosialinsäuren nachweisen. Im Gegensatz hierzu wurde Polysialinsäure (PolySia), ein lineares Homopolymer aus α 2,8-verknüpften *N*-Acetylneuraminsäureresten, an lediglich vier Glykoproteinen beobachtet, wobei das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) das Bedeutendste ist. Die Polysialylierung von NCAM beeinflusst essentielle Funktionen, beispielsweise die Synaptogenese, das neurale *pathfinding* und die synaptische Plastizität. Folglich lassen sich die höchsten PolySia-Level während der Gehirnentwicklung und -reifung nachweisen. Des Weiteren spielt PolySia-NCAM eine Rolle in pathologischen Prozessen wie der Tumorgenese (Glioblastom, multiples Myelom), der Schizophrenie und neuronalen Reparaturprozessen. Die Tatsache, dass ein vollständiges Fehlen bei Knock-out-Mäusen zu einem frühen Tod führt, unterstreicht die Bedeutsamkeit von PolySia in Vertebraten.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben NCAM auch das synaptische Zelladhäsionsmolekül SynCAM1 im perinatalen Mäusegehirn polysialyliert wird. Bei SynCAM1 handelt es sich ebenfalls um ein Adhäsionsprotein, welches die Gehirnentwicklung und insbesondere die Synaptogenese beeinflusst. SynCAM1 ist auch in weiteren Organen, bzw. Geweben (Hoden, Lunge und Leber) beschrieben und an wichtigen physiologischen Regulationsmechanismen, u.a. in der Tumorgenese des Mammakarzinoms, des Hepatozellulären Karzinoms sowie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms beteiligt.

Für die Identifikation des potentiellen polysialylierten Proteins wurden Gehirnlysate von postnatalen NCAM-Knock-out-Mäusen verwendet. Das durch Immunpräzipitation isolierte Protein konnte mittels Massenspektrometrie als SynCAM1 identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass SynCAM1 sowohl in Abwesenheit, als auch physiologisch in der Gegenwart von NCAM *in vivo* polysialyliert wird und somit davon ausgegangen werden kann, dass es an der Gehirnentwicklung beteiligt ist. Weiterführende Versuche zeigten, dass die PolySia bei SynCAM1 an N-Glykanen der ersten IG-Domäne gebunden ist und sich aus mehr als 40 Sialinsäuren zusammensetzen kann.

Dies ist die erste Arbeit, welche polysialyliertes SynCAM1 als einen weiteren Träger von PolySia während der neuronalen Entwicklung nachweisen konnte. Weitere Forschungsarbeiten sind aber nötig, um die genaue funktionelle Rolle von

polysialyliertem SynCAM1 innerhalb und vielleicht auch außerhalb des neuronalen Systems zu charakterisieren.

8. Summary

Sialic acids are found as post-translational modifications in nearly all glycoconjugates of vertebrates and mostly occur as monosialyl units. In contrast, polysialic acid (polySia), a linear homopolymer of α 2,8-linked *N*-acetylneuraminic acid, was only detected in four glycoproteins and the neural cell adhesion molecule (NCAM) represents its main carrier. The polysialylation of NCAM affects essential functions such as synaptogenesis, neural pathfinding and synaptic plasticity. Consequently, the highest levels of polySia can be detected during brain development and maturation. Furthermore, polysialylated NCAM plays a role in pathological processes like tumorigenesis (glioblastoma, multiple myeloma), schizophrenia and neuronal repair processes. The fact that a complete absence in knockout-mice leads to an early death highlights the importance of polySia in vertebrates.

The present thesis showed that the synaptic cell adhesion molecule SynCAM1 is polysialylated besides NCAM in the perinatal mouse brain. SynCAM1 is an adhesion protein, which affects the brain maturation and particularly the synaptogenesis. SynCAM1 is also described in other organs (testes, lung and liver) and is involved in physiological key mechanisms including the tumorigenesis of breast cancer, the hepatocellular carcinoma and small cell lung cancer.

For the identification of further potential polysialylated proteins brain lysates of postnatal NCAM-knockout-mice were used. The polySia carrier was isolated by immune-precipitation and generated tryptic peptide mass fingerprint led to the identification of SynCAM1. The results showed that SynCAM1 is polysialated both in the absence and in the presence of NCAM *in vivo*. Thus, the polysialylated form of SynCAM1 may influence the brain development. Further experiments showed that polySia was linked to N-glycans of the first IG-domain and consisted of more than 40 sialic acid residues.

This is the first study, which described polysialylated SynCAM1 as a further target of polysialylation during the neural development. However additional studies are needed to characterize the precise function of polySia-SynCAM1 in the neural system and other physiological processes.

9. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
ATL	Akute T-Zelleukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Vom Hirn abstammender neurotropher Faktor (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
C	Konstant
Cadms	Zelladhäsionsmolekül (Mausgen)
CADM	Zelladhäsionsmolekül (Humangen)
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
DMB	1,2-Diamino-4,5-Methylendioxybenzol
EndoN	Endoneuraminidase
ESI	Elektrospray-Ionisation
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGFR	Fibroblast-Wachstums-Faktor-Rezeptor (<i>fibroblast growth factorreceptor</i>)
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GDNF	Von Gliazellen abstammender neurotropher Faktor (<i>glial cellline-derived neurotrophic factor</i>)
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HCC	Hepatozelluläres Karzinom [^]
HUGO	<i>Human Genome Organization</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Ig	Immunglobulin
I	Intermediär
IGSF	Immunglobulin Superfamilie
KDN	Deaminoneuraminsäure
KO	Knock-out
L	<i>Large</i>
LC	Flüssigkeitschromatographie
M	Motiv
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte-Laserdesorption-Ionisation- <i>time of flight</i>
MS	Massenspektrometrie
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Necl	Nektin ähnliches Protein

Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glykolyneuraminsäure
NMR	Kernmagnetische Resonanz Spektroskopie
NRP-2	Neuropilin-2
OligoSia	Oligosialinsäure
OPCs	<i>oligodendrocyte progenitor cells</i>
PNS	Peripheres Nervensystem
PolySia	Polysialinsäure
PolySia-NCAM	Polysialyliertes NCAM
PolySia-SynCAM	Polysialyliertes SynCAM
PSPG	Polysialoglykoprotein
PST-Domäne	Polysialyltransferasen-Domäne
RG	Reaktionsgefäß
RT	Raumtemperatur
S	<i>Small</i>
SCLC	<i>small cell lung cancer</i>
SgIGSF	<i>Spermatogenic immunoglobulin superfamily member</i>
ST	Sialyltransferase
SVZ	Subventrikuläre Zone
SynCAM	synaptisches Zelladhäsionsmolekül
SiaM	Sialylierungsmotiv
TM	Transmembrandomäne
TSLC	<i>Tumorsuppressor in lung cancer</i>
TSLL	<i>TSLC-like gene</i>
ü.N.	über Nacht
V	Variabel
VS	<i>Very small</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

10. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Strukturen der drei häufigsten Sialinsäuren</i>	1
<i>Abbildung 2: Struktur α2,8-verknüpfter N-Acetylneuraminsäuren</i>	2
<i>Abbildung 3: Isoformen von NCAM</i>	6
<i>Abbildung 4: Schematisierte Darstellung der PolySia-Expression im Säuger in Abhängigkeit zur Entwicklungsstufe (Darstellung modifiziert nach Rutishauer, U., [33])</i>	7
<i>Abbildung 5: Primärstruktur der Polysialyltransferasen ST8SialI und ST8SialIV</i>	10
<i>Abbildung 6: Expression von ST8SialI und IV im WT in Relation zum PolySia- und NCAM-Level</i>	12
<i>Abbildung 7: Schematische Struktur von SynCAM1</i>	17
<i>Abbildung 8: Heterophile Interaktionen der SynCAM-Familie</i>	20
<i>Abbildung 9: Schematische Darstellung der Antikörperfärbung</i>	32
<i>Abbildung 10: Schematische Darstellung der Kopplung von Magnetic Beads und Antikörpern</i>	34
<i>Abbildung 11: Beispiel einer Kalibriergrade zur Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	46
<i>Abbildung 12: SDS-Gel und Western Blot von Wildtyp- (WT) und NCAM-KO-Mäuse-gehirnen</i>	48
<i>Abbildung 13: SDS-Gel und Western Blot von Wild-Typ- (WT) und NCAM-KO-Mäuse-gehirnen</i>	49
<i>Abbildung 14: DMB-HPLC Analysen von WT- und NCAM-KO-Mäusegehirnen</i>	50
<i>Abbildung 15: Beständigkeitsprüfung des polysialylierten Proteins</i>	52
<i>Abbildung 16: Kontroll - Western Blot nach der ersten Immunpräzipitation</i>	53
<i>Abbildung 17: Kontroll-Silbergel nach der ersten Immunpräzipitation</i>	55
<i>Abbildung 18: Identifikation des polysialylierten Proteins mittels Massenspektrometrie</i>	59
<i>Abbildung 19: Identifikation des polysialylierten Proteins mittels Massenspektrometrie</i>	60
<i>Abbildung 20: Western Blot gegen SynCAM1 nach Immunpräzipitation mit mAk 735</i>	61
<i>Abbildung 21: Anti-PolySia Western Blot nach PNGaseF-Verdau und IP Anti-PolySia</i>	63
<i>Abbildung 22: Anti-SynCAM1 Western Blot nach PNGaseF-Verdau und IP Anti-PolySia</i>	63
<i>Abbildung 23: Aminosäuresequenz von SynCAM1</i>	65
<i>Abbildung 24: Identifikation der N-Glykosylierungsstelle</i>	67
<i>Abbildung 25: Nachweis von PolySia-SynCAM1 in WT- und NCAM-KO-Maus</i>	69
<i>Abbildung 26: Nachweis von PolySia-SynCAM1 im WT</i>	69
<i>Abbildung 27: Anfärbung von PolySia vor (-) und nach (+) Immunpräzipitation</i>	71
<i>Abbildung 28: Anfärbung von (A) SynCAM und (B) SynCAM1 vor (-) und nach (+) Immunpräzipitation</i> ...	71
<i>Abbildung 29: Schematische Darstellung von SynCAM1 und seiner potentiellen N-Glykosylierungsstellen</i>	75
<i>Abbildung 30: in vitro Polysialylierung von SynCAM1 im Bead-Aggregationsassay</i>	77
<i>Abbildung 31: PolySia-SynCAM1 wird auf NG2-Zellen exprimiert</i>	78

11. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Bisher bekannte PolySia-Träger (Darstellung modifiziert nach Galuska, S. P.)</i>	4
<i>Tabelle 2: Phänotyp von NCAM-KO-Mäusen</i>	15
<i>Tabelle 3: Nomenklatur der CADM – Genfamilie</i>	16
<i>Tabelle 4: WT Gehirne</i>	22
<i>Tabelle 5: NCAM-KO-Gehirne</i>	23
<i>Tabelle 6: Reaktionsgefäß-Schema für die Immunpräzipitation</i>	37
<i>Tabelle 7: Schema der Ankonzentrierung</i>	56
<i>Tabelle 8: SynCAM1-Peptidmassen nach simuliertem tryptischen Verdau</i>	66

12. Literaturverzeichnis

1. Varki, A. and T. Angata, *Siglecs--the major subfamily of I-type lectins*. *Glycobiology*, 2006. **16**(1): p. 1R-27R.
2. Kelm, S. and R. Schauer, *Sialic acids in molecular and cellular interactions*. *Int Rev Cytol*, 1997. **175**: p. 137-240.
3. Green, P.J., et al., *Further studies of the binding specificity of the leukocyte adhesion molecule, L-selectin, towards sulphated oligosaccharides--suggestion of a link between the selectin- and the integrin-mediated lymphocyte adhesion systems*. *Glycobiology*, 1995. **5**(1): p. 29-38.
4. Crocker, P.R., J.C. Paulson, and A. Varki, *Siglecs and their roles in the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(4): p. 255-66.
5. Ohtsubo, K. and J.D. Marth, *Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease*. *Cell*, 2006. **126**(5): p. 855-67.
6. Varki, A., *Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins*. *Nature*, 2007. **446**(7139): p. 1023-9.
7. Schauer, R., *Achievements and challenges of sialic acid research*. *Glycoconj J*, 2000. **17**(7-9): p. 485-99.
8. Varki, N.M. and A. Varki, *Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease*. *Lab Invest*, 2007.
9. Gregoriadis, G., et al., *Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids*. *Int J Pharm*, 2005. **300**(1-2): p. 125-30.
10. Jain, S., et al., *Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1622**(1): p. 42-9.
11. Constantinou, A., et al., *Site-Specific Polysialylation of an Antitumor Single-Chain Fv Fragment*. *Bioconjug Chem*, 2009.
12. Finne, J., *Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(20): p. 11966-70.
13. Angata, T. and A. Varki, *Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective*. *Chem Rev*, 2002. **102**(2): p. 439-69.
14. Schauer, R., *Sialic acids: fascinating sugars in higher animals and man*. *Zoology (Jena)*, 2004. **107**(1): p. 49-64.
15. Sato, C., *Chain length diversity of sialic acids and its biological significance*. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 2004. **16**(91): p. 331-344.
16. Cheng, M.C., et al., *High-performance capillary electrophoretic characterization of different types of oligo- and polysialic acid chains*. *Anal Biochem*, 1998. **260**(2): p. 154-9.
17. Cheng, M.C., et al., *Hydrolysis, lactonization, and identification of alpha(2 --> 8)/alpha(2 --> 9) alternatively linked tri-, tetra-, and polysialic acids*. *Glycobiology*, 2004. **14**(2): p. 147-55.
18. Bruses, J.L. and U. Rutishauser, *Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development*. *Biochimie*, 2001. **83**(7): p. 635-43.
19. Rutishauser, U. and L. Landmesser, *Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions*. *Trends Neurosci*, 1996. **19**(10): p. 422-7.
20. Finne, J. and P.H. Makela, *Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(2): p. 1265-70.

