

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

**ISBN 3 260 05329 8**

## Inhaltsverzeichnis

1. Kurzfassung.....	2
2. Summary.....	4
3. Einleitung.....	6
3.1 Die Bedeutung von Zell-Zellinteraktionen für die Entwicklung.....	6
3.2 Zelladhäsionsmoleküle.....	7
3.3 Struktur und Funktionsbeziehungen von Molekülen der Immunglobulin Familie.....	12
3.4 Das Zelladhäsionsmolekül N-CAM.....	15
3.5 Problemstellung.....	18
4. Veröffentlichung.....	21
4.1 Different domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM are involved in different functions.....	22
5. Zusammenfassung.....	78
6. Literaturverzeichnis.....	81
7. Ergänzungen und kritische Evaluation der Ergebnisse in der Publikation.....	91
8. Anhang.....	101

## 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.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Die Bedeutung von Zell-Zellinteraktionen für die Entwicklung

Der Aufbau und die Entwicklung von vielzelligen Organismen und deren komplexen Organen, wie das Nervensystem oder das Immunsystem, verlangen ein Zusammenwirken und Erkennen einzelner Zellen. Im organisierten Wachstum von einer Eizelle bis zu einem funktionsfähigen vollentwickelten Organismus hat jede einzelne Zelle ihre eigene Geschichte. Nicht nur die primäre Induktion, die ektodermale Zellen zu Vorläufern von Nervengewebe werden lässt, sondern auch sämtliche sekundären Induktionen, die die Organe entstehen lassen, setzen die Anlagerung bestimmter Zellen voraus, welche sich in ihrem Werdegang unterscheiden. Diese Schrittfolge läuft nach einem festen Zeitmuster ab und ist in Entwicklungsstadien gegliedert, in denen die sich ausbildenden Strukturen die Basis für Strukturen darauffolgender Stadien abgeben (Sperry, 1963). Wie sich Muster, die in diesem Zusammenhang für die Entwicklung entscheidend sind, ausbilden können, wird durch zwei alternative Möglichkeiten erklärt. Im ersten Fall muss angenommen werden, dass sämtliche Zellen von vornherein mit molekularen Markern gekennzeichnet sind. Zwei dem Muster gemäss zusammengehörende Zellen müssten dann an ihrer Oberfläche solche Proteine tragen, die in ihrer Form einander komplementär sind. Das Hauptproblem dieser Theorie ist, dass jede Zelle von Millionen Zellen mit einem nur für sie spezifischen Oberflächenmarker ausgestattet sein müsste, wenn das zu bildende Muster wie z.B. im Gehirn komplex ist. Die andere Möglichkeit ist eher ein dynamischer Weg der Musterbildung. Die Zahl spezifischer Adhäsionsmoleküle braucht längst nicht so gross zu sein wie im ersten Modell, vorausgesetzt, die Bindungsstärke der Moleküle lässt sich variieren. In diesem Sinn muss man zwischen Zellerkennung und Zelladhäsion unterscheiden. Wenn es auf räumliche Nachbarschaft ankommt, so schliesst eine Erkennung durch Marker eine Ortsspezifität mit ein. Wenn sich die Zelladhäsion jedoch dynamisch wandelt, dann ist eine Erkennung in solchem Grade nicht notwendig. Muster können dann ohne individuelle Zell-zu-Zell-Erkennung entstehen. Damit wird zwischen Erkennungsspezifität



und Selektivität unterschieden, welche sich aus der Wechselwirkung zwischen verschiedenen dynamischen Prozessen ergeben kann. Die molekulare Grundlage der Morphogenese berücksichtigt dann drei Primärprozesse: Zelladhäsion, Zellbewegung und Zelldifferenzierung. Eine frühe Zellerkennung muss unabhängig von der Zelldifferenzierung sein, da erst später verschiedene Zelltypen in ganz unterschiedlichen Organen hervortreten. Dagegen muss eine Erkennung direkt der Kontrolle von morphogenetischen Bewegungen mitwirken. Diese ergeben sich aus dem Wechselspiel von Zellbeweglichkeit, Gewebespannung und der Adhäsion selber (Edelman, 1986).

Dass die Existenz von Zell-Zellinteraktionen für die Entwicklung mehrzelliger Organismen wichtig ist, konnte bereits durch die Untersuchungen an marinen Schwämmen (Wilson, 1907) zu Beginn dieses Jahrhunderts gezeigt werden. Dabei zeigten dissoziierte Zellen von Schwämmen die Fähigkeit speziesspezifisch zu reaggregieren. Ähnliche Experimente wurden später von Holtfreter (1939) mit dissoziierten Embryonalzellen durchgeführt, die vergleichbare Ergebnisse in Vertebraten zeigten. Dieses Paradigma der selektiven Adhäsion bei einem Gemisch von verschiedenen Zellen wurde schliesslich von Moscona (1952) ausführlich bei Maus- und Hühnchenzellen beschrieben.

### **3.2 Zelladhäsionsmoleküle**

Die Zelladhäsionsmoleküle, die operationell definiert werden, indem Antikörper gegen solche Moleküle Adhäsion zwischen Zellen inhibieren oder Vorgänge die von direkten Zell-Zellinteraktionen abhängen beeinflussen, können hauptsächlich in drei Klassen eingeteilt werden: Moleküle die der Immunglobulin Familie angehören und Calcium unabhängige Bindung vermitteln, Moleküle die Calcium abhängige Bindung vermitteln (Cadherine) und eine dritte Gruppe von Molekülen die keine strukturelle Beziehung zu den zwei erwähnten Familien zeigen.

Die Mitglieder der Immunglobulin Familie (Abbildung 1) können unterteilt werden in solche, die nur immunglobulinartige Domänen besitzen, und solche, die zusätzlich noch Fibronectin Domänen des Typus III (Kornblihtt et al., 1985) tragen. Zur ersten Gruppe

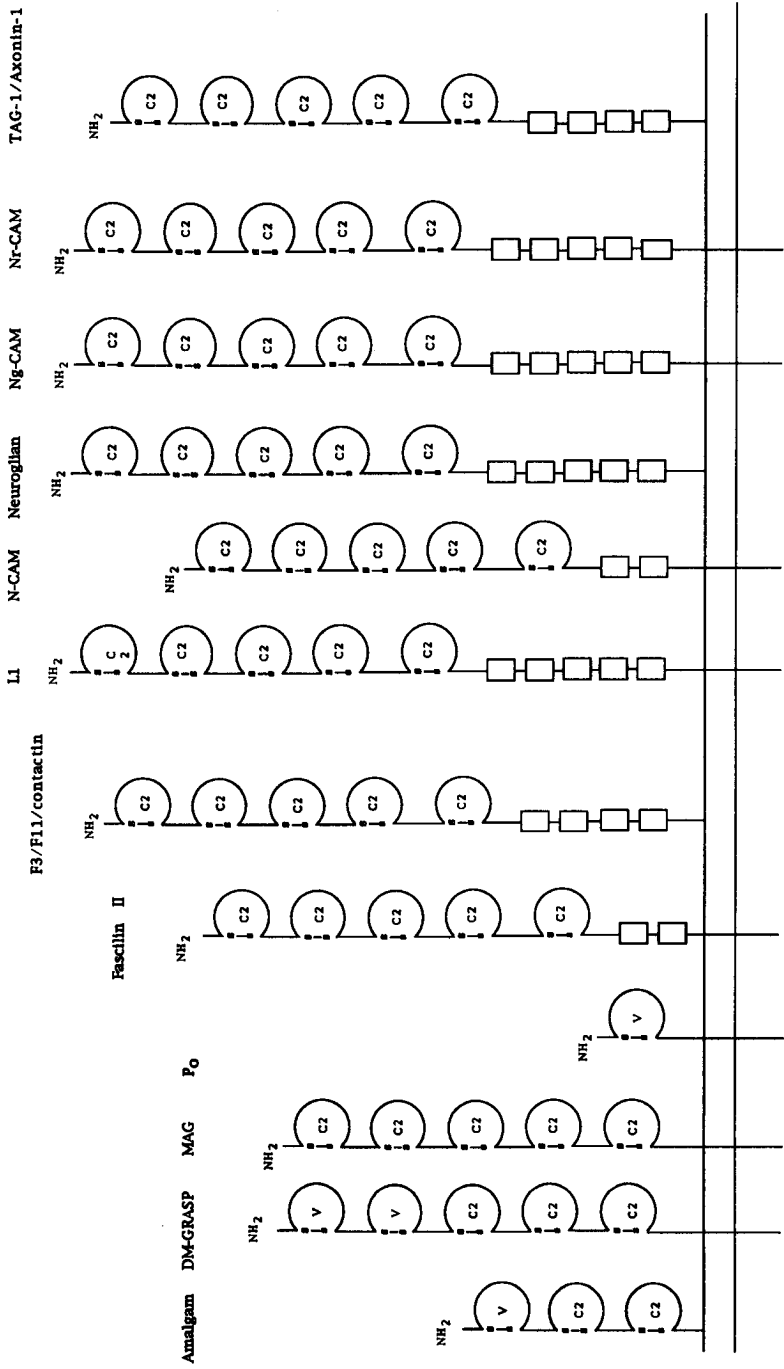


Abbildung 1. Zelladhäsionsmoleküle die vorwiegend im Nervensystem exprimiert werden und zur Immunglobulin Familie gehören. Kreise symbolisieren immunglobulinartige Domänen, die mit der entsprechenden Sekundärstruktur bezeichnet sind (V oder C2-Typ). Die Rechtecke symbolisieren Fibronektin Domänen des Typus III.

gehören Amalgam (Seeger et al., 1988), DM-GRASP (Burns et al., 1991), MAG (Salzer et al., 1987) und P<sub>0</sub> (Lemke und Axel, 1985), zur zweiten Gruppe Fascilin II (Harrelson und Goodmann, 1988), F3/F11/contactin (Gennarini et al., 1989; Brümmendorf et al., 1989; Ranscht, 1988), L1 (Rathjen und Schachner, 1984), N-CAM (Edelman, 1983), Neuroglian (Bieber et al., 1988), Ng-CAM (Edelman, 1983), Nr-CAM (Grumet et al., 1991), und TAG-1/Axonin-1 (Furley et al., 1990; Ruegg et al., 1989). Amalgam, Fascilin II und Neuroglian sind dabei Vertreter dieser Familie die in Insekten (*Drosophila* und Heuschrecke) entdeckt wurden, und die dort ähnliche Funktionen (u.a. Neuritenfaszikulierung) wahrnehmen wie die anderen Vertreter in den verschiedenen Wirbeltieren. Meistens gehören die immunglobulinartigen Domänen dieser Moleküle gemäss der Klassifizierung von Williams und Barclay (1988) zum C2-Typus, seltener findet man eine Kombination von V- und C2-Typ wie bei Amalgam und DM-GRASP und nur P<sub>0</sub> gehört mit seiner einzelnen Domäne zum V-Typus. Die Klassifizierung von Williams und Barclay unterscheidet gemäss der prognostizierten Sekundärstruktur die immunglobulinartigen Domänen in drei Typen: V, C1 und C2, je nach dem wieviele antiparallele  $\beta$ -Faltblätter vorhanden sind, wie die Anzahl der Aminosäuren zwischen den zwei konservierten Cysteins ist, und welche konservierten Aminosäuren die für jeden der drei Typen charakteristisch sind vorliegen. Die einzelnen immunglobulinartigen Domänen werden häufig von einem Exon kodiert, in einigen Fällen wie bei N-CAM von zwei Exonen. Adhäsionsmoleküle mit immunglobulinartigen Domänen findet man zusätzlich zu den im Nervensystem erwähnten auch im Immunsystem (Abbildung 2) wie z.B. CD4 (Clark et al., 1987), ICAM (Simmons et al., 1988), ICAM-2 (Staunton et al., 1989), PECAM (Newman et al., 1990) oder V-CAM (Osborn et al. 1989). Interessanterweise können Moleküle dieser Familie mit sehr verschiedenen Partnern interagieren: einerseits mit sich selber wenn die Moleküle z.B. auf zwei verschiedenen Zellen lokalisiert sind (homophile Bindung) wie das für L1 (Lemmon et al., 1989), N-CAM (Hofman und Edelman, 1983), Ng-CAM (Grumet und Edelman, 1988), und P<sub>0</sub> (Filbin et al., 1990; Schneider-Schaulies et al., 1990)

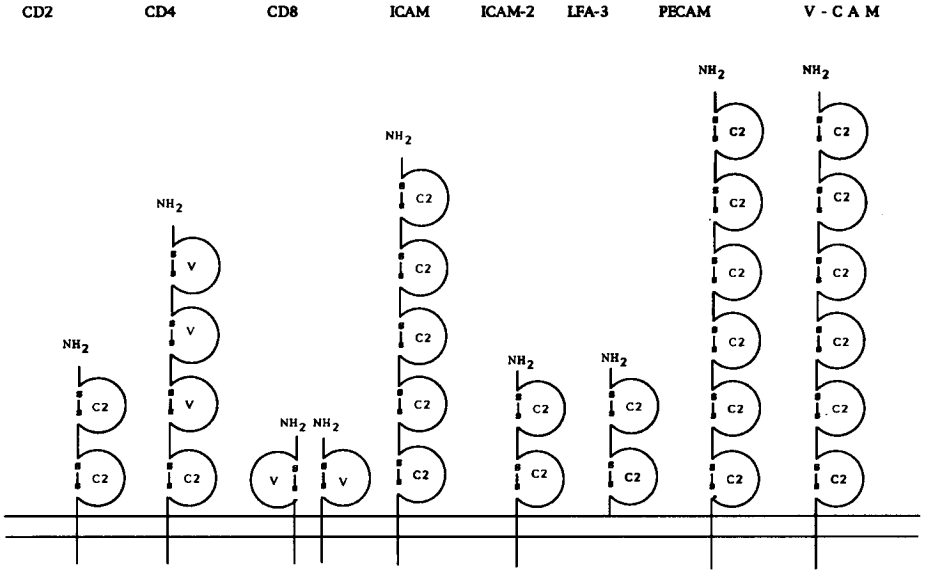


Abbildung 2. Einige Erkennungsmoleküle die vorwiegend im Immunsystem exprimiert werden und zur Immunglobulin Familie gehören. Kreise symbolisieren immunglobulinartige Domänen, die mit der entsprechenden Sekundärstruktur bezeichnet sind (V oder C2-Typ).

gezeigt wurde, oder andererseits verschiedene Mitglieder der Familie untereinander (heterophile Bindung) wie L1 mit Axonin-1 (Kuhn et al., 1991), mit Partnern aus der Integrin Familie (Hynes, 1987), wie z.B. ICAM mit LFA-1 (Simmons et al., 1988), und Mac-1 (Diamond et al., 1991) oder V-CAM mit VLA-4 (Elices et al., 1990) und schliesslich auch mit ganz anderen Proteinen wie z.B. ICAM mit dem Rhinovirus (Greve et al., 1989). Die Fähigkeit der oben genannten Moleküle homophil zu binden ist recht ungewöhnlich, da an den bekannten Interaktionen von Hormonen und ihren Rezeptoren oder Neurotransmittern und ihren Rezeptoren immer zwei ganz verschiedene Moleküle beteiligt sind. Einige Moleküle wie N-CAM und L1 scheinen dabei sowohl homophil als auch heterophil interagieren zu können (Werz und Schachner, 1988).

Die Mitglieder der Cadherin Familie können in fünf Klassen unterteilt werden und zwar gemäss ihrer experimentellen Identifikation: E-Cadherin (epitheliales Cadherin, Hatta et al., 1985), N-Cadherin (neurales Cadherin, Hatta et al., 1987), P-Cadherin (plazentales Cadherin, Nose und Takeichi, 1986), R-Cadherin (retinales Cadherin, Inuzuka et al. 1991) und T-Cadherin ("truncated" Cadherin, Ranscht und Dours-Zimmermann, 1991). Die erwähnten Cadherine zeigen allerdings ein heterogenes Expressionsmuster, d.h. die einzelnen Subklassen werden in ganz verschiedenen Geweben exprimiert. Cadherine interagieren vorwiegend in einer homophilen Art (Miyatani et al. 1989).

Die Mitglieder der dritten Gruppe umfassen schliesslich Moleküle wie AMOG (Gloor et al., 1990) oder Fasciclin I (Zinn et al., 1988).

Eine weitere Gemeinsamkeit von vielen Adhäsionsmolekülen ist ein gemeinsames Kohlenstoff Epitop (L2/HNK-1 Epitop), das selber adhäsive Eigenschaften besitzt (Keilhauer et al., 1985). Nebst diesem Kohlenhydrat sind noch weitere Kohlenhydratepitope entdeckt worden, die auf einigen Adhäsionsmolekülen vorkommen wie z.B. das L3-Epitop auf AMOG, L1, MAG und P<sub>0</sub> (Fahrig et al., 1989).

Schlussendlich gibt es zu den drei bereits genannten Klassen von Adhäsionsmolekülen auch noch solche, die in der extrazellulären Matrix lokalisiert sind, wie Fibronectin (Hynes, 1985), Integrine (Hynes, 1987), Laminin (Kleinman et al., 1985) und Tenascin (Erickson and Bourdon, 1989).

### 3.3 Struktur- und Funktionsbeziehungen von Molekülen der Immunglobulin Familie

Unter den funktionellen Einheiten eines Organismus zeichnen sich das Nervensystem und das Immunsystem durch ihre einzigartige Fähigkeit aus, auf eine enorme Vielfalt von Signalen angemessen zu reagieren. Bei beiden Systemen können die Zellen Signale empfangen und weitergeben und so ein Netzwerk ausbilden. Im Nervensystem, wie auch im Immunsystem, bedeutet die Regulierung des Netzwerks durch fremde Signale eine Anpassung an die Umwelt. Beide Systeme lernen also durch Erfahrung und bauen ein Gedächtnis auf. Diese Ähnlichkeiten haben ihre Gültigkeit auch auf molekularem Niveau, wo ähnliche Gene für ähnliche Proteine kodieren, die teilweise wie bei den beschriebenen Erkennungsmolekülen identische Aufgaben wahrnehmen.

