

Diss. ETH Nr. 9778

Untersuchungen zu den Beziehungen zwischen Struktur und Funktion des neuralen Zelladhäsionsmoleküls N-CAM

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktor der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von

THOMAS FREI

Dipl. Natw. ETH

geboren am 1. Juni 1962

von Egg (Kt. Zürich)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. M. Schachner, Referent
Prof. Dr. T. Koller, Korreferent

Zürich 1992



Juris Druck + Verlag Dietikon
1992

1. Kurzfassung

Für die Entwicklung eines komplexen Organs, wie das Nervensystem es ist, spielt die spezifische Erkennung zwischen verschiedenen Zellen eine besondere Rolle, da sie als eine Voraussetzung gilt z.B. für das Auswachsen von Neuriten oder für die Bündelung von Neuriten (Faszikeln).

Das neurale Zelladhäsionsmolekül N-CAM, das zur Immunglobulin Familie gehört, wurde auf die funktionellen Eigenschaften seiner einzelnen strukturellen Domänen hin untersucht, da bekannt war, dass N-CAM in so verschiedene Prozesse wie Neuritenwachstum, Neuritenfaszikulierung, Zelladhäsion oder auch Muskel-Nerv Interaktionen verwickelt ist. Zu diesem Zweck wurden durch gentechnische Methoden einzelne Proteinfragmente hergestellt, die genau einzelne strukturelle Domänen des Moleküls umfassen.

Diese Proteinfragmente wurden dann in verschiedenen Zellkulturtests mit Kleinhirnneuronen eingesetzt, um zu prüfen, ob bestimmte Domänen auch für ganz bestimmte Funktionen (mit)verantwortlich sind. Die Peptide wurden dabei einerseits als Substrate angeboten für Zelladhäsion und Neuritenwachstum, und andererseits als lösliche Fragmente für Kleinhirnexplantate und Stimulationstests für sekundäre Botenstoffe, wobei die Peptide sowohl als Agonisten wie auch als Kompetitoren einen Effekt ausüben können. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden aminoterminalen immunglobulinartigen Domänen hauptsächlich für die Zelladhäsion verantwortlich sind und die beiden folgenden immunglobulinartigen Domänen für Neuritenfaszikulierung. Dagegen zeigen die beiden fibronektinartigen Domänen nahe der Zellmembran ausschliesslich einen Effekt auf das Auswachsen von Neuriten. Interessanterweise zeigen aber nur die immunglobulinartigen Domänen, besonders die am aminoterminalen Ende gelegene erste Domäne, einen starken Effekt auf die Veränderung von intrazellulären Botenstoffen, wie Inositolphosphate und Calcium.

Damit konnte gezeigt werden, dass bei N-CAM eine Beziehung zwischen der Struktur und den Funktionen des Moleküls besteht, indem einzelne strukturelle Teile des Moleküls (immunglobulinartige und Fibronektin Domänen) für gewisse

Funktionen des Moleküls wie Neuritenwachstum, Neuritenfaszikulierung oder Zelladhäsion, verantwortlich sind. Folglich scheinen die Mitglieder der Immunglobulin Familie, die im Nervensystem exprimiert werden, ähnlich wie diejenigen im Immunsystem aus funktionellen Einheiten aufgebaut zu sein.

2. Summary

For the development of a complex organ such as the nervous system, a specific recognition between different cells is very important, since it is a prerequisite for such crucial events as neurite outgrowth and neurite fasciculation. The neural cell adhesion molecule N-CAM, which belongs to the immunoglobulin superfamily, was investigated for its functional properties, since it is well known that N-CAM is involved in many different functions such as neurite outgrowth, neurite fasciculation, cell adhesion and nerve-muscle interaction.

In order to investigate structure-function relationships, protein fragments were produced by recombinant DNA technology, which cover exactly single domains of the molecule. These protein fragments were then used in different tissue culture assays to determine whether certain domains are responsible for particular functions. The peptides were used either as substrates, for cell adhesion and neurite outgrowth, or as soluble fragments, in microexplant cultures or second messenger assays, where they could act either as agonists or competitors. It was thus shown that the immunoglobulin domains at the amino terminal are mainly responsible for cell adhesion, and the following two immunoglobulin domains for neurite fasciculation. However the fibronectin type III repeats close to the membrane showed a dominant effect in stimulating neurite outgrowth. Interestingly, the triggering of second messengers, such as inositol phosphate and intracellular calcium, was only seen with fragments containing immunoglobulin domains, and was most marked for the aminoterminal domain.

Such an approach has allowed the discovery of a correlation between the structure and the functional properties of a member of the immunoglobulin superfamily. This means that single structural units of the molecule (immunoglobulin domains and fibronectin type III repeats) are responsible for certain functions of the molecule, such as neurite outgrowth, neurite fasciculation and cell adhesion. Thus, members of the immunoglobulin superfamily which are expressed mainly in the nervous system seem to be, in common

with those of the immune system, constructed of specialized functional domains.