21. Inoue, S. and Y. Inoue, *Developmental profile of neural cell adhesion molecule glycoforms with a varying degree of polymerization of polysialic acid chains*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31863-70.
22. Inoue, S. and Y. Inoue, *Ultrasensitive analysis of sialic acids and oligo/polysialic acids by fluorometric high-performance liquid chromatography*. Methods Enzymol, 2003. **362**: p. 543-60.
23. Inoue, S. and Y. Inoue, *A challenge to the ultrasensitive chemical method for the analysis of oligo- and polysialic acids at a nanogram level of colominic acid and a milligram level of brain tissues*. Biochimie, 2001. **83**(7): p. 605-13.
24. Nakata, D. and F.A. Troy, 2nd, *Degree of polymerization (DP) of polysialic acid (polySia) on neural cell adhesion molecules (N-CAMS): development and application of a new strategy to accurately determine the DP of polySia chains on N-CAMS*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38305-16.
25. Di Cristo, G., et al., *Activity-dependent PSA expression regulates inhibitory maturation and onset of critical period plasticity*. Nat Neurosci, 2007. **10**(12): p. 1569-77.
26. Seki, T., *Microenvironmental elements supporting adult hippocampal neurogenesis*. Anat Sci Int, 2003. **78**(2): p. 69-78.
27. Landmesser, L., et al., *Distinct roles for adhesion molecules during innervation of embryonic chick muscle*. Dev Biol, 1988. **130**(2): p. 645-70.
28. Seki, T. and Y. Arai, *Distribution and possible roles of the highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) in the developing and adult central nervous system*. Neurosci Res, 1993. **17**(4): p. 265-90.
29. Seki, T., *Polysialic acid-expressing cells in adult neurogenesis*. Trends in Glycoscience and glycochemistry, 2004. **16**(91): p. 319-330.
30. Bonfanti, L., *PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis*. Prog Neurobiol, 2006. **80**(3): p. 129-64.
31. Nothias, F., et al., *Modulation of NCAM polysialylation is associated with morphofunctional modifications in the hypothalamo-neurohypophysial system during lactation*. Eur J Neurosci, 1997. **9**(8): p. 1553-65.
32. Cremer, H., et al., *PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity*. Int J Dev Neurosci, 2000. **18**(2-3): p. 213-20.
33. Rutishauser, U., *Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2007.
34. El Maarouf, A., A.K. Petridis, and U. Rutishauser, *Use of polysialic acid in repair of the central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16989-94.
35. Glass, J.D., et al., *Polysialylated neural cell adhesion molecule modulates photic signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus*. Neurosci Lett, 2000. **280**(3): p. 207-10.
36. Glass, J.D., et al., *Dynamic regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the suprachiasmatic nucleus*. Neuroscience, 2003. **117**(1): p. 203-11.
37. Fedorkova, L., et al., *Removal of polysialic acid from the SCN potentiates nonphotic circadian phase resetting*. Physiol Behav, 2002. **77**(2-3): p. 361-9.
38. Troy, F.A., 2nd, *Polysialylation: from bacteria to brains*. Glycobiology, 1992. **2**(1): p. 5-23.
39. Kleene, R. and M. Schachner, *Glycans and neural cell interactions*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(3): p. 195-208.
40. Comstock, L.E. and D.L. Kasper, *Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses*. Cell, 2006. **126**(5): p. 847-50.

41. Miyata, S., C. Sato, and K. Kitajima, *Glycobiology of Polysialic Acid on Sea Urchin Gametes*. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2007. **19**(106): p. 85-98.
42. Timoszyk, A., Z. Gdaniec, and L. Latanowicz, *The effect of polysialic acid on molecular dynamics of model membranes studied by ³¹P NMR spectroscopy*. Solid State Nucl Magn Reson, 2004. **25**(1-3): p. 142-5.
43. Janas, T., et al., *Translocation of polysialic acid across model membranes: kinetic analysis and dynamic studies*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(1): p. 163-73.
44. James, W.M. and W.S. Agnew, *Multiple oligosaccharide chains in the voltage-sensitive Na channel from electrophorus electricus: evidence for alpha-2,8-linked polysialic acid*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(2): p. 817-26.
45. Zuber, C., et al., *Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain*. J Biol Chem, 1992. **267**(14): p. 9965-71.
46. Curreli, S., et al., *Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions*. J Biol Chem, 2007.
47. Yabe, U., et al., *Polysialic acid in human milk. CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13875-80.
48. Miyata, S., et al., *A major flagellum sialoglycoprotein in sea urchin sperm contains a novel polysialic acid, an alpha2,9-linked poly-N-acetylneuraminic acid chain, capped by an 8-O-sulfated sialic acid residue*. Glycobiology, 2004. **14**(9): p. 827-40.
49. Miyata, S., et al., *Flagelliasialin: a novel sulfated alpha2,9-linked polysialic acid glycoprotein of sea urchin sperm flagella*. Glycobiology, 2006. **16**(12): p. 1229-41.
50. Sato, C., et al., *Structural diversity in the alpha 2-->8-linked polysialic acid chains in salmonid fish egg glycoproteins. Occurrence of poly(Neu5Ac), poly(Neu5Gc), poly(Neu5Ac, Neu5Gc), poly(KDN), and their partially acetylated forms*. J Biol Chem, 1993. **268**(31): p. 23675-84.
51. Robbins, J.B., et al., *Escherichia coli K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis*. N Engl J Med, 1974. **290**(22): p. 1216-20.
52. Bhattacharjee, A.K., et al., *Structural determination of the sialic acid polysaccharide antigens of Neisseria meningitidis serogroups B and C with carbon 13 nuclear magnetic resonance*. J Biol Chem, 1975. **250**(5): p. 1926-32.
53. Rutishauser, U., et al., *The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions*. Science, 1988. **240**(4848): p. 53-7.
54. Thiery, J.P., et al., *Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina*. J Biol Chem, 1977. **252**(19): p. 6841-5.
55. Brackenbury, R., et al., *Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding*. J Biol Chem, 1977. **252**(19): p. 6835-40.
56. Walsh, F.S. and P. Doherty, *Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 425-56.
57. Rutishauser, U., et al., *Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(2): p. 577-81.
58. Walmod, P.S., et al., *Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction*. Neurochem Res, 2004. **29**(11): p. 2015-35.