Verschiedene Moleküle der Immunglobulin Familie sind näher auf Struktur und Funktionsbeziehungen untersucht worden, wobei es sich meistens um Mitglieder handelt, die vorwiegend im Immunsystem eine wichtige Rolle spielen. Trotzdem ist ein Vergleich mit den Mitgliedern die im Nervensystem exprimiert werden sinnvoll, da die strukturellen Ähnlichkeiten gross sind.

Die Struktur und Funktionsbeziehungen bei ICAM sind wohl die am besten untersuchten. ICAM besteht aus fünf immunglobulinartigen Domänen des C2-Typus (Staunton et al., 1988) und ist am stärksten exprimiert auf Leukozyten, die mit Immunmediatoren stimuliert wurden (Dustin et al., 1986). Mit Hilfe von Deletionsmutanten des Moleküls, die in Zellen exprimiert wurden und nur noch einzelne Domänen enthalten, konnte gezeigt werden, dass ICAM mit dem Integrin LFA-1 als auch dem Rhinovirus in der ersten aminoterminalen immunglobulinartigen Domäne interagiert (Staunton et al., 1990). Eine weiterführende Analyse mit Deletionsmutanten zeigte schliesslich, dass ein weiteres Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) an die dritte Domäne vom Aminoterminus her bindet (Diamond et al., 1991). Synthetische Peptide die durch Sequenzvergleiche als sinnvoll erschienen zeigten im weiteren, dass das Epitop, das für Zellaggregation verantwortlich ist, auf der vierten Domäne lokalisiert werden kann (Fecondo et al., 1991).

Als weiteres Beispiel bzgl. verschiedener Bindungseigenschaften dient CD4. Dieses Molekül enthält vier immunglobulinartigen Domänen, wovon die drei vom Aminoterminus her zum V-Typus gehören und die vierte zum C2-Typus (Littman et al., 1988). CD4 ist vorwiegend auf einem Teil der T-Zellen exprimiert, die für die Erkennung von Antigenen mit MHC II eine Rolle spielen. Bei dieser Interaktion bindet MHC II an CD4, wie auch im pathologischen Falle das Hüllprotein gp120 des HI-Virus an CD4 bindet (Sattentau et al., 1988). Mit Hilfe eines Adhäsionstests, bei dem verschiedene Mutanten des CD4 Moleküls eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden, dass die MHC II Bindung in der zweiten aminoterminalen Domäne lokalisiert ist, während gp120 an zwei verschiedene Epitope der ersten aminoterminalen Domäne bindet (Fleury et al., 1991). Neben der oben erwähnten Subklasse von T-Zellen die das CD4 Molekül tragen gibt es auch solche, die eine weitere Subklasse bilden und dabei das CD8 Molekül auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dieses Molekül gehört ebenfalls zur Immunglobulin Familie und besteht aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die je eine Domäne des V-Typus enthalten. Untersuchungen mit Mutanten von CD8 haben gezeigt, dass die  $\alpha$ -Kette von CD8 an die  $\alpha_3$ -immunglobulinartige Domäne von MHC I binden (Salter et al., 1990). Diese Interaktion ist deshalb interessant, weil gezeigt wurde, dass dadurch die  $\alpha_3$ -Domäne des MHC I der Zelle ein intrazelluläres Signal übermittelt, das zum Zelltod führt, was wiederum für die Selektion dieser Zellen im Thymus wichtig ist (Sambhara et al., 1991).

Eine weitere Interaktion findet statt zwischen dem B-Lymphozyten Oberflächenprotein CD22, das ein Heterodimer ist, bestehend aus zwei Ketten die beide immunglobulinartige Domänen enthalten, und einem anderen B-Zellen Oberflächenprotein CD75 die eine Phosphatase ist, sowie mit einem T-Zellen Oberflächenprotein CD45RO die eine Transferase ist (Staménkovic et al., 1991). Diese Interaktion ist bemerkenswert da sie zeigt, dass immunglobulinartige Domänen auch mit Enzymen interagieren können.

Als ein interessantes Beispiel einer Interaktion von zwei Molekülen die beide der Immunglobulin Familie angehören, und die je zwei Domänen des C2-Typus enthalten sei das Paar CD2/LFA-3 erwähnt (Seed, 1987). CD2 ist dazu ein weiteres Beispiel bei dem mit Hilfe

von monoklonalen Antikörpern gezeigt werden konnte, dass das Molekül verschiedene Epitope für Zelladhäsion und Induktion der Interleukin Produktion enthält (Peterson und Seed, 1987).

Bei den erwähnten Beispielen von Molekülen handelt es sich um solche, die im Immunsystem exprimiert werden und auch dort eine Rolle spielen. Als Beispiel eines Moleküls das nur im Nervensystem exprimiert ist, und das auch ein Mitglied der Immunglobulin Familie ist, sei  $P_0$  erwähnt. Dieses Molekül enthält nur eine Domäne vom V-Typus. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass diese einzelne Domäne aber mehrere Funktionen trägt wie Zelladhäsion und Neuritenwachstum (Filbin et al., 1990; Schneider-Schaulies et al., 1990).

Endlich sei auf eine ganz andere Familie von Molekülen hingewiesen, den Rezeptorgekoppelten Protein Tyrosin Phosphatasen. Diese Familie umfasst Moleküle die eine intrazelluläre Phosphataseaktivität besitzen. Interessanterweise enthalten einige Moleküle von dieser Familie im extrazellulären Teil immunglobulinartige Domänen und Fibronectin Domänen, wobei aber über deren Funktion Unklarheit herrscht (Streuli et al., 1989). Es wird allerdings angenommen, dass diese Domänen in homophiler Bindung involviert sein könnten. Wiederum werden diese Moleküle in sehr verschiedenen Spezies exprimiert, wie bei der Maus und Drosophila (Fischer et al., 1991). Wie auch immer die Interaktion von solchen Molekülen sein mag, jedenfalls findet hier eine Verknüpfung von immunglobulinartigen Domänen sowie von Fibronectin Domänen mit einer Enzymaktivität statt, was eine weitere interessante Strukturbeziehung darstellt.

Eine Interpretation von all diesen Daten zeigt, dass es in der Tat bei den genannten Beispielen eine Beziehung zwischen der Struktur und allfälligen Funktionen gibt; wobei eine Domäne nicht immer nur eine einzelne Funktion übernehmen kann, sondern auch mehrere funktionelle Eigenschaften tragen kann. Bei einigen Beispielen konnten diese Funktionseinheiten zudem genau lokalisiert werden, was ein Hinweis darauf ist, dass diese funktionell wichtigen Sequenzen auch isoliert interagieren, und dass sie nicht von der Anwesenheit des ganzen Moleküls abhängen.



### 3.4 Das Zelladhäsionsmolekül N-CAM

Gemäss der operationellen Definition von Adhäsionsmolekülen ist N-CAM eigentlich das erste Adhäsionsmolekül das isoliert wurde (Brackenbury et al., 1977).

N-CAM (Abbildung 3) ist ein Mitglied der Immunglobulin Familie, das fünf immunglobulinartige Domänen von C2-Typus und zwei Fibronektin Domänen enthält (Barthels et al., 1988). Die drei Polypeptide in der Maus, mit Molekulargewichten von 180kD, 140kD und 120kD (Goridis et al., 1983), werden von einem Gen transkribiert (D'Eustachio et al., 1985). Molekularbiologische Untersuchungen des N-CAM Gens haben gezeigt, dass das Protein in zusätzlich verschiedenen Formen auftreten kann, je nach dem welche Exon/Intron Struktur von der entsprechenden Zelle gewählt wird (Barbas et al., 1988). So kann das Molekül in der vierten immunglobulinartigen Domäne oder in den Fibronektin Domänen noch zusätzlich Aminosäuren enthalten (Owens et al., 1987; Santoni et al., 1989). Die drei Polypeptide haben alle den gleichen extrazellulären Teil und unterscheiden sich nur dadurch, ob sie via Phosphatidylinositol direkt in die Membran verankert sind wie das für die 120kD Form (He et al., 1986; Sadoul et al., 1986) gilt, oder ob sie unterschiedliche intrazelluläre Teile tragen, wie das für die 140kD bzw. die 180kD Form gilt. Die intrazellulären Teile des Moleküls sind in Zusammenhang gebracht worden mit der Beweglichkeit des Proteins in der Zellmembranoberfläche (Pollerberg et al., 1986), und auch als potentielle Phosphorylierungsstellen (Mackie et al., 1989). Gemeinsam mit anderen Adhäsionsmolekülen trägt N-CAM das L2/HNK-1 Kohlenhydratepitop (Kruse et al., 1984). Zusätzlich sitzt auf der fünften immunglobulinartigen Domäne vom Anfängerterminus her ein aussergewöhnlicher Kohlenhydratanteil der aus Polysialinsäure besteht, und der bis zu einem Drittel des Gesamtgewichts des Moleküls betragen kann. Diese seltene Kohlenhydratstruktur ist vorwiegend im embryonalen Zustand exprimiert, während im erwachsenen Zustand diese Struktur fehlt (Chuong et al., 1984; Crossin et al., 1984). Im weiteren wurde eine gewebespezifische Glykosylierung im olfaktorischen System gefunden (Key und

## N-CAM Struktur

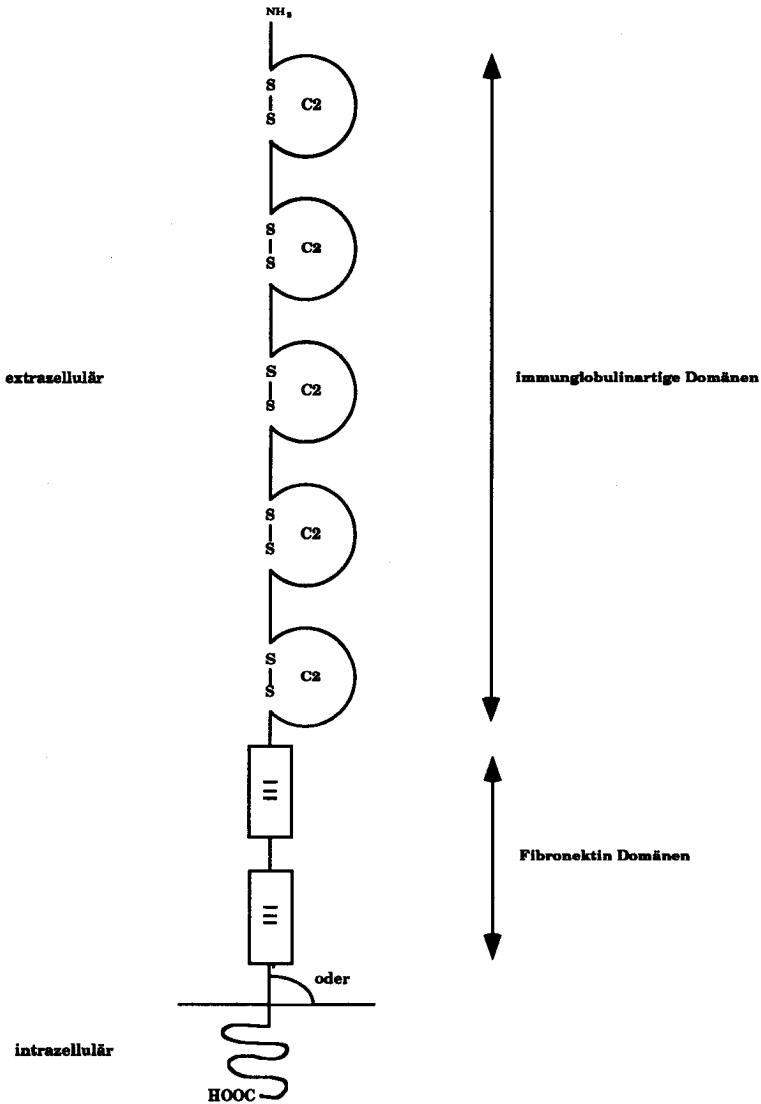


Abbildung 3: Schematische Darstellung des neuralen Zelladhäsionsmolekül N-CAM, das entweder direkt an die Membran bindet (120kD Form) oder die Membran durchquert und einen intrazellulären Teil trägt (140kD und 180 kD Form).

Akeson, 1990), die etwas mit der Fähigkeit zur Regeneration dieser Neurone zu tun haben könnte. Immunologische Studien haben zudem gezeigt, dass N-CAM Reaktivität weit verbreitet ist bei Vertebraten und Invertebraten (Hoffman und Edelman, 1984).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an N-CAM haben über dessen mögliche Topologie Aufschluss gegeben. So konnte gezeigt werden, dass N-CAM eine stäbchenartige Struktur hat, mit einem scharnierartigen Teil zwischen den immunglobulinartigen Domänen und den Fibronectin Domänen (Becker et al., 1989). Diese sogenannte "Hinge"-Region dürfte dafür verantwortlich sein, dass das Molekül besonders mit seinem Immunglobulin Teil beweglich ist, und mit allfälligen Bindungspartnern in Kontakt kommt. N-CAM scheint als möglicher Bindungspartner interessant zu sein, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass das Molekül sowohl in einer homophilen (Hoffman und Edelman, 1983) als auch in einer heterophilen (Werz et al., 1988) Art interagieren kann.

N-CAM ist in der Entwicklung sehr früh exprimiert, während der Gastrulation verschwindet dann N-CAM wieder und erscheint bei der neuralen Induktion wieder, und bleibt dann auf der Neuralplatte exprimiert. Während der Entwicklung des Zentralnervensystems und des peripheren Nervensystems ist N-CAM auf wandernden Neuronen nicht mehr exprimiert, erscheint aber dort wieder wo sich Ganglione ausbilden. Im erwachsenen Zustand ist N-CAM auf verschiedenen Nervenzellen exprimiert wie Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten.

Ueber die möglichen Funktionen von N-CAM, das im Gegensatz zu L1 sehr früh in der Entwicklung und auf ganz verschiedenen Geweben exprimiert wird, wurden vor allem durch Inhibitionsexperimente mit Antikörpern viele Erkenntnisse gewonnen. Spezifische Antikörper gegen N-CAM vermögen in mehreren Testsystemen bei verschiedenen Funktionen zu interagieren. So konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen N-CAM den Aufbau der Hühnerretina stören (Buskirk et al., 1980), wie auch die Wanderung der optischen Nervenfasern im Hühnchen (Thanos et al., 1984), als auch die retinale-tektale Nervenverknüpfungen im Frosch (Fraser et al., 1984). Bei der Bildung der neuromuskulären Verbindung ist N-CAM neben anderen Molekülen auch mitbeteiligt und wird bei der Verletzung

des Nervs auf den Muskelzellen wieder stärker exprimiert. Nach der Regeneration wird dann die Synthese des Moleküls erneut reduziert (Couvault und Sanes, 1985). Diese Effekte auf Organniveau dürften ihre Ursache allerdings in genau definierten molekularen Interaktionen zwischen N-CAM und möglichen Bindungspartnern haben. Der Einfluss von Antikörpern auf das Faszikulierungsverhalten von auswachsenden Neuriten aus Kleinhirnexplantaten deutet jedenfalls in diese Richtung (Rutishauser und Edelman, 1980; Fischer et al., 1986), wie auch die Fähigkeit von N-CAM Neuritenwachstum zu stimulieren wenn das Molekül in Fibroblasten transfiziert wurde (Doherty et al., 1990). N-CAM könnte damit als Molekül, das aus repetitiven Einheiten aufgebaut ist, einzelne Funktionen wie Adhäsion, Neuritenwachstum oder Faszikulierung in einzelnen Segmenten lokalisiert haben.

Studien an PC12 Zellen und Kleinhirnneuronen mit N-CAM Antikörpern haben im weiteren gezeigt, dass die Zugabe von solchen Antikörpern intrazelluläre Botenstoffe wie Inositolphosphate und Calcium aktivieren (Schuch et al., 1989; von Bohlen und Halbach et al., 1992), was die Relevanz von N-CAM als Erkennungsmolekül und nicht nur als statisches Adhäsionsmolekül unterstreicht. In die gleiche Richtung deuten auch Experimente an Hühnchen, die auf spezielles Verhalten konditioniert wurden und bei denen die Synthese von prä- und postsynaptischen Glykoproteinen stark erhöht ist, wobei N-CAM als eine Komponente davon vermutet wird (Rose, 1991).

### 3.5 Problemstellung

Wie beschrieben, handelt es sich bei den untersuchten Molekülen vorwiegend um solche, die im Immunsystem relevant sind. Da aber auch viele Erkennungsmoleküle im Nervensystem, wie N-CAM, L1, MAG und viele mehr, auch zur Immunglobulin Familie gehören jedoch verschiedene Funktionen wahrnehmen, stellt sich die Frage, ob auch hier eine Korrelation zwischen der Struktur und der Funktion solcher Moleküle gezeigt werden kann.

Dazu wurde ein Verfahren gewählt, bei dem mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden Proteinfragmente, die genau

einzelne Domänen des Moleküls abdecken, hergestellt und diese anschliessend in verschiedenen Zellkulturexperimenten eingesetzt. Die Herstellung dieser Proteinfragmente in einem bakteriellen Expressionssystem hat den Vorteil, dass ziemlich grosse Mengen von Proteinen recht einfach und billig produziert werden können. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass Proteine, die so hergestellt werden unglykosyliert sind und man dadurch in den anschliessenden Zellkulturtests einen allfälligen Effekt ausschliesslich auf den Proteinanteil des Moleküls zurückführen kann. Das ist gerade für N-CAM wichtig, da dieses Molekül neben dem L2/HNK-1 Epitop auch noch einen aus Polysialinsäure bestehenden Kohlenhydratanteil trägt. Natürlich wäre es für weitergehende Untersuchungen auch interessant das Molekül in einem eukaryontischen Expressionssystem wie dem CHO-System oder dem Vakzinia-System herzustellen, um allfällige Effekte vergleichen zu können, und um die Kohlenhydratfunktion genauer zu untersuchen.