59. Franceschini, I., et al., *Polysialyltransferase ST8Sia II (STX) polysialylates all of the major isoforms of NCAM and facilitates neurite outgrowth*. *Glycobiology*, 2001. **11**(3): p. 231-9.
60. He, H.T., J. Finne, and C. Goridis, *Biosynthesis, membrane association, and release of N-CAM-120, a phosphatidylinositol-linked form of the neural cell adhesion molecule*. *J Cell Biol*, 1987. **105**(6 Pt 1): p. 2489-500.
61. Kojima, N., Y. Tachida, and S. Tsuji, *Two polysialic acid synthases, mouse ST8Sia II and IV, synthesize different degrees of polysialic acids on different substrate glycoproteins in mouse neuroblastoma Neuro2a cells*. *J Biochem (Tokyo)*, 1997. **122**(6): p. 1265-73.
62. Angata, K., M. Suzuki, and M. Fukuda, *Differential and cooperative polysialylation of the neural cell adhesion molecule by two polysialyltransferases, PST and STX*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(43): p. 28524-32.
63. Nelson, R.W., P.A. Bates, and U. Rutishauser, *Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(29): p. 17171-9.
64. Liedtke, S., et al., *Characterization of N-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule*. *Glycobiology*, 2001. **11**(5): p. 373-84.
65. Wuhrer, M., et al., *Localization of defined carbohydrate epitopes in bovine polysialylated NCAM*. *Biochimie*, 2003. **85**(1-2): p. 207-18.
66. Kiss, J.Z. and G. Rougon, *Cell biology of polysialic acid*. *Curr Opin Neurobiol*, 1997. **7**(5): p. 640-6.
67. El Maarouf, A., et al., *Polysialic acid-induced plasticity reduces neuropathic insult to the central nervous system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(32): p. 11516-20.
68. Durbec, P. and H. Cremer, *Revisiting the function of PSA-NCAM in the nervous system*. *Mol Neurobiol*, 2001. **24**(1-3): p. 53-64.
69. Maness, P.F. and M. Schachner, *Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(1): p. 19-26.
70. Polo-Parada, L., et al., *NCAM 180 acting via a conserved C-terminal domain and MLCK is essential for effective transmission with repetitive stimulation*. *Neuron*, 2005. **46**(6): p. 917-31.
71. Probstmeier, R., A. Bilz, and J. Schneider-Schaulies, *Expression of the neural cell adhesion molecule and polysialic acid during early mouse embryogenesis*. *J Neurosci Res*, 1994. **37**(3): p. 324-35.
72. Kurosawa, N., et al., *Polysialic acid synthase (ST8Sia II/STX) mRNA expression in the developing mouse central nervous system*. *J Neurochem*, 1997. **69**(2): p. 494-503.
73. Oltmann-Norden, I., et al., *Impact of the polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(3): p. 1463-71.
74. Gascon, E., L. Vutskits, and J.Z. Kiss, *Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: From synapses to integration of new neurons*. *Brain Res Rev*, 2007.
75. Rothbard, J.B., et al., *Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains*. *J Biol Chem*, 1982. **257**(18): p. 11064-9.
76. Becker, C.G., et al., *The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation*. *J Neurosci Res*, 1996. **45**(2): p. 143-52.
77. Muller, D., et al., *PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity*. *Neuron*, 1996. **17**(3): p. 413-22.

78. Fox, G.B., et al., *Consolidation of passive avoidance learning is associated with transient increases of polysialylated neurons in layer II of the rat medial temporal cortex*. J Neurobiol, 2000. **45**(3): p. 135-41.
79. Ronn, L.C., V. Berezin, and E. Bock, *The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing*. Int J Dev Neurosci, 2000. **18**(2-3): p. 193-9.
80. Sandi, C., et al., *Rapid reversal of stress induced loss of synapses in CA3 of rat hippocampus following water maze training*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(11): p. 2447-56.
81. Nacher, J., et al., *Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex*. Neuroscience, 2004. **126**(2): p. 503-9.
82. Mikkonen, M., et al., *Hippocampal plasticity in Alzheimer's disease*. Rev Neurosci, 2001. **12**(4): p. 311-25.
83. Hayashi, T., et al., *Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion*. Brain Res, 2001. **907**(1-2): p. 130-3.
84. Iwai, M., et al., *Induction of highly polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in postischemic gerbil hippocampus mainly dissociated with neural stem cell proliferation*. Brain Res, 2001. **902**(2): p. 288-93.
85. Sato, C., T. Matsuda, and K. Kitajima, *Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(47): p. 45299-305.
86. Sato, C., et al., *Identification and adipocyte differentiation-dependent expression of the unique disialic acid residue in an adipose tissue-specific glycoprotein, adipo Q*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28849-56.
87. Emery, D.L., et al., *Plasticity following injury to the adult central nervous system: is recapitulation of a developmental state worth promoting?* J Neurotrauma, 2003. **20**(12): p. 1271-92.
88. Dubeau, V., et al., *Polysialylation of NCAM is upregulated by hyperthermia and participates in heat shock preconditioning-induced neuroprotection*. Neurobiol Dis, 2007. **26**(2): p. 385-95.
89. Hu, H., *Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain*. Neuron, 1999. **23**(4): p. 703-11.
90. Tomasiewicz, H., et al., *Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system*. Neuron, 1993. **11**(6): p. 1163-74.
91. Cremer, H., et al., *Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning*. Nature, 1994. **367**(6462): p. 455-9.
92. Gascon, E., et al., *PSA-NCAM in postnatally generated immature neurons of the olfactory bulb: a crucial role in regulating p75 expression and cell survival*. Development, 2007. **134**(6): p. 1181-90.
93. Charles, P., et al., *Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7585-90.
94. Charles, P., et al., *Re-expression of PSA-NCAM by demyelinated axons: an inhibitor of remyelination in multiple sclerosis?* Brain, 2002. **125**(Pt 9): p. 1972-9.
95. Fewou, S.N., et al., *Down-regulation of polysialic acid is required for efficient myelin formation*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16700-11.
96. Jakovcevski, I., Z. Mo, and N. Zecevic, *Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain*. Neuroscience, 2007.

97. Hildebrandt, H., M. Muhlenhoff, and R. Gerardy-Schahn, *Polysialylation of NCAM*. Neurochem Res, 2008.
98. Scheidegger, E.P., et al., *In vitro and in vivo growth of clonal sublines of human small cell lung carcinoma is modulated by polysialic acid of the neural cell adhesion molecule*. Lab Invest, 1994. **70**(1): p. 95-106.
99. Perl, A.K., et al., *Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic beta tumor cells*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 286-91.
100. Vawter, M.P., *Dysregulation of the neural cell adhesion molecule and neuropsychiatric disorders*. Eur J Pharmacol, 2000. **405**(1-3): p. 385-95.
101. Brennaman, L.H. and P.F. Maness, *NCAM in Neuropsychiatric and Neurodegenerative Disorders*. Neurochem Res, 2008.
102. Arai, M., et al., *Association between polymorphisms in the promoter region of the sialyltransferase 8B (SIAT8B) gene and schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(7): p. 652-9.
103. Sullivan, P.F., et al., *NCAM1 and neurocognition in schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2007. **61**(7): p. 902-10.
104. Tao, R., et al., *Positive association between SIAT8B and schizophrenia in the Chinese Han population*. Schizophr Res, 2007. **90**(1-3): p. 108-14.
105. Hildebrandt, H., et al., *Imbalance of neural cell adhesion molecule and polysialyltransferase alleles causes defective brain connectivity*. Brain, 2009. **132**(Pt 10): p. 2831-8.
106. Weinhold, B., et al., *Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42971-7.
107. Begre, S., et al., *White matter anisotropy related to electrophysiology of first episode schizophrenia during NoGo inhibition*. Neurobiol Dis, 2008. **30**(2): p. 270-80.
108. Innocenti, G.M., F. Ansermet, and J. Parnas, *Schizophrenia, neurodevelopment and corpus callosum*. Mol Psychiatry, 2003. **8**(3): p. 261-74.
109. Dubeau, V. and J.M. Fritschy, *PSA-NCAM-dependent GDNF signaling limits neurodegeneration and epileptogenesis in temporal lobe epilepsy*. Eur J Neurosci, 2010. **32**(1): p. 89-98.
110. Rao, Y., et al., *Structural characterization of a homophilic binding site in the neural cell adhesion molecule*. J Biol Chem, 1993. **268**(27): p. 20630-8.
111. Rao, Y., et al., *Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM*. J Cell Biol, 1992. **118**(4): p. 937-49.
112. Johnson, C.P., et al., *Direct evidence that NCAM polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion*. J Biol Chem, 2004.
113. Fujimoto, I., J.L. Bruses, and U. Rutishauser, *Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31745-51.
114. Johnson, C.P., et al., *Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 137-45.
115. Paratcha, G., F. Ledda, and C.F. Ibanez, *The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands*. Cell, 2003. **113**(7): p. 867-79.
116. Kiselyov, V.V., et al., *Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP*. Structure, 2003. **11**(6): p. 691-701.

117. Saffell, J.L., et al., *Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs*. *Neuron*, 1997. **18**(2): p. 231-42.
118. Grumet, M., A. Flaccus, and R.U. Margolis, *Functional characterization of chondroitin sulfate proteoglycans of brain: interactions with neurons and neural cell adhesion molecules*. *J Cell Biol*, 1993. **120**(3): p. 815-24.
119. Milev, P., et al., *Interactions of the chondroitin sulfate proteoglycan phosphacan, the extracellular domain of a receptor-type protein tyrosine phosphatase, with neurons, glia, and neural cell adhesion molecules*. *J Cell Biol*, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1703-15.
120. Friedlander, D.R., et al., *The neuronal chondroitin sulfate proteoglycan neurocan binds to the neural cell adhesion molecules Ng-CAM/L1/NILE and N-CAM, and inhibits neuronal adhesion and neurite outgrowth*. *J Cell Biol*, 1994. **125**(3): p. 669-80.
121. Retzler, C., W. Gohring, and U. Rauch, *Analysis of neurocan structures interacting with the neural cell adhesion molecule N-CAM*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(44): p. 27304-10.
122. Kiselyov, V.V., et al., *Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR*. *J Neurochem*, 2005. **94**(5): p. 1169-79.
123. Harduin-Lepers, A., et al., *The human sialyltransferase family*. *Biochimie*, 2001. **83**(8): p. 727-37.
124. Angata, K. and M. Fukuda, *Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule*. *Biochimie*, 2003. **85**(1-2): p. 195-206.
125. Patel, R.Y. and P.V. Balaji, *Identification of linkage-specific sequence motifs in sialyltransferases*. *Glycobiology*, 2006. **16**(2): p. 108-16.
126. Close, B.E., K. Tao, and K.J. Colley, *Polysialyltransferase-1 autopolysialylation is not requisite for polysialylation of neural cell adhesion molecule*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(6): p. 4484-91.
127. Close, B.E., et al., *The polysialyltransferase ST8Sia II/STX: posttranslational processing and role of autopolysialylation in the polysialylation of neural cell adhesion molecule*. *Glycobiology*, 2001. **11**(11): p. 997-1008.
128. Muhlenhoff, M., et al., *The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 34066-73.
129. Datta, A.K. and J.C. Paulson, *The sialyltransferase "sialylmotif" participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(4): p. 1497-500.
130. Datta, A.K., A. Sinha, and J.C. Paulson, *Mutation of the sialyltransferase S-sialylmotif alters the kinetics of the donor and acceptor substrates*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 9608-14.
131. Kitazume-Kawaguchi, S., S. Kabata, and M. Arita, *Differential biosynthesis of polysialic or disialic acid Structure by ST8Sia II and ST8Sia IV*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(19): p. 15696-703.
132. Geremia, R.A., A. Harduin-Lepers, and P. Delannoy, *Identification of two novel conserved amino acid residues in eukaryotic sialyltransferases: implications for their mechanism of action*. *Glycobiology*, 1997. **7**(2): p. v-vii.
133. Jeanneau, C., et al., *Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I: role of n-glycosylation and a novel conserved sialylmotif*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(14): p. 13461-8.
134. Nakata, D., L. Zhang, and F.A. Troy, 2nd, *Molecular basis for polysialylation: a novel polybasic polysialyltransferase domain (PSTD) of 32 amino acids unique to the alpha2,8-polysialyltransferases is essential for polysialylation*. *Glycoconj J*, 2006. **23**(5-6): p. 423-36.