Durch die Herstellung kleiner und wohldefinierter Proteinfragmente von N-CAM sollte es möglich sein, bestimmte Funktionen von N-CAM genauer zu lokalisieren, indem diese Fragmente als Substrate oder als lösliche Kompetitoren eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil dieses Systems liegt darin, dass man in einem genau definierten System arbeitet und nicht wie bei Zelltransfektionen noch Hintergrundeffekte berücksichtigen muss, welche durch andere in den transfizierten Zellen vorhandenen Molekülen (mit)verursacht werden. Experimente mit transfizierten Zellen und Experimente mit isolierten Proteinfragmenten könnten sich allerdings gegenseitig ergänzen. Im speziellen Fall von N-CAM stellen sich bei transfizierten Zellen vor allem zwei Hauptprobleme: erstens ist es schwierig, eine Zelllinie zu finden, die überhaupt kein N-CAM exprimiert, und zweitens könnte eine solche Zelllinie immer noch Erkennungsmoleküle wie L1 oder N-Cadherin exprimieren, die mit N-CAM interagieren können, so dass die Effekte schwierig zu interpretieren wären. Der Vorteil würde allerdings darin bestehen, dass die exprimierten Moleküle garantiert richtig gefaltet wären.

Zu Beginn der Arbeit war vor allem durch Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern bekannt, dass es zumindest so etwas wie eine Funktionsaufteilung bei N-CAM geben könnte. So konnte

Watanabe et al. (1986) bereits zeigen, dass ein Epitop für Zelladhäsion im aminoterminalen Teil des Moleküls lokalisiert sein muss, wie auch die Heparinbindungsstelle. Eine andere Ueberlegung war, dass hauptsächlich die beschriebenen Moleküle im Nervensystem Fibronectin Domänen des Typs III enthalten. Da diese Domänen mindestens teilweise bei Fibronectin selber im Neuritenwachstum involviert sind (Humphries et al., 1988), wie auch im Tenascin (Lochter et al., 1991; Husmann et al., 1992), das unter anderem auch Fibronectin Domänen des Typs III enthält, könnte es durchaus sein, dass diese Domänen bei den beschriebenen Molekülen im Nervensystem mit Neuritenwachstum assoziiert sind. Ein weiterer Aspekt, der die Herstellung von rekombinanten Proteinfragmenten rechtfertigt, liegt in der Tatsache, dass einige in vitro Testsysteme gut etabliert sind bei denen der Einfluss dieser Proteinfragmente ausgetestet werden kann. Dazu gehören das Auswachsen von Neuriten auf Proteinfragmenten, das Faszikulierungsverhalten von Neuriten aus Kleinhirnexplantaten, sowie die Beeinflussung von sekundären Botenstoffen in Kleinhirnneuronen.

#### **4. Veröffentlichung**

Die folgende Veröffentlichung wurde von "The Journal of Cell Biology" zur Publikation akzeptiert (25.3.1992).

# **Different extracellular domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM are involved in different functions**

Thomas Frei, Friedrich von Bohlen und Halbach, Wolfgang Wille+,  
and Melitta Schachner++

Department of Neurobiology  
Swiss Federal Institute of Technology  
Hönggerberg  
8093 Zürich  
Switzerland

and

+Institute for Genetics  
University of Cologne  
5000 Cologne  
Fed. Rep. Germany

++ for correspondence

Running title: Functions of extracellular domains of N-CAM

Key words: adhesion, Ca<sup>2+</sup>, immunoglobulin superfamily, inositol phosphate, N-CAM, neurite outgrowth, pH



**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to Frank Appel, Dr. Dagmar Barthels, Dr. Johannes Buchner, Dr. Jean-François Conscience, Dr. Christos Goridis, Stefanie Magyar-Lehmann, and Dr. Joanne Taylor for helpful suggestions and advice and for helpful comments on the manuscript, and the Swiss National Science Foundation for support.

**ABSTRACT**

The neural cell adhesion molecule N-CAM engages in diverse functional roles in neural cell interactions. Its extracellular part consists of five immunoglobulin (Ig)-like domains and two fibronectin type III homologous (type III) repeats. To investigate the functional properties of the different structural domains of the molecule in cell interactions and signal transduction to the cell interior, we have synthesized, in a bacterial expression system, the individual domains and tandem sets of individual domains as protein fragments. These protein fragments were tested for their capacity to influence adhesion and spreading of neuronal cell bodies, promote neurite outgrowth, and influence cellular migration patterns from cerebellar microexplants in vitro. Ig-like domains I and II and the combined type III repeats I-II were most efficient for adhesion of neuronal cell bodies, when coated as substrates. Neurite outgrowth was best on the substrate-coated combined type III repeats I-II, followed by the combined Ig-like domains I-V and Ig-like domain I. Spreading of neuronal cell bodies was best on substrate-coated combined type III repeats I-II, followed by Ig-like domain I and the combined Ig-like domains I-V. The cellular migration pattern from cerebellar microexplant cultures plated on a mixture of laminin and poly-L-lysine was modified by Ig-like domains I, III and IV, while Ig-like domains II and V and the combined type III repeats I-II did not show significant modifications, when added as soluble fragments. Outgrowth of astrocytic processes from the explant core was influenced only by Ig-like domain I. Metabolism of inositol phosphates was strongly increased by Ig-like domain I and less by the Ig-like domains II, III, IV and V, and not influenced by the combined type III repeats I-II. Intracellular concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  and pH values were increased only by the Ig-like domains I and II. Intracellular levels of cyclic AMP and GMP were not influenced by any protein fragment. These experiments indicate that different domains of N-CAM subserve different functional roles in cell recognition and signal transduction, and are functionally competent without nervous system-derived carbohydrate structures.

## INTRODUCTION

Cell recognition plays an important role during the formation, maintenance and regeneration of the nervous system. Several recognition molecules have been discovered to mediate cell-to-cell and cell-to-substratum interactions (for reviews see Edelman et al., 1990, 1991; Schachner, 1991). Among these, the neural cell adhesion molecule N-CAM has been implicated in several types of neural cell interactions (Cunningham et al., 1987). N-CAM is involved in neuron-to-neuron and neuron-to-glia interactions in short-term adhesion assays (Keilhauer et al., 1985). It allows neurites to fasciculate (Rutishauser and Edelman, 1980; Fischer et al., 1986) and to interact with their muscle targets in the periphery (Grumet et al., 1982; Covault and Sanes, 1986; Covault et al., 1986). Formation of the retinal and tectal cytoarchitecture has also been attributed, at least in part, to N-CAM (Buskirk et al., 1980; Fraser et al., 1984). N-CAM is expressed early during neural development at the time of neurulation (Crossin et al., 1985). Its functional role in this process, in particular neural induction, has, however, remained obscure (Jacobson and Rutishauser, 1986). It remains expressed by the majority of cell types of neuroectodermal origin during later stages of nervous system development and appears to subserve yet unknown functions in the adult nervous system, where it continues to be expressed, although at lower levels than at early developmental stages. N-CAM is expressed on neural crest cells before migration, ceases to be detectable during migration, and reappears once these cells have arrived at their final position (Thiery et al., 1982). After peripheral nerve transection, the temporal and spatial sequence of N-CAM expression is the same as during development, suggesting that N-CAM also plays a role in regeneration (Nieke and Schachner, 1985; Martini and Schachner, 1988).

N-CAM is a recognition molecule that belongs to the immunoglobulin superfamily, carries one more and one less conserved fibronectin type III homologous repeat (Barthels et al., 1987) and expresses the L2/HNK-1 carbohydrate (Kruse et al., 1984) which is itself functionally involved in cell interactions (Künemund et al., 1988), in common with other adhesion molecules (Kruse et al., 1985). N-CAM consists of several isoforms which derive from alternative splicing

of one gene (Owens et al., 1986; Barbas et al., 1988; Santoni et al., 1989). The three major forms covering molecular weights of 180, 140 and 120 kD are identical in their extracellular part and differ from each other in the disposition of their cytoplasmic domains. The 120 kD form is anchored into the membrane via phosphatidyl inositol (He et al., 1986; Sadoul et al., 1986), whereas the 140 and 180 kD forms are integral membrane glycoproteins, with the 180 kD component (N-CAM 180) having the largest cytoplasmic domain. Several other isoforms derived by alternative splicing of the extracellular part have been recognized in the mouse, with an additional  $\pi$ -exon in the fourth immunoglobulin-like domain and an  $\alpha$ -exon within the fibronectin type III homologous repeats (Santoni et al., 1989). The lower molecular weight isoforms appear to be preferentially expressed by glial cells (Keilhauer et al., 1985; Seilheimer and Schachner, 1988), whereas the larger isoforms are predominantly, but not exclusively, expressed by neurons (Keilhauer et al., 1985; He et al., 1986; Sadoul et al., 1986). N-CAM 180 tends to be expressed at later developmental stages in the mouse nervous system and is concentrated at sites of cell contact (Pollerberg et al., 1985). This isoform has a reduced lateral mobility within the plasma membrane of neuronal cells and appears to be stabilized at sites of cell contact by interaction with the membrane-cytoskeleton linker protein brain spectrin (fodrin) (Pollerberg et al., 1986, 1987). N-CAM 180 is accumulated in the postsynaptic densities of some, but not all synapses in hippocampus and cerebellum, where it has been suggested to play a role in modulating synaptic efficacy (Persohn et al., 1989). Accumulation of N-CAM 180 at sites of contact with partner ligands can be induced by beads coated with extracellular matrix molecules (Pollerberg et al., 1990a). L1 shows a similar, although not as distinct, localization at sites of cell contact, a similar reduced lateral mobility, and a similar accumulation at the contact sites between cells and between coated beads and cells (Pollerberg et al., 1990a, 1990b). A molecular association between N-CAM and L1 within the plasma membrane of neurons could indeed be demonstrated by chemical crosslinking (Simon et al., 1991), underscoring the possibility that N-CAM and L1 are able to function by a mechanism termed assisted homophilic binding (Kadmon et al., 1990a). Association of N-CAM and

L1 within the plasma membrane appears to be dependent on particular carbohydrates (Kadmon et al., 1990b), with the structure of such carbohydrate moieties having yet to be determined. Whether the highly sialylated, so-called embryonic and less adhesive form of N-CAM (Hoffman et al., 1983; Sadoul et al., 1983) or heparin which has been found to bind to N-CAM (Cole and Akeson, 1989; Cole et al., 1986), play a role in the interaction between L1 and N-CAM remains to be seen.

N-CAM not only engages in cell recognition, but is also capable of transducing recognition events into intracellular consequences. In different cell types, N-CAM stimulates changes in second messenger systems, such as inositol phosphates,  $\text{Ca}^{2+}$  and pH, independently of and interdependently with L1 (Schuch et al., 1989; von Bohlen und Halbach et al., 1992). Furthermore, L1 and N-CAM have been shown to reduce tyrosine phosphorylation of  $\alpha$  and  $\beta$  tubulin in growth cone membranes, thus increasing tubulin polymerization (Atashi et al., 1992).

The fact that N-CAM engages in diverse functional roles raises the question as to the functional roles of the different structural domains of the molecule. In other words, are particular domains specialized for certain functions, are some domains functionally active and others inactive, or are the same functional domains of N-CAM involved in the total set of diverse functional roles. To investigate these structure-function relationships, we have synthesized protein fragments from the extracellular domains of N-CAM from a cDNA clone which does not contain the  $\pi$ - or  $\alpha$ -exons (Santoni et al., 1989) and used these fragments in several assay systems, including the triggering of intracellular second messengers. Here, we report that the different domains of the molecule subserve different functional roles in cell adhesion, neurite outgrowth, fasciculation of neurites and orientation of inhibitory GABAergic interneurons in the cerebellar cortex. Furthermore, we present evidence that different domains of N-CAM are specialized to trigger different second messenger systems.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Analytical procedures**

Bacterial lysates and renatured protein fragments were separated by SDS-PAGE on 12% slab gels (Laemmli, 1970) either under reducing or non-reducing conditions. Gels were stained with Coomassie blue or transferred to nitrocellulose filters (Millipore, type HAHY 00010) for immunoblot analysis according to Faissner et al. (1985). Polyclonal and monoclonal antibodies to N-CAM were used at dilutions of 1:200 and 1:50, respectively. Protein determinations were performed as described (Bradford, 1976) or by comparing staining intensities of protein bands with protein marker standards after SDS-PAGE and staining with Coomassie blue.

### **Production of protein fragments of N-CAM in a prokaryotic expression system**

Nine different constructs were derived from the mouse N-CAM cDNA clone DW3 LE which encodes the five immunoglobulin (Ig)-like domains (Barthels et al., 1987) and the pM1.3 clone which encodes the two fibronectin type III domains (Goridis et al., 1985). The different cDNA fragments were excised from the two clones with appropriate restriction enzymes (Fig.1), blunt ended by T4 DNA polymerase and subcloned into the blunt ended Bam H1 restriction site of the pET vector system (Rosenberg et al., 1987) according to standard procedures (Maniatis et al., 1982). All protein fragments expressed by the pET vector system contain eleven amino acids contributed by the translation initiation site and three to ten amino acids contributed by the translation stop site of the vector. Thus, the proteins carrying the individual domains have larger apparent molecular weights than the protein encompassing all Ig-like domains. Recombinant clones with correct orientation were identified by restriction analysis of recombinant plasmid DNA. Expression of the nine recombinant cDNA constructs and a control construct of a plasmid without an inserted cDNA fragment in *E. coli* strain BL21(DE3) (Studier and Moffatt, 1986)

was carried out as described (Rosenberg et al., 1987). A crude bacterial lysate contained 6-8 mg recombinant protein per 200 ml as determined by SDS-PAGE.

### **Purification and renaturation of protein fragments**

Recombinant plasmid containing E. coli cells were treated with 0.4mM isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG) for 4 hours to induce transcription of recombinant mRNA. Cells were then collected by centrifugation at 4°C and 4000xg for 15 minutes and the viscous pellet was sonicated (Branson sonifier B15) in phosphate buffered saline, pH 7.3 (PBS) at maximum intensity for three minutes on ice without interruption. Inclusion bodies resulting from all constructs including that without a cDNA insert were collected from the lysate by centrifugation at 9000xg for 30 minutes at 4°C. The pellet was stored in PBS at -20°C.

Denaturation and renaturation of protein fragments contained in the inclusion bodies were carried out as described (Buchner and Rudolphe, 1991). Briefly, the pellet was solubilized by incubation at room temperature for 2 hours in 300mM dithioerythrol (DTE), 6M urea, 2mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH 8.0, and reoxidized for 36 hours in 10mM oxidized glutathione, 0.3M L-arginine in 100-fold excess volume to allow refolding of the molecules at 4°C. The protein solution was then concentrated by filtration through Amicon filters (YM 10) or filtration through centricon 10 microconcentrator tubes (Amicon, catalog no. 4205) and dialyzed against 50mM Tris-HCl, pH 8.5. The concentrated samples contained 1-3 mg/ml of protein as determined according to Bradford (1976). The purity of fragments in the inclusion bodies was 90% for Ig I, 88% for Ig II, 85% for Ig III, 72% for Ig IV, 86% for Ig V, 91% for Ig I-V, 88% for FN I, 85% for FN II and 89% for FN I-II as determined by SDS-PAGE. The insoluble pellet from the bacterial lysate containing the control construct was denatured and renatured as the other protein fragments. The supernatant from the bacterial lysate containing this construct was not further treated.

Further purification of the first Ig-like domain of N-CAM solubilized from the inclusion bodies was achieved by

chromatography on a Sephadex G-50 fine column (Pharmacia LKB) (1.5x100 cm) under denaturing conditions (4M urea in PBS), yielding a major peak with an approximate molecular weight of 13 kD which contained the protein fragment clearly separated from protein contaminants at higher molecular weights. The peak fraction was renatured and concentrated as described in the previous paragraph and had a purity of 96% as determined by SDS-PAGE (Fig. 2).

### **Adhesion molecules**

N-CAM and L1 were immunoaffinity purified from detergent extracts of crude membrane fractions from adult mouse brain using monoclonal antibody columns (Hirn et al., 1983; Faissner et al., 1984; Rathjen and Schachner, 1984). Laminin from murine EHS sarcoma and fibronectin from human serum were obtained from Boehringer Mannheim.

### **Antibodies**

Polyclonal rabbit antibodies to murine N-CAM and L1 (Faissner et al., 1984; Rathjen and Schachner, 1984; Gennarini et al., 1984) and monoclonal rat antibody to murine N-CAM (H28.123) (Goridis et al., 1983; Hirn et al., 1981) have been described. The polyclonal antibodies were purified using a protein A Sepharose column (Pharmacia LKB) according to Ey et al. (1978). The polyclonal antibodies to murine N-CAM recognized only some epitopes on the N-CAM molecule as revealed by Western blot analysis using the N-CAM protein fragments. The monoclonal antibody H28.123 was purified using a protein G Sepharose 4B column (Pharmacia LKB) according to Åkerström et al. (1985). Polyclonal rabbit antibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP) from bovine brain were purchased from Dakopatts (Denmark). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit Ig antibodies were obtained from The Jackson Laboratory (West Grove, PA).



### **Indirect immunofluorescence**

Immunolabeling of GFAP, a marker for mature astrocytes (Bignami et al., 1972), was performed as described (Schnitzer and Schachner, 1981) with some modifications. Briefly, microexplant cultures were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 minutes at room temperature and unsaturated binding sites were blocked with 10% horse serum and 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Cells were then permeabilized with the same buffer containing 0.3% Triton X-100 and washed three times with PBS. Cultures were incubated for 1 hour at room temperature with antibodies to GFAP at a dilution of 1:250, followed by FITC-conjugated secondary antibodies for 1 hour at room temperature at a dilution of 1:100. Cultures were examined with an Axiophot fluorescence microscope (Carl Zeiss).

### **Cell adhesion test**

The adhesion test was carried out according to Bachmann et al. (1992). In brief, 96-multiwell plates (Nunclon delta, Denmark, catalog no. 1-43761 A) were coated with adhesion molecules or protein fragments at equimolar concentrations (50nM) in 100 $\mu$ l PBS for 3 hours at 37°C, except for laminin which was coated overnight at 37°C and 20 $\mu$ g/ml in basal medium Eagle's. Concentrations of proteins were determined by comparing staining intensities of protein bands with protein marker standards after SDS-PAGE. For the N-CAM peptides, the protein content was estimated for the major band containing the peptide. For the bacterial proteins, molar concentrations were calculated based on the average molecular weight of 60kDa. Coating efficiencies were measured by protein determination using a modification of the Bradford assay (Fahrig et al., 1987) and found to be between 55% and 65% of the input for all proteins and protein concentrations used. Unsaturated binding sites seen at all protein concentrations were blocked with heat inactivated (5 minutes at 70°C) fatty acid-free BSA (Boehringer Mannheim) for 1 hour at room temperature. Single cell suspensions of small cerebellar neurons from six- to seven-day-old ICR mice (Keilhauer et al., 1985) were obtained by dissociation in the presence of 0.1% trypsin, resulting in neurons expressing N-

CAM at the cell surface as shown by Faissner et al. (1984) and seeded in 100 $\mu$ l serum-free neuron culture medium (Fischer, 1982) at a density of  $3 \times 10^5$  cells per well. After incubation for 3 hours at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator, cells were treated with 2.5% glutaraldehyde in PBS for 30 minutes. Cells were stained with crystal violet (0.5% crystal violet (Merck) in 10% ethanol, 3% formaldehyde, 0.15% NaCl) for 10 minutes at room temperature and washed with PBS. The optical density associated with the adherent cells was measured at 595 nm with an ELISA-reader (Titertek multiskan plus, Flow). The data from four independent experiments carried out in duplicates were analyzed for statistical significance by using Student's t-test.

#### **Determination of neurite outgrowth and cell spreading**

Neurite outgrowth of small cerebellar neurons was determined according to Conscience et al. (manuscript in preparation). In brief, glass coverslips (1.1cm in diameter) were coated overnight at 37°C with poly-L-lysine (200 $\mu$ g/ml; Sigma) in 150mM Na-borate, pH 8.4, and washed three times with 100 $\mu$ l PBS. Purified N-CAM and protein fragments (0.5 $\mu$ M) in PBS were then added and incubated for 3 hours at 37°C. Laminin (20 $\mu$ g/ml) was incubated overnight at 37°C. Single cell suspensions of small cerebellar neurons from six- to seven-day-old ICR mice (Keilhauer et al., 1985) were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells per glass coverslip and maintained for 20 hours at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator.

Cells were then treated with 2.5% glutaraldehyde in PBS and stained with crystal violet for 5 minutes as outlined under **Cell adhesion test**. Neurons with processes were analyzed by evaluating the lengths of neurites per cell and the surface area of the cell body by using an Ai Tectron (VIDS IV software) image analysis system (Seilheimer et al., 1989). Neurites were evaluated only when they did not contact other cells or neurites and when their length was longer than the diameter of the cell body (Lemmon et al., 1989). Approximately 50 neurites were measured for each value. The Mann-Whitney U rank test was used to determine whether different substrates produced a significantly

different extent of neurite outgrowth and cell spreading, with a P value of <0.05 being considered significant.

### **Microexplant cultures**

Cerebellar microexplant cultures were prepared as described (Fischer et al., 1986; Hekmat et al., 1989). Briefly, cerebella from six-day-old ICR mice were freed of meninges, white matter and deep cerebellar nuclei, pressed through a Nitrex net with a pore diameter of 300 $\mu$ m and cultured in serum-free neuron culture medium (Fischer et al., 1982) on poly-L-lysine- and laminin-coated glass coverslips. After incubation for 4 hours at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator, purified N-CAM or protein fragments (1 $\mu$ M) were added. Cultures were taken for staining with crystal violet for 5 minutes as outlined under **Cell adhesion test** or for indirect immunofluorescence after different times of maintenance in culture (72 to 96 hours). The data are from four independent, blinded experiments carried out in duplicates.

### **Determination of inositol phosphates, cyclic nucleotides and intracellular Ca<sup>2+</sup> and pH**

Intracellular levels of inositol phosphates, cyclic nucleotides, Ca<sup>2+</sup> and pH were determined in small cerebellar neurons from six- to seven-day-old ICR mice (Keilhauer et al., 1985) maintained in culture on laminin. Measurements were performed as originally described by Schuch et al. (1989) as modified for cerebellar neurons by von Bohlen und Halbach et al. (1992): For inositol phosphate turnover measurements, the extraction of cells was not done with chloroform/methanol as originally described (Schuch et al., 1989) but instead with 20% trichloroacetic acid and the probes were separated on an automated Pharmacia FPLC-system equipped with an anion exchange column (Pharmacia Mono Q HR 5/5) using a step gradient from 0 to 1.5M ammonium acetate, pH 6.4. 1ml fractions were collected, mixed with 4ml scintillation cocktail (Ultima-Gold XR, Canberra Packard) and counted for 1 minute in a beta scintillation counter (Packard 1900 TR). To measure the influence of N-CAM and L1 from adult mouse brain, fibronectin or N-CAM fragments on second messengers, the proteins were added in PBS to the cultures to give a concentration of 0.8 $\mu$ M. The IgG

fractions of polyclonal antibodies to N-CAM and L1 were added to give a final concentration of 500 $\mu$ g/ml. Lithium was added to prevent the degradation of inositol phosphate (IP) to inositol and monophosphate by inhibition of the IP1-phosphatase (Berridge et al., 1982). Thus, IP1 is the final product of the inositol phosphate turnover pathway and thereby an indicator for the observed stimulation. The data from three independent experiments were analyzed for statistical significance by using Student's t-test.

## RESULTS

To assess the functional roles of the different domains of N-CAM, we chose to synthesize, in a bacterial expression system, the five immunoglobulin (Ig)-like domains and the two fibronectin type III homologous (FN) repeats individually and as sets of domains, consisting of Ig-like domains I to V (Ig I-V) and type III domains I to II (FN I-II) (Fig. 1). In the pET vector expression system, proteins were collected as inclusion bodies, which were solubilized in urea under reducing conditions and slowly oxidized under controlled oxygen tension using a protocol designed for the renaturation of bacterially produced immunoglobulins into a functionally active state (Buchner and Rudolphe, 1991). Using this protocol, protein fragments remained soluble in PBS. The protein fragments thus obtained and their protein contaminants are shown in Fig. 2 under reducing conditions. The protein fragments showed the expected apparent molecular weights of approximately 13kD for Ig I, 14kD for Ig II, 14kD for Ig III, 12kD for Ig IV, 13kD for Ig V, 52kD for Ig I-V, 14kD for FN I, 12 kD for FN II, and 26kD for FN I-II. Under non-reducing conditions, all protein fragments, except for the fragment containing the total set of Ig-like domains I-V, gave one band (not shown), thus underscoring that a single configuration is attained. The Ig I-V fragment was seen as several distinct bands under non-reducing conditions, probably representing the different conformations of the partially renatured molecule. The protein fragment of Ig I was further purified by gel filtration using a Sephadex G-50 column to remove the high molecular weight protein contaminants.

The functional activity of these protein fragments was tested in several assay systems. First, the adhesion of small cerebellar neurons to the substrate-coated fragments was tested. Then, neurite outgrowth and spreading of cell bodies of small cerebellar neurons was tested on these fragments adsorbed onto poly-L-lysine coated substrates. The ability of soluble protein fragments to affect cellular migration patterns was tested in cerebellar microexplant cultures plated onto a mixed laminin/poly-L-lysine substrate. Finally, the ability of the protein fragments to modulate

intracellular messenger systems in small cerebellar neurons was monitored. Inositol phosphates, cyclic nucleotides, and intracellular levels of  $\text{Ca}^{2+}$  and pH were determined. Table I summarizes the effects of N-CAM protein fragments in these different assays.

### **Adhesion of neurons to substrate-coated protein fragments**

Small cerebellar neurons were allowed to adhere for 3 hours to the protein fragments which had been coated onto the plastic surface of wells of plastic microtiter plates at equimolar concentrations. In dose-response curves, maximal effects were reached, when proteins were coated at 50nM concentrations (Fig. 3). Attachment of cell bodies was best on laminin (2.1-fold compared to poly-L-lysine and 3.0-fold compared to BSA), followed by Ig I (1.9-fold compared to poly-L-lysine and 2.7-fold compared to BSA), Ig II (1.7-fold compared to poly-L-lysine and 2.4-fold compared to BSA) and FN I-II (1.5-fold compared to poly-L-lysine and 2.2-fold compared to BSA) (Fig. 4). The adhesion of neurons to Ig II, but not to other fragments was reduced in the presence of heparin (not shown). The other protein fragments (Ig III, IV, V, Ig I-V and FN I and II) were not significantly different in stimulating adhesion when compared to poly-L-lysine (ranging from 1.0 to 1.3-fold for the Ig domains and 1.3 to 1.8-fold for the FN domains). When compared to adhesion of neurons to BSA, adhesion to these protein fragments was significantly increased (ranging from 1.3 to 2.7-fold for the Ig domains and 1.6 to 2.2-fold for the FN domains). Both, N-CAM isolated from adult mouse brain by immunoaffinity chromatography and the mixture of Ig I-V and FN I-II showed some enhancement of neuronal adhesion, when compared to poly-L-lysine (ranging from 1.2 to 1.3-fold) but this was not significant. When compared to adhesion of neurons to BSA, adhesion to these substrates were significantly increased (ranging from 1.82 for N-CAM isolated from brain to 1.87 for the mixture of Ig I-V and FN I-II). Thus, the individual Ig I and Ig II fragments were more effective in promoting neuronal attachment than the protein fragment encompassing all five Ig-like domains and N-CAM from brain. Similarly, FN I-II was a more effective substrate for

neuronal adhesion than N-CAM from brain. In contrast, the two FN domains contained together in one fragment were a more adhesive substrate than the single FN domains.

When Ig I purified by gel filtration was taken as a substrate and compared to Ig I taken directly from the inclusion bodies (see Fig. 2), no differences in the efficiency of cell adhesion were observed, when the protein concentrations of the Ig I fragments were estimated from the intensity of the protein bands in polyacrylamide gels. To evaluate the contribution of the bacterial protein contaminants, proteins from the inclusion bodies and supernatants of bacterial lysates from the control clone were used as substrates. There was no significant difference in adhesion to these proteins when compared to BSA.

#### **Neurite length and cell body spreading of neurons on substrate-coated protein fragments**

To determine the influence of the molecular domains on neurite length and the spreading of cell bodies, protein fragments, N-CAM from brain, and laminin were adsorbed onto poly-L-lysine that had been coated onto glass coverslips. Small cerebellar neurons were maintained on the substrates for 20 hours and neurite length and cell body area monitored by semi-automated image analysis.

Titration of protein concentrations for substrate coating revealed that 0.5 $\mu$ M were required in the solution for coating to see a maximal effect on neurite outgrowth and neuronal cell body spreading (not shown). In the following, all comparisons are based on these maximal effects.

Neurite length was highest on laminin (98.7 $\mu$ m per neuron and 3.4-fold higher than on poly-L-lysine alone, on which neurites were only 28.8 $\mu$ m long; Fig. 5). Of the N-CAM protein fragments, FN I-II caused highest increase in neurite outgrowth when compared to poly-L-lysine alone (67.3 $\mu$ m and 2.3-fold), followed by Ig I-V (53.6 $\mu$ m and 1.8-fold), FN I (49.5 $\mu$ m and 1.7-fold) and Ig I (46.4 $\mu$ m and 1.6-fold). The other protein fragments (Ig II, III, IV, and V and FN II) did not give significantly different values from those obtained on poly-L-lysine alone (ranging from 1.0 to 1.3-fold). N-CAM from brain or the substrate mixture of Ig I-V and FN I-II also

gave enhanced neurite outgrowth when compared to poly-L-lysine alone (2.1-fold for both), being almost as potent as FN I-II alone. Thus, the protein fragments encompassing the total extracellular domains and N-CAM from brain were not quite as efficient in promoting neurite outgrowth as the most potent protein fragments.

The spreading of cell bodies of small cerebellar neurons as estimated by the area covered by the cell body was measured in the same experiments that were performed to determine neurite length (Fig. 6). FN I-II was best in inducing cell body spreading followed by Ig I, Ig I-V, FN I, Ig II, and FN II. Ig III, IV and V, and laminin did not significantly differ from the poly-L-lysine substrate alone. N-CAM from brain and the substrate mixture of Ig I-V and FN I-II were almost as efficient in promoting spreading of cell bodies as FN I-II or Ig I alone.

The percentage of neuronal cell bodies extending neurites was not quantitated because it was not strikingly different for any of the domains of N-CAM.

### **Cellular outgrowth patterns from cerebellar microexplants in the presence of soluble protein fragments**

The outward migration pattern of neuronal and astrocytic cell bodies and extension of processes from microexplants taken from early postnatal mouse cerebellum were taken as other, sensitive assay parameters to monitor the impact of N-CAM protein fragments on cellular behavior. In this assay system, small tissue pieces of cerebellum are plated onto a mixture of laminin and poly-L-lysine as substrates and the protein fragments are added in soluble form after the explants have attached to the substrate. Titration of protein concentrations, as determined by comparing staining intensities of protein bands after SDS-PAGE, revealed that  $1\mu\text{M}$  was required to induce a maximal, visible effect. The outgrowth pattern was observed 72 or 96 hours after plating the



explants and the effects were essentially the same at these two time points.

The normal outgrowth pattern of these microexplants has been described (Hekmat et al., 1989). In particular, cells are observed with an orientation of processes largely perpendicular (Fig. 7A, 8A, 9A) to the direction of the fasciculating neurites of granule cells extending radially away from the explant core. These cells first have a bipolar morphology and then elaborate a dendritic arbor-like structure distal from a long, thin axon-like process. As these cells take up GABA, have small cell bodies and amount to 10% of all small cerebellar neurons, they represent the small inhibitory interneurons of the cerebellum, the stellate and basket cells.

In the presence of Ig I, the pattern of neurite outgrowth and cell body migration was significantly different from that in control cultures (Fig. 7B, 8B, 9B). Neurites were less fasciculated and outward migration and clustering of cell bodies less pronounced than in the control cultures (Fig. 7A, 8A, 9A). Of the few cell bodies that migrated beyond the area occupied by GFAP-positive astrocytes (Fig. 10B), the inhibitory interneurons were clearly distinguishable, although less frequent than in the control, by the perpendicular orientation of their neurites. The outgrowth of GFAP-positive astrocytic processes was reduced by Ig I. These effects could be reversed when 60 hours after plating the Ig I was removed by replacing the culture medium: 72 hours afterwards the inhibitory effect was completely reversible and the culture looked healthy and not damaged. Ig III and IV (Fig. 7D, 8D, 9D, and Fig. 7E, 8E, 9E, respectively) also produced an outgrowth pattern different from the control cultures (Fig. 7A, 8A, 9A): Neurites were more fasciculated and clusters of cell bodies tended to be larger than in the control cultures and only a few, misaligned perpendicular cells were seen. The outgrowth of astrocytic processes from the explant core was not affected by Ig III and IV (Fig. 10D and 10E). No differences in outgrowth patterns were seen for Ig II, V and FN I-II, when compared to the untreated controls. To evaluate the contribution of the bacterial protein contaminants, proteins from the inclusion bodies and supernatants of bacterial lysates from

the control clone were used. There was no significant difference in the outward migration pattern of these proteins when compared to the untreated control (not shown).

### **Second messenger systems of neurons in the presence of soluble protein fragments**

The influence of the different protein fragments on intracellular second messenger systems was investigated using small cerebellar neurons maintained on laminin and by addition of the soluble fragments. In dose-response curves maximal effects were reached, when proteins were added at 0.8 $\mu$ M concentrations.

Levels of inositol phosphates (IP1, IP2 and IP3) were determined after incubation of small cerebellar neurons with the different protein fragments in the presence of Li<sup>+</sup>, allowing the determination of changes in inositol phosphate metabolism with changes in IP1 as an indicator of such changes (von Bohlen und Halbach et al., 1992). Ig I was the most potent stimulator of inositol phosphate turnover, in that it caused stimulation of IP1 accumulation by approximately 60% over control values in the absence of protein fragments (Fig. 11). Ig I-V, N-CAM from brain and the mixture of the polyclonal antibodies to L1 and N-CAM gave a similar stimulation when added to the cultures. The highest stimulation was seen with L1 from brain which amounted to approximately 110% when compared to the untreated control. Smaller stimulatory values were seen with Ig II, III, IV and V which amounted to approximately 25% stimulation over control values. Interestingly, FN I-II showed no stimulation over control values. The mixture of Ig I-V and FN I-II were less than additive when compared to the effects caused by the two fragments separately, suggesting that the FN I-II may even be inhibitory in combination with stimulatory fragments. To evaluate the contribution of the bacterial protein contaminants, proteins from the inclusion bodies and supernatants of bacterial lysates from the control clone were used. There was no significant stimulation in IP1 turnover by these proteins.

Measurements of intracellular concentrations of Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and intracellular pH (pH<sub>i</sub>) revealed strikingly parallel effects after

addition of soluble protein fragments (Fig. 12). The most prominent increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and  $pH_i$  was seen after addition of Ig I and II amounting to an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  by a factor of almost 3. This increase was similar to that evoked by Ig I-V, the mixture of Ig I-V and FN I-II, N-CAM from brain and the mixture of polyclonal antibodies to L1 and N-CAM. Only L1 from brain caused a slightly higher increase in  $[Ca^{2+}]_i$ . Interestingly, Ig III, IV and V and FN I-II did not trigger an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  or  $pH_i$ . Evaluation of the kinetics of the response in  $[Ca^{2+}]_i$  and  $pH_i$  showed that the maximal rise in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by addition of the protein fragments or antibodies, occurred within the first 15 minutes after addition of the fragments and was followed by a reduction to lower levels with time of incubation (Fig. 13). This decrease was more pronounced with L1 from brain and the mixture of polyclonal antibodies to L1 and N-CAM and less extensive with Ig I and II and the other stimulatory protein fragments. As observed previously for some cell types (von Bohlen und Halbach et al., 1992), the increase in  $pH_i$  followed the rise in  $[Ca^{2+}]_i$  and desensitized less effectively with time of incubation than the response in  $[Ca^{2+}]_i$ .

None of the protein fragments or antibodies evoked any changes in intracellular levels of cyclic AMP or GMP (not shown).