135. Eckhardt, M., et al., *Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1*. Nature, 1995. **373**(6516): p. 715-8.
136. Nakayama, J. and M. Fukuda, *A human polysialyltransferase directs in vitro synthesis of polysialic acid*. J Biol Chem, 1996. **271**(4): p. 1829-32.
137. Yoshida, Y., et al., *Molecular cloning of Sia alpha 2,3Gal beta 1,4GlcNAc alpha 2,8-sialyltransferase from mouse brain*. J Biol Chem, 1995. **270**(24): p. 14628-33.
138. Muhlenhoff, M., et al., *Polysialylation of NCAM by a single enzyme*. Curr Biol, 1996. **6**(9): p. 1188-91.
139. Phillips, G.R., L.A. Krushel, and K.L. Crossin, *Developmental expression of two rat sialyltransferases that modify the neural cell adhesion molecule, N-CAM*. Brain Res Dev Brain Res, 1997. **102**(2): p. 143-55.
140. Wood, G.K., et al., *Cloning and in situ hybridization analysis of the expression of polysialyltransferase mRNA in the developing and adult rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. **51**(1-2): p. 69-81.
141. Ong, E., et al., *Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX*. Glycobiology, 1998. **8**(4): p. 415-24.
142. Hildebrandt, H., et al., *Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development*. J Neurochem, 1998. **71**(6): p. 2339-48.
143. Yoshida, Y., et al., *Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase gene (mST8Sia II)*. Brain-specific expression from a TATA-less GC-rich sequence. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 30167-73.
144. Takashima, S., et al., *Genomic structure and promoter activity of the mouse polysialic acid synthase (mST8Sia IV/PST) gene*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7675-83.
145. Eckhardt, M. and R. Gerardy-Schahn, *Genomic organization of the murine polysialyltransferase gene ST8SiaIV (PST-1)*. Glycobiology, 1998. **8**(12): p. 1165-72.
146. Seidenfaden, R., R. Gerardy-Schahn, and H. Hildebrandt, *Control of NCAM polysialylation by the differential expression of polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV*. Eur J Cell Biol, 2000. **79**(10): p. 680-8.
147. Angata, K., et al., *Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule. Tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7182-90.
148. Muhlenhoff, M., et al., *Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions*. Biol Chem, 2009. **390**(7): p. 567-74.
149. Galuska, S.P., et al., *Polysialic Acid Profiles of Mice Expressing Variant Allelic Combinations of the Polysialyltransferases ST8SiaII and ST8SiaIV*. Journal of Biological Chemistry J. Biol. Chem., 2006. **281**(42): p. 31605-31615.
150. Close, B.E. and K.J. Colley, *In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34586-93.
151. Vimr, E. and C. Lichtensteiger, *To sialylate, or not to sialylate: that is the question*. Trends Microbiol, 2002. **10**(6): p. 254-7.
152. Lavdas, A.A., et al., *Schwann cells genetically engineered to express PSA show enhanced migratory potential without impairment of their myelinating ability in vitro*. Glia, 2006. **53**(8): p. 868-78.
153. Papastefanaki, F., et al., *Grafts of Schwann cells engineered to express PSA-NCAM promote functional recovery after spinal cord injury*. Brain, 2007. **130**(Pt 8): p. 2159-74.

154. Gravvanis, A.I., et al., *Effect of genetically modified Schwann cells with increased motility in end-to-side nerve grafting*. *Microsurgery*, 2005. **25**(5): p. 423-32.
155. Jungnickel, J., et al., *Level and localization of polysialic acid is critical for early peripheral nerve regeneration*. *Mol Cell Neurosci*, 2009. **40**(3): p. 374-81.
156. Chazal, G., et al., *Consequences of neural cell adhesion molecule deficiency on cell migration in the rostral migratory stream of the mouse*. *J Neurosci*, 2000. **20**(4): p. 1446-57.
157. Ono, K., et al., *N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid*. *Neuron*, 1994. **13**(3): p. 595-609.
158. Hu, H., *Polysialic acid regulates chain formation by migrating olfactory interneuron precursors*. *J Neurosci Res*, 2000. **61**(5): p. 480-92.
159. Hu, H., et al., *The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone*. *Neuron*, 1996. **16**(4): p. 735-43.
160. Angata, K., et al., *Polysialic acid-directed migration and differentiation of neural precursors are essential for mouse brain development*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(19): p. 6659-68.
161. Seki, T. and U. Rutishauser, *Removal of polysialic acid-neural cell adhesion molecule induces aberrant mossy fiber innervation and ectopic synaptogenesis in the hippocampus*. *J Neurosci*, 1998. **18**(10): p. 3757-66.
162. Poltorak, M., et al., *Increased neural cell adhesion molecule in the CSF of patients with mood disorder*. *J Neurochem*, 1996. **66**(4): p. 1532-8.
163. Aonurm-Helm, A., et al., *Depression-like behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM)-deficient mice and its reversal by an NCAM-derived peptide, FGL*. *Eur J Neurosci*, 2008. **28**(8): p. 1618-28.
164. Stork, O., et al., *Anxiety and increased 5-HT_{1A} receptor response in NCAM null mutant mice*. *J Neurobiol*, 1999. **40**(3): p. 343-55.
165. Stork, O., et al., *Recovery of emotional behaviour in neural cell adhesion molecule (NCAM) null mutant mice through transgenic expression of NCAM180*. *Eur J Neurosci*, 2000. **12**(9): p. 3291-306.
166. Angata, K., et al., *Sialyltransferase ST8Sia-II assembles a subset of polysialic acid that directs hippocampal axonal targeting and promotes fear behavior*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(31): p. 32603-13.
167. Eckhardt, M., et al., *Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity*. *J Neurosci*, 2000. **20**(14): p. 5234-44.
168. Stoenica, L., et al., *In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid*. *Eur J Neurosci*, 2006. **23**(9): p. 2255-64.
169. Stork, O., et al., *Increased intermale aggression and neuroendocrine response in mice deficient for the neural cell adhesion molecule (NCAM)*. *Eur J Neurosci*, 1997. **9**(6): p. 1117-25.
170. Rolf, B., et al., *Pathfinding errors of corticospinal axons in neural cell adhesion molecule-deficient mice*. *J Neurosci*, 2002. **22**(19): p. 8357-62.
171. Cremer, H., et al., *NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus*. *Mol Cell Neurosci*, 1997. **8**(5): p. 323-35.
172. Polo-Parada, L., C.M. Bose, and L.T. Landmesser, *Alterations in transmission, vesicle dynamics, and transmitter release machinery at NCAM-deficient neuromuscular junctions*. *Neuron*, 2001. **32**(5): p. 815-28.