## DISCUSSION

In this study we have shown that in different functional assay systems, the different domains of the extracellular part of N-CAM are implicated in different functions. The results obtained in this study pertain to the investigated isoform of N-CAM and it might well be that other alternatively spliced isoforms of N-CAM exert different functions. As substrate-coated molecules, the Ig-like domains I and II are most prominently involved in promoting cell adhesion. This is in agreement with a previous observation that the 25kD-fragment of the aminoterminal region of N-CAM, which contains these domains, is involved in cell adhesion (Cole and Glaser, 1986; Frelinger et al., 1986). The fibronectin type III homologous repeats are most predominant in promoting neurite outgrowth and cell spreading. When added as soluble fragments into the culture medium, where they may act either as agonists or competitors, Ig-like domain I reduces neurite fasciculation and migration of neuronal cell bodies, while Ig-like domains III and IV enhance neurite fasciculation and clustering of cell bodies and reduce the perpendicular orientation of inhibitory interneurons. The triggering of intracellular messenger systems is also more dependent on some domains than others. For example, the turnover of inositol phosphates is increased by Ig-like domain I more so than by the other Ig-like domains, whereas the type III repeats are not stimulatory. Furthermore, intracellular concentrations of  $Ca^{2+}$  and pH levels are increased only by Ig-like domains I and II, whereas Ig-like domains III, IV and V and type III domains I-II are completely ineffective.

Two observations argue against the possibility that the observed effects are due to bacterial contaminations which might block the functions of the expressed peptides. First, the fact that all the expressed peptides were active in at least one functional assay indicates that bacterial contaminations are not general blocking agents. Since these peptides are quite small, the contaminating proteins would cover the whole peptide and all possible functional sites would be blocked, hence the peptide could not be active in any of the performed test systems. Second, if a contamination

interacts specifically with one peptide, then this contamination must also interact with the construct containing all five Ig-like domains or with the mixture of all Ig-like domains with all fibronectin type III repeats, representing the complete extracellular region of N-CAM. However, this is not the case: The adhesion given by this mixture is as strong as that given by N-CAM from brain which does not contain bacterial contaminations. Another consideration is noteworthy in that the bacterially expressed peptides are capable of assuming their proper configuration, since only one band under non-reducing condition is seen, except for the construct containing all five Ig-like domains. It should be noted that even in the case that several configurations are attained, as seen for all five Ig-like domains, the expressed peptide is functionally active when compared to the peptides encompassing the individual domains and to N-CAM from brain.

In addition, our study has shown that individual domains can subserve distinct functions without the natural decoration by nervous system-derived carbohydrate structures. However, it is likely that the protein backbone may be even more finely tuned to perform its task when modified by attached carbohydrate structures such as the L2/HNK-1 carbohydrate (Kruse et al., 1984; Künemund et al., 1988) which has been localized to the Ig-like domains of N-CAM (Cole and Schachner, 1987). It is interesting in this respect that the Ig-like domain V is least active in all functional tests used in this study and it is therefore conceivable that this particular protein backbone needs its particular carbohydrate structure some of which could be polysialic acid in the less adhesive, so-called embryonic form of N-CAM (Hoffman and Edelman, 1983; Sadoul et al., 1983; Crossin et al., 1984). It is thus tempting to speculate that certain immunoglobulin-like domains may exert their functions mainly as presenters of functionally important carbohydrate structures.

In general, the implication of the individual domains in certain functions is not all or none in the sense that the other domains are rarely completely silent in a particular functional task. However, the predominant effects of certain domains over others is easily

seen. It is noteworthy that, in several assay systems, individual domains were more effective in evoking a biological response than N-CAM isolated from adult mouse brain or the combination of the Ig-like domains I-V either alone or in combination with type III repeats I-II. This phenomenon could be explained by the assumption that in the whole molecule the individual domains are not as exposed and thus not as accessible to the corresponding receptor as in the individual fragments. Indeed, the proteolytic fragment containing the Ig-like domain II has been found to bind to heparin more avidly than the whole molecule (Cole and Akesson, 1989). Another example illustrating that a fragment is more active than the whole molecule is parathyroid hormone, where the fragment shows a greater effect on  $\text{Ca}^{2+}$  excretion than the whole molecule (Rabhani et al., 1990). On the other hand, N-CAM from brain may have been denatured during the isolation procedure and the five Ig-like domains containing five cystine bridges may not have completely regained their functional conformation during the renaturation process, whereas the proportion of molecules with correct conformation may be higher in the preparation of the individual domains. Thus, we have been able to reconstruct the functional features of N-CAM that promote neurite outgrowth which have previously been observed when N-CAM transfected fibroblasts have been used as cellular substrates (Doherty et al., 1989, 1990, 1991), but less so and not as reproducibly when N-CAM isolated from brain was substrate-coated (Lagenaur and Lemmon, 1987). Tandem presentation of domains, however, can have advantages over their individual presentation as is the case for the type III repeats I and II which, when contained in one protein fragment, are more effective in promotion of neuronal adhesion, neurite outgrowth and cell body spreading than the individual domains. Thus, the type III repeats, may be susceptible to some conformational reinforcement as repetitive units.

The results obtained in this study justify the strategy in which the structural features of a molecule are dissected into individual motifs or "cassettes", because they appear to be functional entities in themselves. The choice of bacteria as the manufacturers of these cassettes has served the purpose that the

function of the protein backbone without the possibly modifying influences of nervous system-derived carbohydrates can be determined. The advantages of our experimental approach are severalfold. First, the use of molecular fragments avoids functional tests with cells that have been made to express individual molecular domains at the cell surface by transfection. Such cells are not devoid of recognition molecules, and these endogenous molecules may undergo unknown functional associations with the transfected molecules. Thus, a convincing demonstration of signal transduction triggered by different domains depends on the cleanness of the inducing signal, which is rarely achieved in the context of other cell surface molecules. In addition, the use of isolated protein fragments is much more versatile than cell transfection, since soluble molecules can be readily used in a variety of functional assays that are not practical with cell-bound molecules because of the inability of cells to effect subtle changes in complex cell interactions, such as for instance neuron-glia and nerve-muscle interactions, synaptogenesis, choice of particular substrates, and perpendicular orientation of inhibitory interneurons. Soluble protein fragments can, therefore, be used to monitor cell interactions in their natural, sophisticated environment in which different cell types possess their original machinery to transduce recognition events at the cell surface into sensible intracellular consequences. Furthermore, protein fragments can be made as cassettes in increasingly smaller sizes to determine the functionally relevant amino acid sequences which are best tested as soluble competitors (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984; Yamada and Kennedy, 1984). These can be used with ease, because of their facilitated penetration through the intact tissue, possibly even in the living animal (Boucaut et al., 1984).

Having demonstrated that particular domains subserve certain functions, the question arises as to how these domains induce their particular cellular effects. The N-CAM fragments may modulate ligand-receptor relationships between the cell surface of neighbouring cells, which may be homophilic (Hoffman et al., 1983) or heterophilic (Werz and Schachner, 1988), requiring self or non-

self receptors at the cell surface of the recipient cell, respectively. The fragments may also interfere with the molecular association of L1 and N-CAM within the surface membrane of one and the same cell (Kadmon et al., 1990a,b). An indirect action of the fragments may lie in the modulation of substrate-associated molecules which then exert different effects on their partner cells.

A comparison of structure-function relationships between molecules of the immunoglobulin superfamily (Williams and Barclay, 1988) or molecules of the fibronectin type III family appears warranted. As for the immunoglobulin superfamily, CD4 exhibits receptor activity for the gp120 glycoprotein of HIV and MHC II molecules in its first and second Ig-like domains (Fleury et al., 1991). Furthermore, it was shown that the interaction between CD4 and gp120 is independent of glycosylation on both partner molecules (Fenouillet et al., 1989). MHC I molecules interact with their first two Ig-like domains with the respective antigens of antigen presenting accessory cells (Bjorkman et al., 1987). ICAM-1 was shown to bind to the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) with its third Ig-like domain, whereas it binds to the rhinovirus by the first- and second Ig-like domains (Staunton et al., 1990) and to the integrin LFA-1 with its first Ig-like domain (Diamond et al., 1991). The third Ig-like domain of the MHC I molecule ( $\alpha 3$ ) is recognized by the Ig-like domain of the CD8  $\alpha$ -chain (Salter et al., 1990). The interaction of the Ig-like domains of CD2 with the Ig-like domains of its receptor LFA-3 (Seed, 1987) is particularly interesting, since both partner molecules have Ig-like domains of the C2-type as do most recognition molecules in the nervous system. Furthermore it has been shown that the binding sites for monoclonal antibodies against CD2 fall in three discrete regions: antibodies that stimulate IL-2 release and block erythrocyte adhesion bind to the first region; antibodies that block adhesion bind to the second region; and antibodies that stimulate IL-2 release but do not block adhesion bind to the third region (Peterson and Seed, 1987). Thus, messenger activation and adhesive properties of CD2 seem to be separated as in N-CAM.



However, such specializations of Ig-like domains may not always be implemented, since the neural adhesion molecule  $P_0$ , the major cell surface glycoprotein of myelin in peripheral nerves which contains only one V-type domain, has been shown to mediate both homophilic glia-glia and heterophilic neuron-glia recognition (Schneider-Schaulies et al., 1990). It can presently not be assessed whether a particular conformation, either of the V-type as in CD4, CD8 and  $P_0$ , or the C2-type as in CD2, LFA-3, N-CAM, the myelin associated glycoprotein (MAG) and L1, may subservise different ranges of functional properties. As shown in the present study, the Ig-like domains of N-CAM are not the most effective neurite outgrowth promoters, although they do support neurite outgrowth, as do  $P_0$  (Schneider-Schaulies et al., 1990) and MAG (Johnson et al., 1989). The fibronectin type III homologous repeats are more active promoters of neurite outgrowth and are thus reminiscent of the neurite outgrowth promoting properties of tenascin which localize to the fibronectin type III homologous repeats 10 and 11 in the mouse (Lochter et al., 1991). The fibronectin type III repeats of fibronectin have also been implicated in neurite outgrowth of peripheral nervous system neurons (Humphries et al., 1988). It is therefore tempting to speculate that the neural recognition molecules carrying a greater number and more highly conserved tandem fibronectin type III repeats than N-CAM, such as L1 (Moos et al., 1988), TAG-1 (Furley et al., 1990), F3/F11/contactin (Gennarini et al., 1989; Brümmendorf et al., 1989; Ranscht, 1988), Ng-CAM (Burgoon et al., 1991), and Nr-CAM (Grumet et al., 1991), may be endowed with neurite outgrowth promoting activities proportional to the number of their type III repeats.

The neurite outgrowth promoting activities of the type III repeats do not appear to be mediated by the second messenger systems investigated in this study, since these domains did not evoke any changes in inositol phosphate turnover, intracellular levels of  $Ca^{2+}$  and pH or cyclic AMP and GMP. However, it is possible that Ig-like domains I and II which are the most prominent domains in promoting cell adhesion and cell spreading may trigger and sustain neurite outgrowth via increasing inositol phosphate turnover and intracellular concentrations of  $Ca^{2+}$  which then may act in concert

with yet unknown signalling systems induced by the fibronectin type III repeats. It is also possible that the experiments in which neurite outgrowth and second messengers systems have been measured cannot be strictly compared, since in the first case protein fragments were substrate-coated, while in the second case they were added as soluble compounds. It remains to be seen which structural features are common to the different recognition molecules in specialization for certain functions and how the individual molecular domains exert their functional roles by a combination of recognition at the cell surface and signal transduction from the cell surface to the cell interior.

**REFERENCES**

- Åkerström, B., Brodin, T., Reis, K., and Björck, L. 1985. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 135:2589-2592.
- Athasi, J. R., Ingraham, C.A., Klinz, S.G., Matten, W.T., Schachner, M., and Maness, P.F. 1992. Neural cell adhesion molecules modulate tyrosine phosphorylation of tubulin in nerve growth cone membranes. *Neuron*, in press.
- Bachmann, M., Conscience, J.F., Probstmeier, R., Carbonetto, S., and Schachner, M. 1992. The recognition molecules myelin-associated glycoprotein and J1/tenascin inhibit integrin-mediated adhesion of neural cells to collagen. Submitted for publication.
- Barbas, J. A., Chaix, J.C., Steinmetz, M., and Goidis, C. 1988. Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 7:625-632.
- Barthels, D., Santoni, M.J., Wille, W., Ruppert, C., Chaix, J.C., Hirsch, M.R., Fontecilla-Camps, J. C., and Goidis, C. 1987. Isolation and nucleotide sequence of mouse NCAM cDNA that codes for a  $M_r$  79000 without a membrane-spanning region. *EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.* 6:907-914.
- Berridge, M.J., Downes, C.P., and Hanley, M.R. 1982. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidyl inositol responses in brain and salivary gland. *Biochem. J.* 206:587-595.
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D., and Uyeda, C.T. 1972. Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43:429-435.
- Bjorkman, P. J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512-518.
- Boucaut, J.-C., Darribère, T., Poole, T.J., Aoyama, H., Yamada, K.M., and Thiéry, J.P. 1984. Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: a competitive peptide inhibitor of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos

and neural crest cell migration in avian embryos. *J. Cell Biol.* 99:1822-1830.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Brümmendorf, T., Wolff, J.M., Frank, R., and Rathjen, F.G. 1989. Neural cell recognition molecule F11: homology with fibronectin type III and immunoglobulin type C domains. *Neuron* 2:1351-1361.

Buchner, J., and Rudolph, R. 1991. Renaturation, purification and characterization of recombinant F<sub>ab</sub>-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 9:157-162.

Burgoon, M. P., Grumet, M., Mauro, V., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. 1991. Structure of the chicken neuron-glia cell adhesion molecule, Ng-CAM: origin of the polypeptides and relation to the Ig superfamily. *J. Cell Biol.* 112:1017-1029.

Buskirk, D. R., Thiéry, J.P., Rutishauser, U., and Edelman, G.M. 1980. Antibodies to a neural cell adhesion molecule disrupt histogenesis in cultured chick retinae. *Nature* 285:488-489.

Cole, J. G., and Akeson, R. 1989. Identification of a heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM using synthetic peptides. *Neuron* 2:1157-1165.

Cole, J. G., and Glaser, L. 1986. A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J. Cell Biol.* 102: 403-412.

Cole, G.J., and Schachner, M. 1987. Localization of the L2 monoclonal antibody binding site on chicken neural cell adhesion molecule (NCAM) and evidence for its role in NCAM-mediated cell adhesion. *Neurosci. Lett.* 78:227-232.

Covault, J., and Sanes, J.R. 1986. Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult -skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 102:716-730.

Covault, J., Merlie, J.P., Goridis, C., and Sanes, J.R. 1986. Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 102:731-739.

Crossin, K.L., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. 1984. Mapping of three carbohydrate attachment sites in embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 99:1848-1855.

Crossin, K. L., Chuong, C.-M., and Edelman, G.M. 1985. Expression sequences of cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6942-6946.

Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R., and Edelman, G.M. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 236:799-806.

Diamond, M.S., Staunton, D.E., Marlin, S.D., and Springer, T.A. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65:961-971.

Doherty, P., Barton, C.H., Dickson, G., Seaton, P., Rowett, L.H., Moore, S.E., Gower, H.J., and Walsh, F.S. 1989. Neuronal process outgrowth of human sensory neurons on monolayers of cells transfected with cDNAs for five human N-CAM isoforms. *J. Cell Biol.* 109:789-798.

Doherty, P., Fruns, M., Seaton, P., Dickson, G., Barton., C.H., Sears, T.A., and Walsh, F.S. 1990. A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 343:464-466.

Doherty, P., Rowett, L.H., Moore, S.E., Mann, D.A., and Walsh, F.S. 1991. Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM and N-cadherin reveals fundamental differences in neuronal responsiveness to CAMs. *Neuron* 6:247-258.

Edelman, G. M., Cunningham, B.A., and Thiery, J.P. 1990. Morphoregulatory molecules. Neurosciences Institute. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Edelman, G.M., and Crossin, K.L. 1991. Cell adhesion molecules: Implications for a molecular histology. *Ann. Rev. Biochem.* 60:155-190.

Ey, P. L., Prowse, S.J., and Jenkin, C.R. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. *Immunochemistry* 15:429.

Fahrig, T., Landa, C., Pesheva, P., Kühn, K., and Schachner, M. 1987. Characterization of binding properties of the myelin-associated

glycoprotein to extracellular matrix constituents. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 6:2875-2883.

Faissner, A., Kruse, J., Goridis, C., Bock, E., and Schachner, M. 1984. The neural cell adhesion molecule L1 is distinct from the N-CAM related group of surface antigens BSP-2 and D2. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 3:733-737.

Faissner, A., Teplow, D.B., Kübler, D., Keilhauer, G., Kinzel, V., and Schachner, M. 1985. Biosynthesis and membrane topography of the neural cell adhesion molecule L1. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 4:3105-3113.

Fenouillet, E., Clerget-Raslain, B., Gluckman, J.C., Guétard, D., Montagnier, L., and Bahraoui, E. 1989. Role of N-linked glycans in the interaction between the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus and its CD4 cellular receptor. *J. Exp. Med.* 169:807-822.

Fischer, G. 1982. Cultivation of mouse cerebellar cells in serum free, hormonally defined media: survival of neurons. *Neurosci. Lett.* 28:325-329.

Fischer, G., Künemund, V., and Schachner M. 1986. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J. Neurosci.* 6:605-612.

Fleury, S., Lamarre, D., Meloche, S., Ryu, S.-E., Cantin, C., Hendrickson, W.A., and Sekaly, R.-P. 1991. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 66:1037-1049.

Frelinger III, A.L., and Rutishauser, U. 1986. Topography of N-CAM structural and functional determinants. II. Placement of monoclonal antibody epitopes. *J. Cell Biol.* 102:1729-1737.

Fraser, S. E., Murray, B.A., Chuong, C.-M., and Edelman, G.M. 1984. Alteration of the retinotectal map in *Xenopus* by antibodies to neural cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4222-4226.

Furley, A. J., Morton, S.B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J., and Jessell, T.M. 1990. The axonal glycoprotein TAG-1 is an

immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61:157-170.

Gennarini, G., Rougon, G., Deagostini-Bazin, H., and Goridis, C. 1984. Studies on the transmembrane disposition of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *Eur. J. Biochem.* 142:57-64.

Gennarini, G., Cibelli, G., Rougon, G., Mattei, M. G., and Goridis, C. 1989. The mouse neuronal cell surface protein F3: a phosphatidyl inositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. *J. Cell Biol.* 109:775-788.