173. Polo-Parada, L., et al., *Distinct roles of different neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in synaptic maturation revealed by analysis of NCAM 180 kDa isoform-deficient mice*. J Neurosci, 2004. **24**(8): p. 1852-64.
174. Hynes, R.O., *Cell adhesion: old and new questions*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(12): p. M33-7.
175. Biederer, T., *Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules*. Genomics, 2006. **87**(1): p. 139-50.
176. Watabe, K., et al., *IGSF4: a new intercellular adhesion molecule that is called by three names, TSLC1, SgIGSF and SynCAM, by virtue of its diverse function*. Histol Histopathol, 2003. **18**(4): p. 1321-9.
177. Kuramochi, M., et al., *TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 427-30.
178. Wakayama, T., et al., *Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells*. Mol Reprod Dev, 2001. **60**(2): p. 158-64.
179. Wakayama, T., et al., *Expression and functional characterization of the adhesion molecule spermatogenic immunoglobulin superfamily in the mouse testis*. Biol Reprod, 2003. **68**(5): p. 1755-63.
180. Biederer, T., et al., *SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly*. Science, 2002. **297**(5586): p. 1525-31.
181. Shingai, T., et al., *Implications of nectin-like molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in cell-cell adhesion and transmembrane protein localization in epithelial cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35421-7.
182. Fujita, E., A. Soyama, and T. Momoi, *RA175, which is the mouse ortholog of TSLC1, a tumor suppressor gene in human lung cancer, is a cell adhesion molecule*. Exp Cell Res, 2003. **287**(1): p. 57-66.
183. Gomyo, H., et al., *A 2-Mb sequence-ready contig map and a novel immunoglobulin superfamily gene IGSF4 in the LOH region of chromosome 11q23.2*. Genomics, 1999. **62**(2): p. 139-46.
184. Urase, K., et al., *Expression of RA175 mRNA, a new member of the immunoglobulin superfamily, in developing mouse brain*. Neuroreport, 2001. **12**(15): p. 3217-21.
185. Fukuhara, H., et al., *Isolation of the TSLL1 and TSLL2 genes, members of the tumor suppressor TSLC1 gene family encoding transmembrane proteins*. Oncogene, 2001. **20**(38): p. 5401-7.
186. Maurel, P., et al., *Nectin-like proteins mediate axon Schwann cell interactions along the internode and are essential for myelination*. J Cell Biol, 2007. **178**(5): p. 861-74.
187. Fogel, A.I., et al., *SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion*. J Neurosci, 2007. **27**(46): p. 12516-30.
188. Rollenhagen, M., et al., *Polysialylation of the Synaptic Cell Adhesion Molecule 1 (SynCAM 1) Depends Exclusively on the Polysialyltransferase ST8Siall in Vivo*. J Biol Chem, 2012. **287**(42): p. 35170-80.
189. Fujita, E., et al., *Distribution of RA175/TSLC1/SynCAM, a member of the immunoglobulin superfamily, in the developing nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 2005. **154**(2): p. 199-209.
190. Ohta, Y., et al., *Spatiotemporal patterns of expression of IGSF4 in developing mouse nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 2005. **156**(1): p. 23-31.
191. Thomas, L.A., M.R. Akins, and T. Biederer, *Expression and adhesion profiles of SynCAM molecules indicate distinct neuronal functions*. J Comp Neurol, 2008. **510**(1): p. 47-67.

192. Craig, A.M. and Y. Kang, *Neurexin-neurologin signaling in synapse development*. *Curr Opin Neurobiol*, 2007. **17**(1): p. 43-52.
193. Fogel, A.I., et al., *Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation*. *EMBO J*, 2011. **30**(23): p. 4728-38.
194. Sara, Y., et al., *Selective capability of SynCAM and neurologin for functional synapse assembly*. *J Neurosci*, 2005. **25**(1): p. 260-70.
195. Sandau, U.S., et al., *The synaptic cell adhesion molecule, SynCAM1, mediates astrocyte-to-astrocyte and astrocyte-to-GnRH neuron adhesiveness in the mouse hypothalamus*. *Endocrinology*, 2011. **152**(6): p. 2353-63.
196. Roth, C.L., et al., *Expression of a tumor-related gene network increases in the mammalian hypothalamus at the time of female puberty*. *Endocrinology*, 2007. **148**(11): p. 5147-61.
197. Ojeda, S.R., et al., *Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach?* *Endocrinology*, 2006. **147**(3): p. 1166-74.
198. Zhou, Y., et al., *Nectin-like molecule 1 is a protein 4.1N associated protein and recruits protein 4.1N from cytoplasm to the plasma membrane*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1669**(2): p. 142-54.
199. Zelano, J., et al., *Altered expression of nectin-like adhesion molecules in the peripheral nerve after sciatic nerve transection*. *Neurosci Lett*, 2009. **449**(1): p. 28-33.
200. Zelano, J., et al., *SynCAM1 expression correlates with restoration of central synapses on spinal motoneurons after two different models of peripheral nerve injury*. *J Comp Neurol*, 2009. **517**(5): p. 670-82.
201. Boles, K.S., et al., *The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM*. *Blood*, 2005. **106**(3): p. 779-86.
202. Ando, K., et al., *Expression of TSLC1, a candidate tumor suppressor gene mapped to chromosome 11q23, is downregulated in unfavorable neuroblastoma without promoter hypermethylation*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(9): p. 2087-94.
203. Heller, G., et al., *Downregulation of TSLC1 and DAL-1 expression occurs frequently in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **103**(3): p. 283-91.
204. Qin, L., et al., *[The growth inhibition effects of TSLC1 gene on human hepatocyte carcinoma cell line HepG2]*. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2007. **15**(7): p. 509-12.
205. Qin, L., et al., *Effect of TSLC1 gene on proliferation, invasion and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007. **27**(5): p. 535-7.
206. Usami, Y., et al., *Tumor suppressor in lung cancer-1 as a novel ameloblast adhesion molecule and its downregulation in ameloblastoma*. *Pathol Int*, 2007. **57**(2): p. 68-75.
207. Dewan, M.Z., et al., *Critical role for TSLC1 expression in the growth and organ infiltration of adult T-cell leukemia cells in vivo*. *J Virol*, 2008. **82**(23): p. 11958-63.
208. Yamada, D., et al., *Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule*. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(9): p. 3610-24.
209. Ito, A., et al., *SgIGSF is a novel biliary-epithelial cell adhesion molecule mediating duct/ductule development*. *Hepatology*, 2007. **45**(3): p. 684-94.