Goridis, C., Deagostini-Bazin, H., Hirn, M., Hirsch, M.R., Rougon, G., Sadoul, R., Langley, O.K., Gombos, G., and Finne, J. 1983. Neural surface antigens during nervous system development. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48:527-538.

Goridis, C., Hirn, M., Santoni, M.J., Gennarini, G., Deagostini-Bazin, H., Jordan, B.R., Kiefer, M., and Steinmetz, M. 1985. Isolation of mouse N-CAM related cDNA: detection and cloning using monoclonal antibodies. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 4:631-635.

Grumet, M., Rutishauser, U., and Edelman, G.M. 1982. Neural cell adhesion molecule is on embryonic muscle cells and mediates adhesion to nerve cells in vitro. *Nature* 295:693-695.

Grumet, M., Mauro, M., Burgoon, M.P., Edelman, G.E., and Cunningham B.A. 1991. Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 113:1399-1412.

He, H. T., Barbet, J., Chaix, J.C., and Goridis, C. 1986. Phosphatidyl inositol is involved in the membrane attachment of N-CAM 120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 5:2489-2494.

Hekmat, A., Künemund, V., Fischer, G., and Schachner, M. 1989. Small inhibitory cerebellar interneurons grow in a perpendicular orientation to granule cell neurites in culture. *Neuron* 2:1113-1122.

Hirn, M., Pierres, M., Deagostini-Bazin, H., Hirsch, M.R., and Goridis, C. 1981. Monoclonal antibody against cell surface protein of neurons. *Brain Res.* 214:433-439.

Hirn, M., Ghandour, M.S., Deagostini-Bazin, H., and Goridis, C. 1983. Molecular heterogeneity and structural evolution during cerebellar ontogeny detected by monoclonal antibody of the mouse cell surface antigen BSP-2. *Brain Res.* 265:87-100.

Hoffman, S., and Edelman, G.M. 1983. Kinetics of homophilic binding by E and A forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5762-5766.

Humphries, M. J., Akiyama, S.K., Komoriya, A., Olden, K., and Yamada, K. M. 1988. Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment. *J. Cell Biol.* 106:1289-1297.

Jacobson, M., and Rutishauser, U. 1986. Induction of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 116:524-531.

Johnson, P.W., Abramow-Newerly, W., Seilheimer, B., Sadoul, R., Tropak, M.B., Arquint, M., Dunn, R.J., Schachner, M., and Roder, J.C. 1989. Recombinant myelin-associated glycoprotein confers neural adhesion and neurite outgrowth function. *Neuron* 3:377-385.

Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., and Schachner, M. 1990a. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J. Cell Biol.* 110:193-208.

Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P., and Schachner, M. 1990b. Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and N-CAM is carbohydrate-dependent. *J. Cell Biol.* 110:209-218.

Keilhauer, G., Faissner, G., and Schachner, M. 1985. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316:728-730.

Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. 1984. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311:153-155.

Kruse, J., Keilhauer, G., Faissner, A., Timpl, R., and Schachner, M. 1985. The J1 glycoprotein- a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature* 316:146-148.



Künemund, V., Jungalwala, F.B., Fischer, G., Chou, D.K.H., Keilhauer, G., and Schachner, M. 1988. The L2/HNK-1 carbohydrate of neural cell adhesion molecules is involved in cell interactions. *J. Cell Biol.* 106:1735-1746.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227:680-685.

Lagenaur, C., and Lemmon, V. 1987. An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7753-7757.

Lemmon, V., Farr, K.L., and Lagenaur, C. 1989. L1-mediated axon growth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2:1597-1603.

Lochter, A., Vaughan, L., Kaplony, A., Prochiantz, A., Schachner, M., and Faissner, A. 1991. J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 113:1159-1171.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Martini, R., and Schachner, M. 1988. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J. Cell Biol.* 106:1735-1746.

Moos, M., Tacke, R., Scherer, H., Teplow, D., Früh, K., and Schachner, M. 1988. Neural cell adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334:701-703.

Nieke, J., and Schachner, M. 1985. Expression of the neural cell adhesion molecules N-CAM and L1 and their common carbohydrate epitope L2/HNK-1 during development and regeneration of sciatic nerve. *Differentiation* 30:141-151.

Owens, G. C., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. 1987. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: Alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:294-298.

Persohn, E., Pollerberg, G.E., and Schachner, M. 1989. Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J. Comp. Neurol.* 288, 92-100.

Peterson, A., and Seed, B. 1987. Monoclonal antibody and ligand binding sites of the T cell erythrocyte receptor (CD2). *Nature* 329:842-846.

Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30-33.

Pollerberg, E. G., Sadoul, R., Goridis, C., and Schachner, M. 1985. Selective expression of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM during development. *J. Cell Biol.* 101:1921-1929.

Pollerberg, E. G., Schachner, M., and Davoust, J. 1986. Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature* 324:462-465.

Pollerberg, E. G., Burridge, K., Krebs, K., Goodman, S., and Schachner, M. 1987. The 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res.* 250:227-236.

Pollerberg, G. E., Nolte, C., and Schachner M. 1990a. Accumulation of N-CAM 180 at contact sites between neuroblastoma cells and plastic beads coated with extracellular matrix molecules. *Eur. J. Neurosci.* 2:879-887.

Pollerberg, G. E., Davoust, J., and Schachner, M. 1990b. Lateral mobility of the cell adhesion molecule L1 within the surface membrane of morphologically undifferentiated and differentiated neuroblastoma cells. *Eur. J. Neurosci.* 2:712-717.

Rabbani, S.A., Kaiser, S.M., Henderson, J.E., Bernier, S.M., Mouland, A.J., Roy, D.R., Zahab, D.M., Sung, W.L., Goltzmann, D., and Hendy, G.N. 1990. Synthesis and characterization of extended and deleted recombinant analogues of parathyroid hormone-(1-84): correlation of peptide structure with function. *Biochemistry* 29:10080-10089.

Ranscht, B. 1988. Sequence of contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new

member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. *J. Cell Biol.* 107:1561-1573.

Rathjen, F. G., and Schachner, M. 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ) J.* 3:461-465.

Rosenberg, A. H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J., and Studier, F.W. 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56:125-135.

Rutishauser, U., and Edelman, G.M. 1980. Effects of fasciculation on the outgrowth of neurites from spinal ganglia in culture. *J. Cell Biol.* 87:370-378.

Sadoul, K., Meyer, A., Low, M.G., and Schachner, M. 1986. Release of the 120 kDa component of the mouse neural cell adhesion molecule N-CAM from the cell surface by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. *Neurosci. Lett.* 72:341-346.

Sadoul, R., Hirn, M., Deagostini-Bazin, H., Rougon, G., and Goridis, C. 1983. Adult and embryonic forms of a mouse neural cell adhesion molecule have different binding properties. *Nature* 304:347-348.

Salter, R. D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrett, T.P.J., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Littman, D.R., and Parham, P. 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the  $\alpha_3$  domain of HLA-A2. *Nature* 345:41-46.

Santoni, M.J., Barthels, D., Vopper, G., Boned, A., Goridis, C., and Wille, W. 1989. Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 8:385-392.

Schachner, M. 1991. Neural recognition molecules and their influence on cellular functions. In: *Nerve Growth Cone* (P.C. Letourneau, S.B. Kater, E.R. Macagno, eds.). Raven Press, New York, pp.237-254.

Schneider-Schaulies, J., von Brunn, A., and Schachner, M. 1990. Recombinant peripheral myelin protein P<sub>0</sub> confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties. *J. Neurosci. Res.* 27:286-297.

Schnitzer, J., and Schachner, M. 1981. Expression of Thy-1, H-2 and NS-4 cell surface antigens and tetanus toxin receptors in early postnatal and adult mouse cerebellum. *J. Neuroimmunol.* 1:429-456.

Schuch, U., Lohse, M.J., and Schachner, M. 1989. Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3:13-20.

Seed, B. 1987. An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* 329:840-842.

Seilheimer, B., and Schachner, M. 1988. Studies of adhesion molecules mediating interactions between cells of peripheral nervous system indicate a major role for L1 in mediating sensory neuron growth on Schwann cells in culture. *J. Cell Biol.* 107:341-351.

Seilheimer, B., Persohn, E., and Schachner M. 1989. Neural cell adhesion molecule expression is regulated by Schwann cell-neuron interaction in culture. *J. Cell Biol.* 108:1909-1915.

Simon, H., Klinz, S., Fahrig, T., and Schachner, M. 1991. Molecular association of the neural adhesion molecule L1 and N-CAM in the surface membrane of neuroblastoma cells is shown by chemical cross-linking. *Eur. J. Neurosci.* 3:634-640.

Staunton, D. E., Dustin, M.L., Erickson, H.P., and Springer, T.A. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 61:243-254.

Studier, F. W., and Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189:113-130.

Thiéry, J.P., Duband, J.-L., and Delouvé, A. 1982. Pathways and mechanism of avian trunk neural crest cell migration and localization. *Dev. Biol.* 93:324-343.

von Bohlen und Halbach, F., Taylor, J., and Schachner, M. 1992. The adhesion molecules L1 and N-CAM influence different second messenger systems in different neural cell types. Submitted for publication.

Werz, W., and Schachner, M. 1988. Adhesion of neural cells to extracellular constituents. Involvement of glycosaminoglycans and cell adhesion molecules. *Devel. Brain Res.* 43:225-234.

Williams, A. F., and Barclay, A.N. 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405.

Yamada, K.M., and Kennedy, D.W. 1984. Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J. Cell Biol.* 99:29-36.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of the extracellular domain of mouse N-CAM at the cDNA and protein levels and derivation of cDNA clones for expression of protein fragments. The nine cDNA clones encode the following protein fragments: Ig I, first immunoglobulin (Ig)-like domain (bp 223-487); Ig II, second Ig-like domain (bp 487-733); Ig III, third Ig-like domain (bp 733-1092); Ig IV, fourth Ig-like domain (bp 1102-1347); Ig V, fifth Ig-like domain (bp 1347-1622); FN I, first fibronectin type III homologous domain (bp 1622-1957); FN II, second fibronectin type III homologous domain (bp 1957-2217); Ig I-V, all five Ig-like domains (223-1622); and FN I-II, the two fibronectin type III domains (1622-2217). The cDNA fragments were subcloned into the pET expression vector after digestion with the appropriate restriction enzymes as indicated by arrows. The numbering of base pairs corresponds to that used by Barthels et al. (1987), where number 1 refers to the transcription initiation site.

Figure 2. Analysis of molecular weights and protein contaminants of the N-CAM protein fragments synthesized in the pET expression system. Inclusion bodies containing the proteins (Ig I to Ig V, Ig I-V, FN I, FN II, FN I-II, Ig I-V+FN I-II; for abbreviations see legend to Fig. 1) were solubilized and renatured. Ig I G-50 is Ig I from inclusion bodies further purified by gel filtration over a Sephadex G-50 column. Proteins (10 $\mu$ g per lane) were separated by SDS-PAGE and visualized by Coomassie blue staining. The bromophenol blue front is seen at the bottom of each lane. Molecular weight markers are indicated in kilodaltons (kD) at the left margin.

Figure 3. Adhesion of small cerebellar neurons to substrate-coated N-CAM protein fragments as a function of the coated protein concentration. Adhesion of neurons to protein fragments Ig I, Ig II, Ig III, FN I-II, bacterial pellet, laminin and bovine serum albumin (BSA) (for abbreviations, see legends to Figs. 1 and 2) was evaluated after 3 hours of maintenance on the substrate and staining with crystal violet as determined by measuring the

optical density at 595 nm. Mean values  $\pm$  standard deviation are from four independent experiments carried out in duplicate.

Figure 4. Adhesion of small cerebellar neurons to substrate-coated N-CAM protein fragments at 50nM concentrations. Adhesion of neurons to Ig I to Ig V, Ig I-V, FN I, FN II, FN I-II, and Ig I-V+FN I-II (for abbreviations, see legends to Figs. 1 and 2), brain N-CAM immunoaffinity purified from adult mouse brain (N-CAM), laminin, poly-L-lysine (PLL), bovine serum albumin (BSA) and bacterial pellet which were denatured and renatured as described (bacterial pellet) and from the supernatant (bacterial supernatant) was evaluated after 3 hours of maintenance on the substrate and staining with crystal violet as determined by measuring optical density at 595nm. Mean values  $\pm$  standard deviation are from four independent experiments carried out in duplicate. Bars marked by \* are significantly different ( $P < 0.001$ ) from the control (PLL alone as a substrate).

Figure 5. Determination of neurite length of small cerebellar neurons maintained on N-CAM protein fragments. Cells were maintained on Ig I to Ig V, Ig I-V, FN I, FN II, Ig I-V+FN I-II (for abbreviations, see legends to Figs. 1 and 2), brain N-CAM immunoaffinity purified from adult mouse brain (N-CAM), and laminin adsorbed to poly-L-lysine (PLL) coated glass coverslips for 20 hours, fixed and stained with crystal violet. Lengths of neurites were determined per cell. Mean values  $\pm$  standard deviation are from approximately 50 neurons from two independent experiments carried out in duplicate. Bars marked by \* are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control (PLL alone as a substrate).

Figure 6. Determination of spreading of cell bodies of small cerebellar neurons maintained on N-CAM protein fragments. Cells were maintained on fragments Ig I to Ig V, Ig I-V, FN I, FN II, Ig I-V+FN I-II (for abbreviations, see legend to Fig. 1), brain N-CAM immunoaffinity purified from adult mouse brain (N-CAM), and laminin adsorbed to poly-L-lysine (PLL) coated coverslips for 20 hours, fixed and stained with crystal violet. The area covered by

one neuronal cell body was determined. Mean values  $\pm$  standard deviation are from approximately 50 neurons from two independent experiments carried out in duplicate. Bars marked by \* are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control (PLL alone as a substrate).

Figure 7. Determination of the cell migration pattern from cerebellar microexplant cultures maintained in the absence (A) or presence (B-G) of N-CAM protein fragments. Cultures were maintained on poly-L-lysine- and laminin-coated glass coverslips for 96 hours, fixed and stained with crystal violet. Protein fragments were added 4 hours after plating the microexplants. (B)Ig I; (C)Ig II; (D)Ig III; (E)Ig IV; (F)Ig V; (G)FN I-II. For abbreviations, see legend to Fig. 1. Bar in (G) represents 100 $\mu$ m (for A-G).

Figure 8. Determination of cell migration pattern from cerebellar microexplant cultures maintained in the absence (A) or presence (B-G) of N-CAM protein fragments (detail from the explant near the explant core in the astrocytic outgrowth zone from the experiment shown in Fig. 6). (B)Ig I; (C)Ig II; (D)Ig III; (E)Ig IV; (F)Ig V; (G)FN I-II. For abbreviations, see legend to Fig. 1. Bar in (G) represents 50 $\mu$ m (for A-G).

Figure 9. Determination of cell migration pattern from cerebellar microexplant cultures maintained in the absence (A) or presence (B-G) of N-CAM protein fragments (detail from the explant outside the astrocytic outgrowth zone near the explant core from the experiment shown in Fig. 6). (B)Ig I; (C)Ig II; (D)Ig III; (E)Ig IV; (F)Ig V; (G) FN I-II. For abbreviations, see legend to Fig. 1. Bar in (G) represents 50 $\mu$ m (for A-G).

Figure 10. Determination of the migration and process outgrowth pattern of astrocytes from cerebellar microexplant cultures maintained in the absence (A) or presence (B-G) of N-CAM protein fragments. GFAP-positive astrocytes were visualized by indirect immunofluorescence. (B)Ig I; (C)Ig II; (D)Ig III; (E)Ig IV; (F)Ig V;



(G)FN I-II. For abbreviations, see legend to Fig. 1. Bar in (G) represents 100 $\mu$ m (for A-G).

Figure 11. Effect of adhesion molecules, N-CAM protein fragments and antibodies on intracellular IP1 levels of cultured small cerebellar neurons. After labeling with [ $^3$ H]inositol, small cerebellar neurons maintained on laminin were incubated for 20 minutes in the presence of 10mM Li $^+$  with adhesion molecules, protein fragments, bacterial pellet (for abbreviations see legends to Figs. 1,2 and 4), N-CAM and L1 immunoaffinity purified from mouse brain (brain N-CAM and brain L1, respectively) and the mixture of polyclonal antibodies to L1 and N-CAM (pL1/pN-CAM). Bars show the percentage increase of [ $^3$ H]inositol incorporation into IP1 in cells treated with antigens and antibodies compared with control cells and represent mean values  $\pm$  standard deviation from three independent experiments. Bars marked by \* are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control (fibronectin).

Figure 12. Influence of adhesion molecules, N-CAM protein fragments and antibodies on [ $Ca^{2+}$ ] $_i$  and pH $_i$  of cultured small cerebellar neurons. Small cerebellar neurons were maintained on laminin and incubated without N-CAM protein fragments (control), with adhesion molecules, protein fragments and antibodies. Bars show the maximum values observed after addition of proteins within a time period of 60 minutes and represent mean values  $\pm$  standard deviation from three independent experiments. Bars marked by \* are significantly different ( $P < 0.05$ ) from the control (fibronectin). For abbreviations, see legends to Figs. 1 and 11.

Figure 13. Changes in [ $Ca^{2+}$ ] $_i$  and pH $_i$  of cultured small cerebellar neurons maintained on laminin as a function of incubation time with adhesion molecules, N-CAM protein fragments and antibodies. Small cerebellar neurons were maintained on laminin and incubated with adhesion molecules, protein fragments and antibodies (pL1/N-CAM). Values recorded after addition of antibodies show changes in [ $Ca^{2+}$ ] $_i$  and pH $_i$  and are mean values  $\pm$  standard deviation from three independent experiments. For abbreviations, see legends to Figs.1 and 11.