210. Sakisaka, T., et al., *The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. **19**(5): p. 593-602.
211. Ikeda, W., et al., *Tage4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(30): p. 28167-72.
212. Spiegel, I., et al., *A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination*. *Nat Neurosci*, 2007. **10**(7): p. 861-9.
213. Biederer, T., et al., *SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly*. *Science*, 2002. **297**(5586): p. 1525-31.
214. Frosch, M., et al., *NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of Escherichia coli K1 and group B meningococci*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(4): p. 1194-8.
215. Hirn, M., et al., *Monoclonal antibody against cell surface glycoprotein of neurons*. *Brain Res*, 1981. **214**(2): p. 433-9.
216. Stummeyer, K., et al., *Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004.
217. Hawkes, R., E. Niday, and J. Gordon, *A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies*. *Anal Biochem*, 1982. **119**(1): p. 142-7.
218. Stummeyer, K., et al., *Crystal structure of the polysialic acid-degrading endosialidase of bacteriophage K1F*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(1): p. 90-6.
219. Galuska, S.P., et al., *Enzyme-dependent variations in the polysialylation of the neural cell adhesion molecule (NCAM) in vivo*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(1): p. 17-28.
220. Galuska, S.P., et al., *Characterization of Oligo- and Polysialic Acids by MALDI-TOF-MS*. *Anal Chem*, 2007. **79**(18): p. 7161-9.
221. Klein, C., et al., *The membrane proteome of Halobacterium salinarum*. *Proteomics*, 2005. **5**(1): p. 180-97.
222. Rabilloud, T., *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains*. *Proteomics*, 2002. **2**(1): p. 3-10.
223. Kaup, M., et al., *Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a target for polysialylation in postnatal mouse brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010.
224. Komitova, M., et al., *NG2 cells are distinct from neurogenic cells in the postnatal mouse subventricular zone*. *J Comp Neurol*, 2009. **512**(5): p. 702-16.
225. Ligon, K.L., et al., *Development of NG2 neural progenitor cells requires Olig gene function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(20): p. 7853-8.
226. Xu, J.P., J. Zhao, and S. Li, *Roles of NG2 glial cells in diseases of the central nervous system*. *Neurosci Bull*, 2011. **27**(6): p. 413-21.
227. Zhu, X., R.A. Hill, and A. Nishiyama, *NG2 cells generate oligodendrocytes and gray matter astrocytes in the spinal cord*. *Neuron Glia Biol*, 2008. **4**(1): p. 19-26.
228. Belachew, S., et al., *Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons*. *J Cell Biol*, 2003. **161**(1): p. 169-86.
229. Aguirre, A. and V. Gallo, *Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone*. *J Neurosci*, 2004. **24**(46): p. 10530-41.
230. G. Klöppel, W.R., *Pathologie, 3. Auflage*: Springer.
231. Aguirre, A.A., et al., *NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus*. *J Cell Biol*, 2004. **165**(4): p. 575-89.
232. Bergles, D.E., et al., *Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus*. *Nature*, 2000. **405**(6783): p. 187-91.

-
233. Potschka, H., et al., *Deficiency of neural cell adhesion molecule or its polysialylation modulates pharmacological effects of the AMPA receptor antagonist NBQX*. Neuroscience, 2008. **152**(4): p. 1093-8.
 234. Matthias, K., et al., *Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus*. J Neurosci, 2003. **23**(5): p. 1750-8.
 235. Vaithianathan, T., et al., *Neural cell adhesion molecule-associated polysialic acid potentiates alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor currents*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47975-84.
 236. Gallo, V., et al., *Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor-mediated K⁺ channel block*. J Neurosci, 1996. **16**(8): p. 2659-70.
 237. McDonald, J.W., J.M. Levine, and Y. Qu, *Multiple classes of the oligodendrocyte lineage are highly vulnerable to excitotoxicity*. Neuroreport, 1998. **9**(12): p. 2757-62.
 238. Koutsoudaki, P.N., et al., *Remyelination after cuprizone induced demyelination is accelerated in mice deficient in the polysialic acid synthesizing enzyme St8siaIV*. Neuroscience, 2010. **171**(1): p. 235-44.

13. Publikationsverzeichnis

Publikationen

Sebastian P. Galuska, Manuela Rollenhagen, Moritz Kaup, Katinka Eggers, Imke Oltmann-Norden, Maike Hartmann, Birgit Weinhold, Rudolf Geyer, Martina Mühlenhoff, and Hildegard Geyer „*Synaptic cell adhesion molecule SynCAM 1 is a novel target for polysialylation in postnatal mouse brain*” Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, vol. 107 no. 22.

Poster

Sebastian P. Galuska, Moritz Kaup, Manuela Rollenhagen, Katinka Eggers, Imke Oltmann-Norden, Maike Hartmann, Birgit Weinhold, Rudolf Geyer, Martina Mühlenhoff, and Hildegard Geyer „*Identification of the Synaptic Cell Adhesion Molecule SynCAM 1 as a novel polysialylated glycoprotein in mouse brain*” 20th Joint Glycobiology of the Study Groups for Glycobiology from the Netherlands, Belgium, France and Germany, 8.-10. November 2009.

14. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

15. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben:

Bei Herrn PD Dr. Günter Lochnit, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Ebenfalls möchte ich mich für seine hilfreichen Ratschläge und die fachliche Bewertung bedanken.

Dr. Sebastian Galuska danke ich besonders für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Prof. Dr. Rudolf Geyer und Dr. Hildegard Geyer, die mir den Weg zu der Doktorarbeit ebneten und mir das Forschen in der Arbeitsgruppe Geyer ermöglichten.

Dr. Christina Galuska, Dr. Kai Maaß, Dennis Blank, Sandra Frank, Benedikt Schäfer und Martin Schmidt sowie Werner Mink, Peter Kaese und Siegfried Kühnhardt für die freundliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken. Sie haben mir diese Universitätsausbildung ermöglicht, mir zur Seite gestanden und mich nicht zuletzt fortlaufend ermuntert, diese Doktorarbeit fertig zu stellen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner geliebten Freundin für den Rückhalt und die Unterstützung bedanken.