Table I  
Summary of the functional properties of N-CAM protein fragments in cell culture

	cell adhesion	neurite outgrowth	cell spreading	neurite fasciculation	IP	Ca <sup>2+</sup>	pH	cAMP	cGMP
	BSA	PLL							
Ig I	+++	+++	+	+++	decrease	+++	+++	-	-
Ig II	+	+	-	+	-	+++	+++	-	-
Ig III	+	-	-	-	increase	-	-	-	-
Ig IV	+	-	-	-	increase	-	-	-	-
Ig V	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ig I-V	+	-	+	+	+	+++	+++	-	-
FN I-II	+	+	+++	-	-	-	-	-	-
brain N-CAM	+	-	+++	+	ND.	+++	+++	-	-

The efficacy with which a fragment induces the functional effects is schematically represented as +++, maximal effect; ++, intermediate effect; +, small effect; -, no effect. Cell adhesion, neurite outgrowth and spreading were tested with substrate-coated fragments. The values for cell adhesion are based both on bovine serum albumin (BSA) or poly-L-lysine (PLL) as control. The values for neurite outgrowth and cell spreading are based on poly-L-lysine as control. All other tests were carried out with soluble fragments added to the cultures. N.D., not determined, since brain N-CAM contains 0.1% deoxycholate which damages the explant cultures.

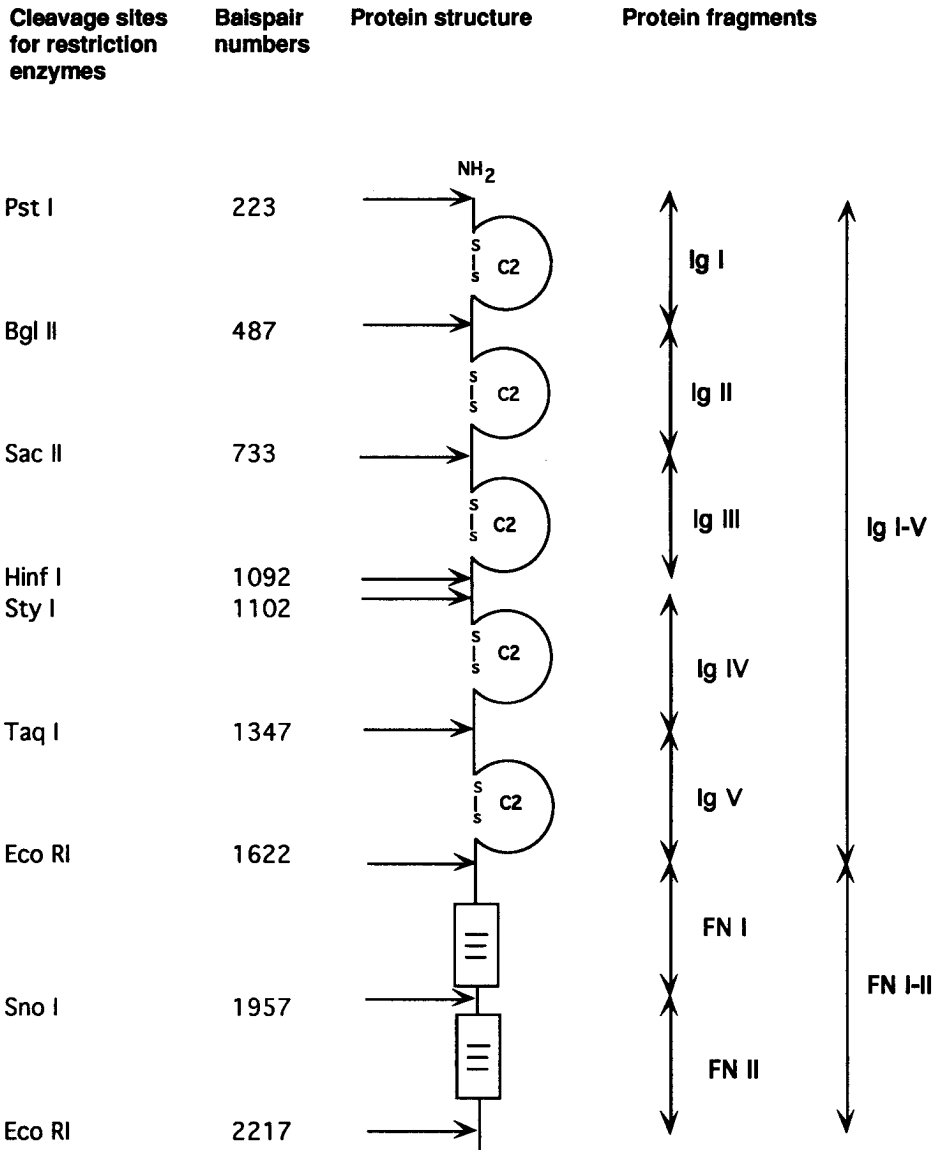


Figure 1

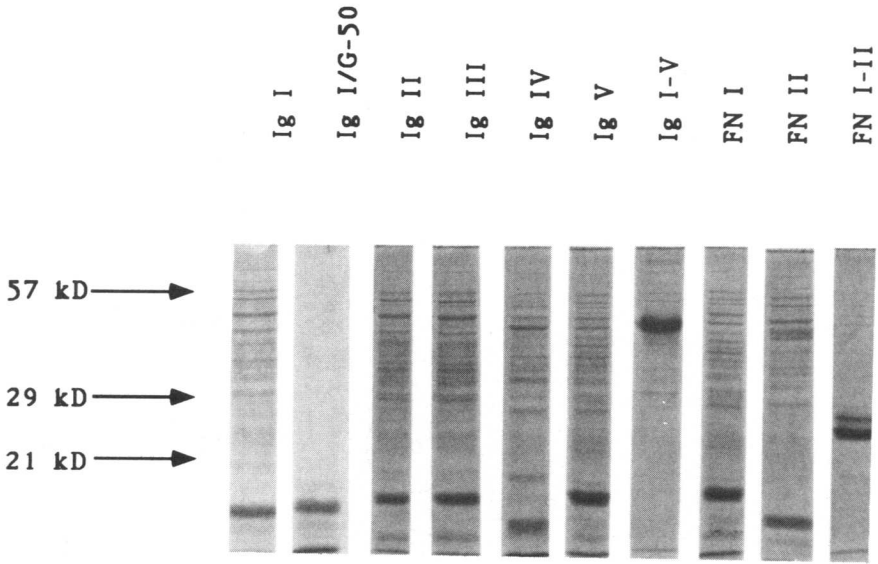


Figure 2

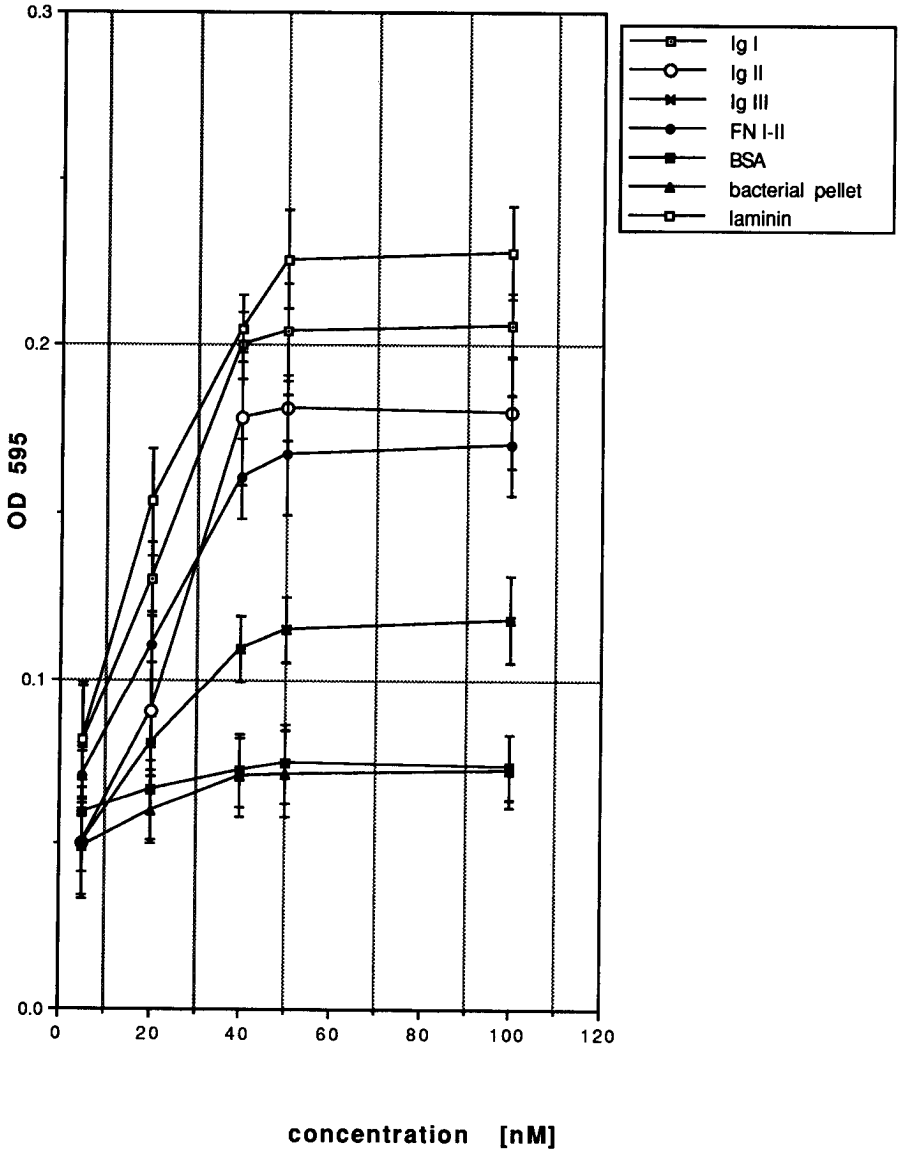


Figure 3

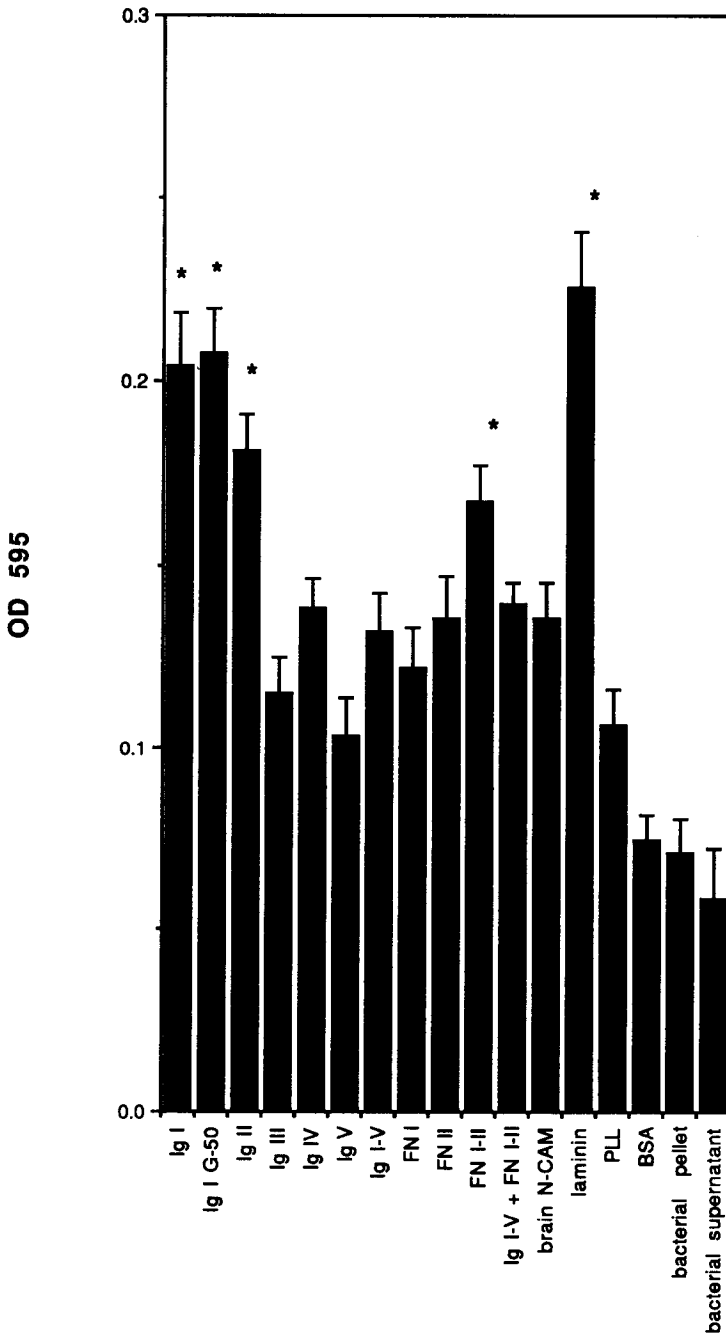


Figure 4

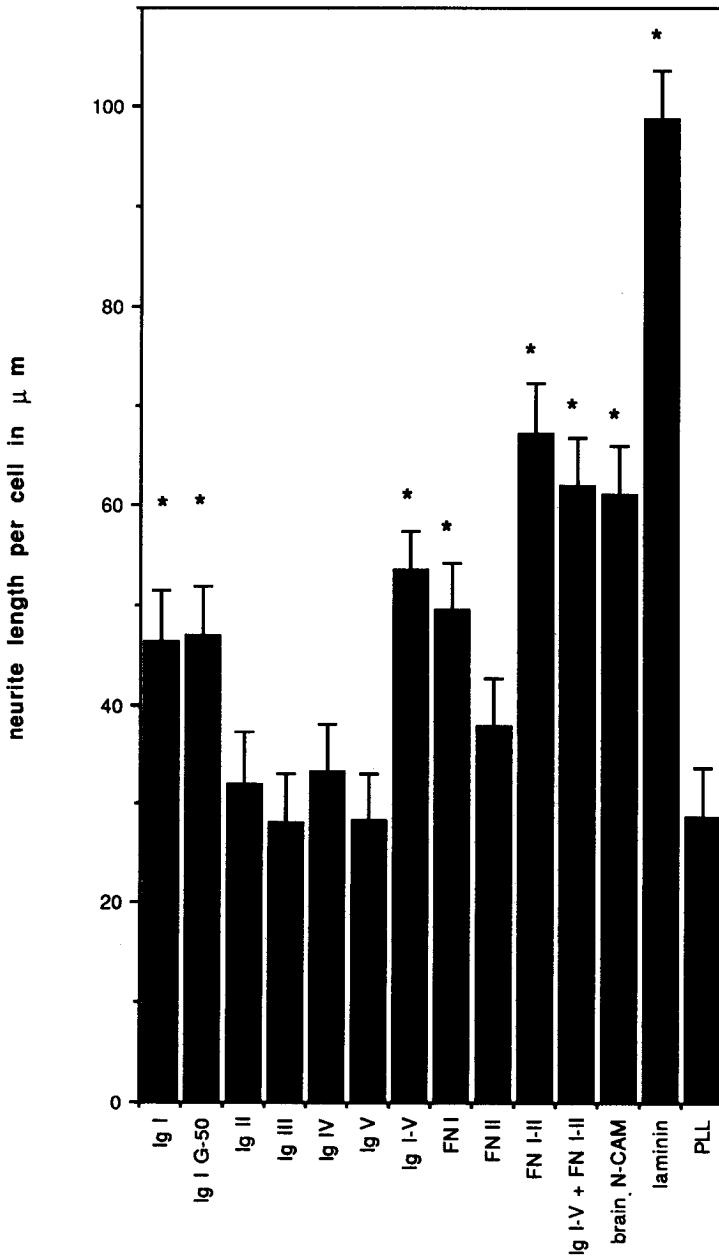


Figure 5

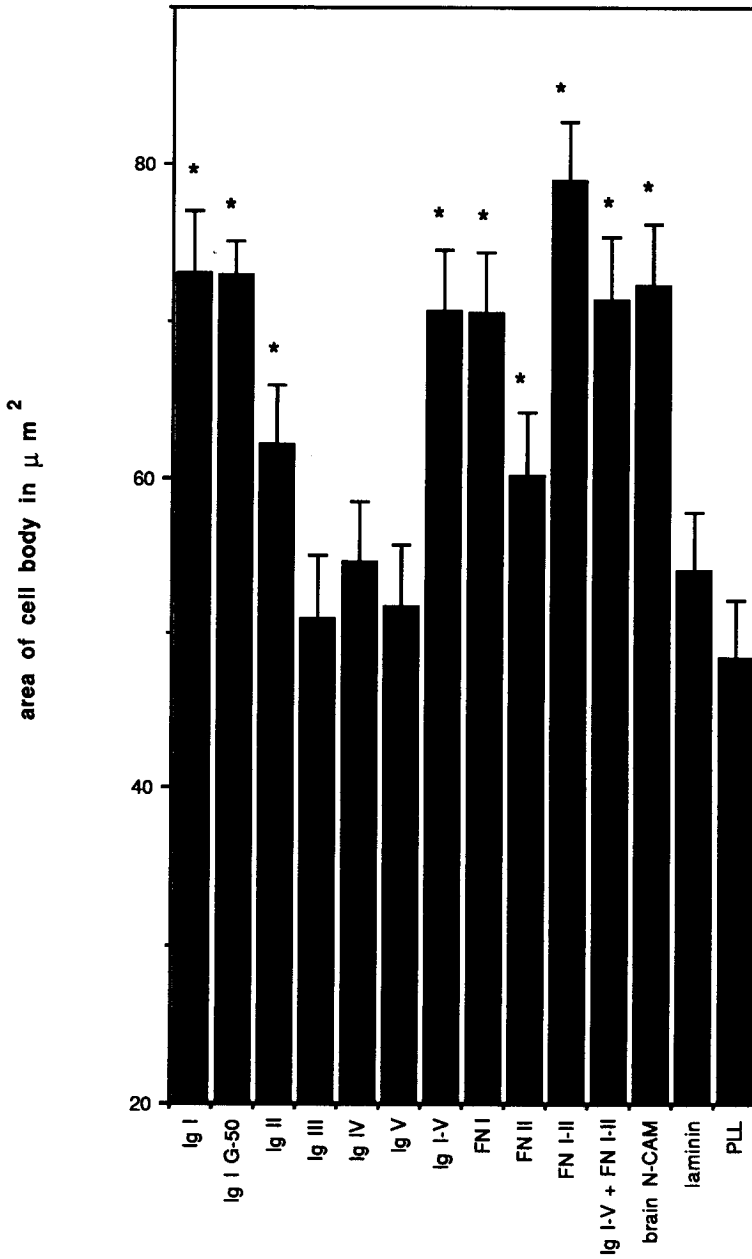


Figure 6



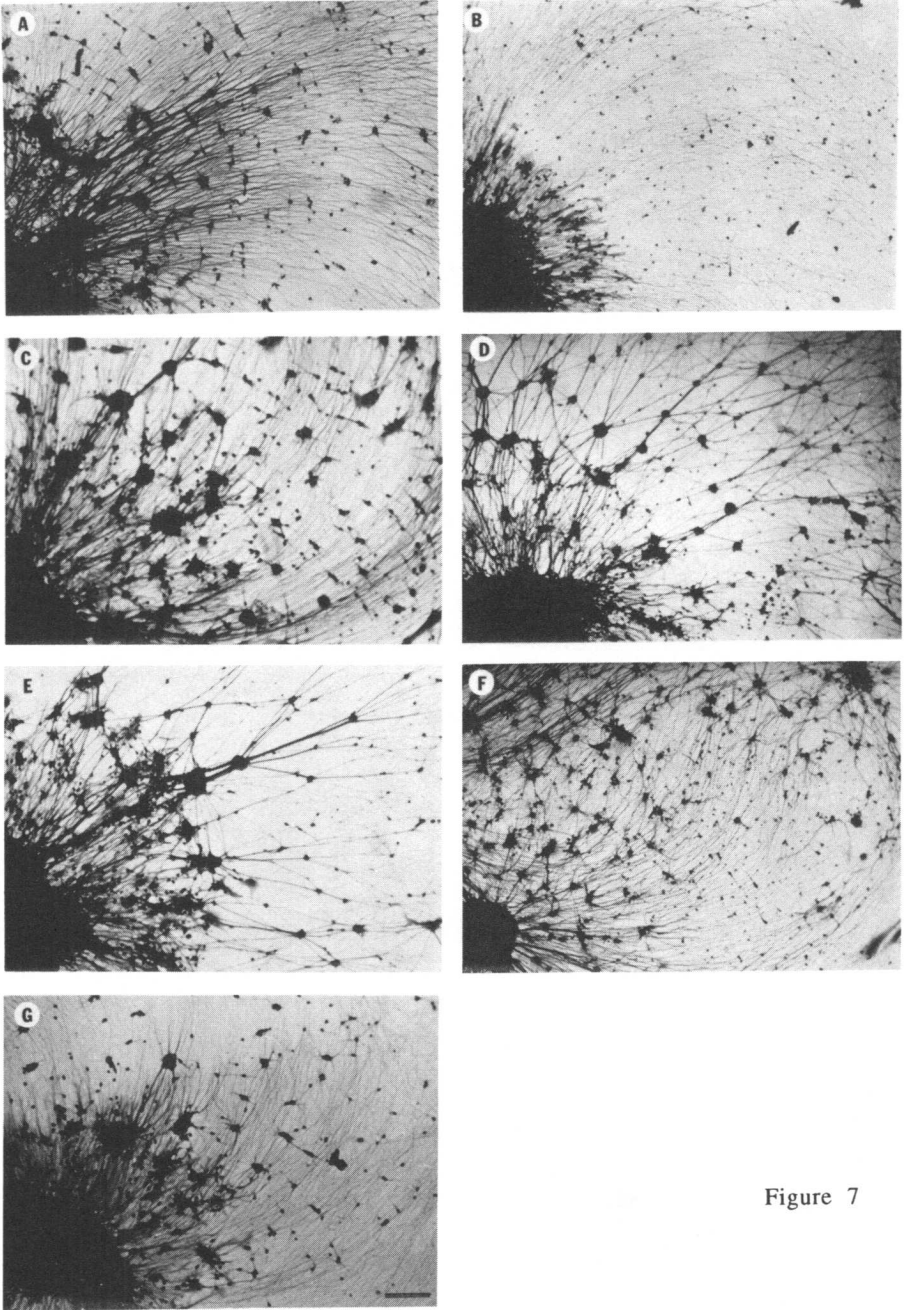


Figure 7

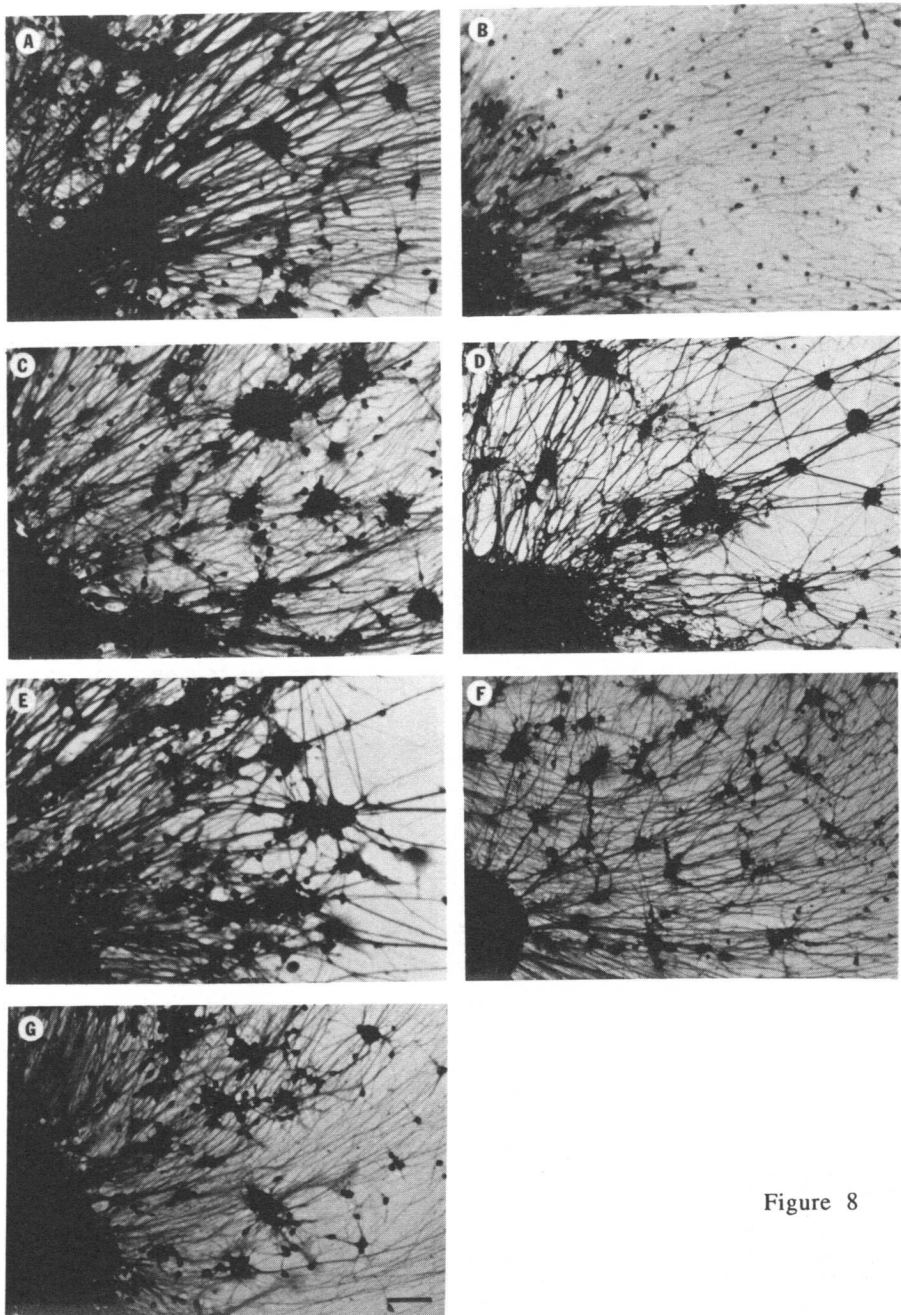


Figure 8

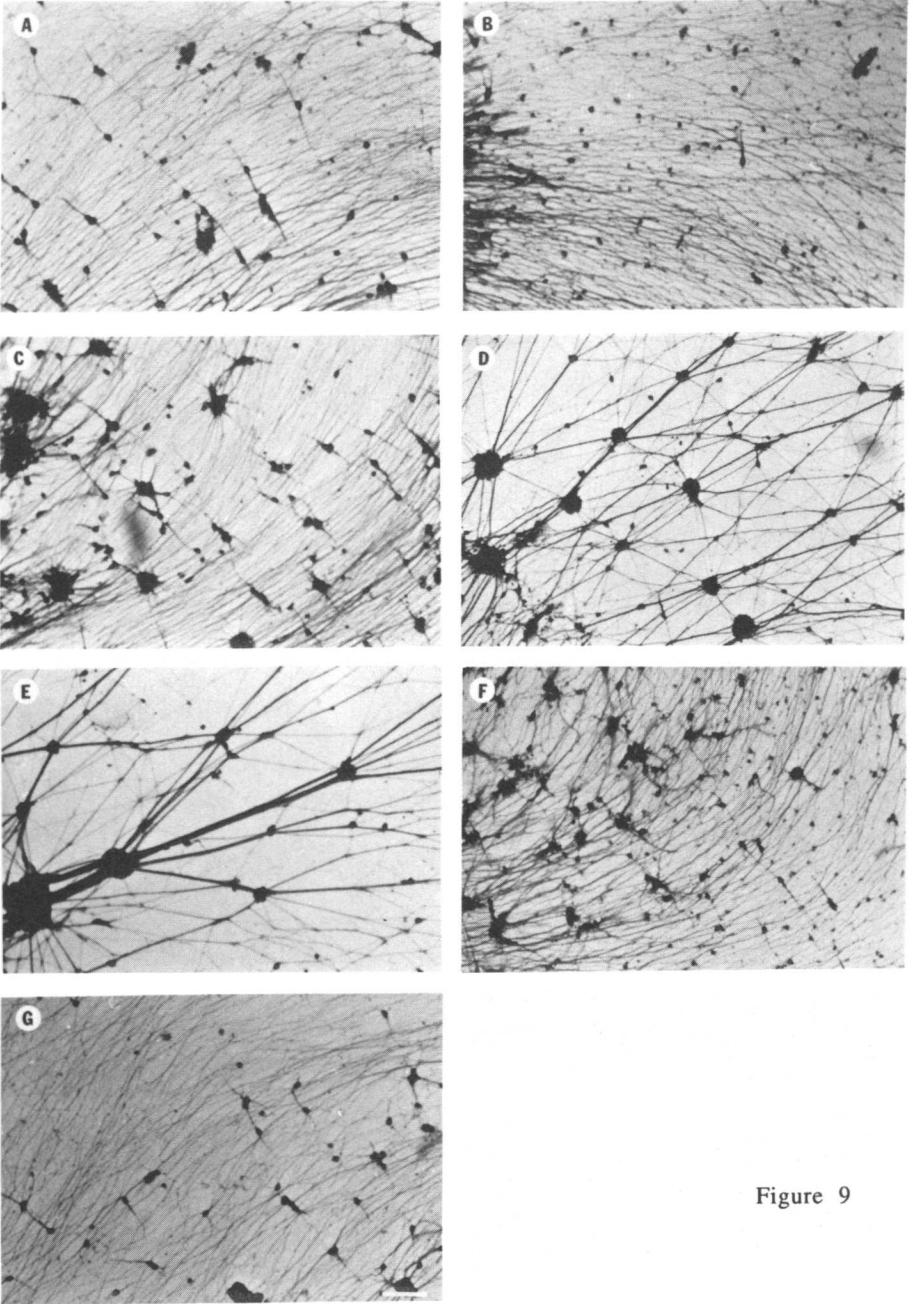


Figure 9

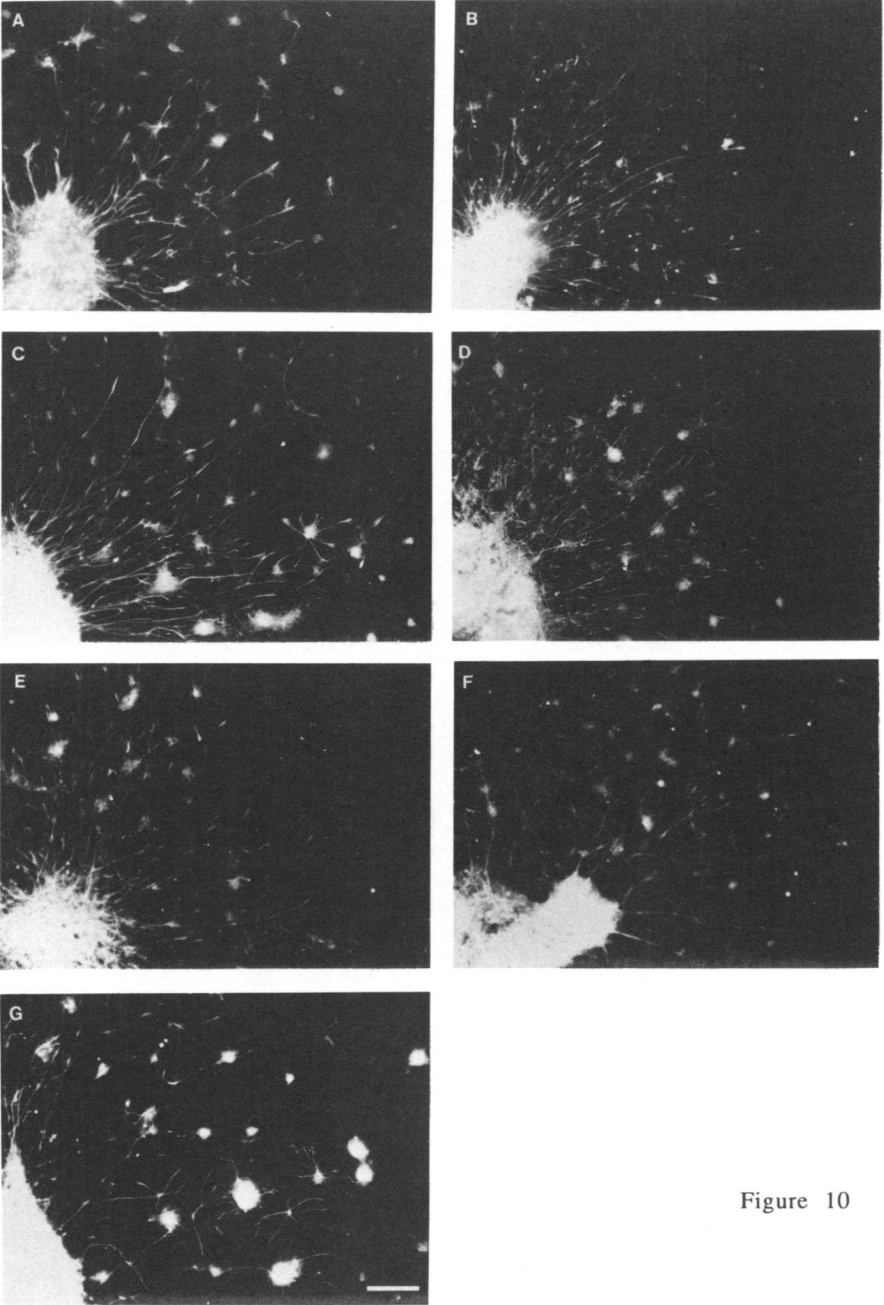


Figure 10

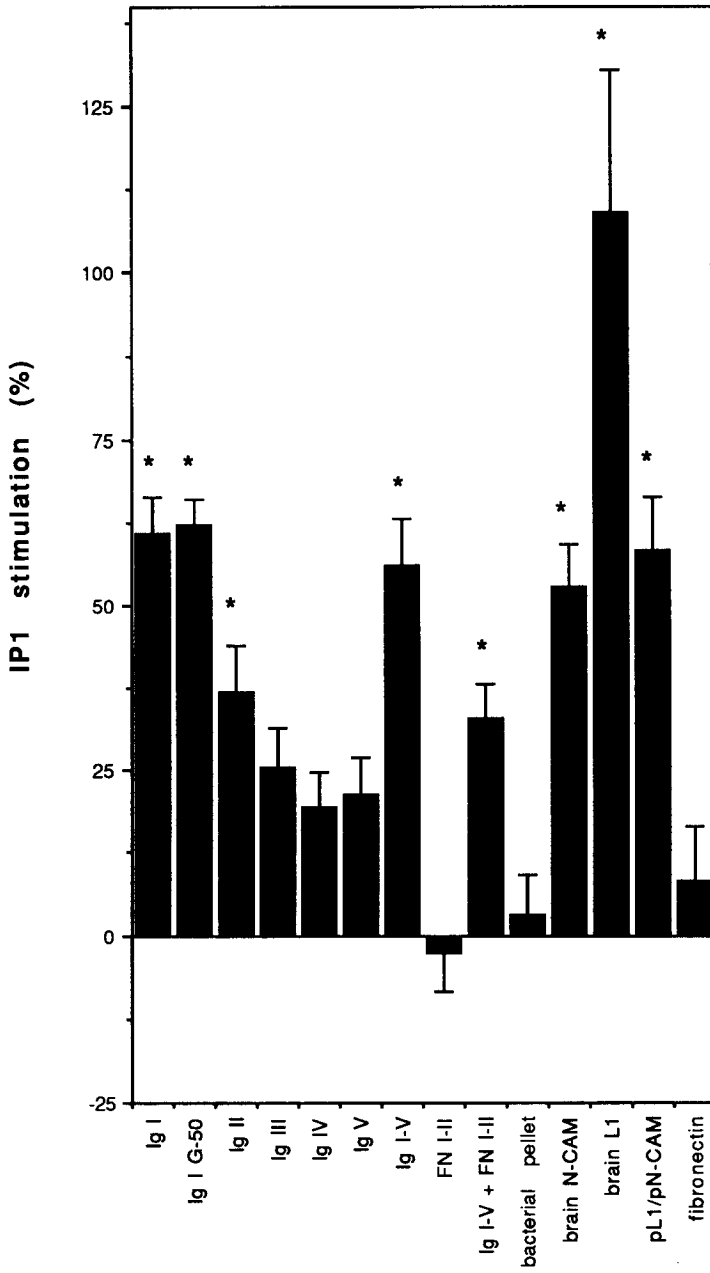


Figure 11

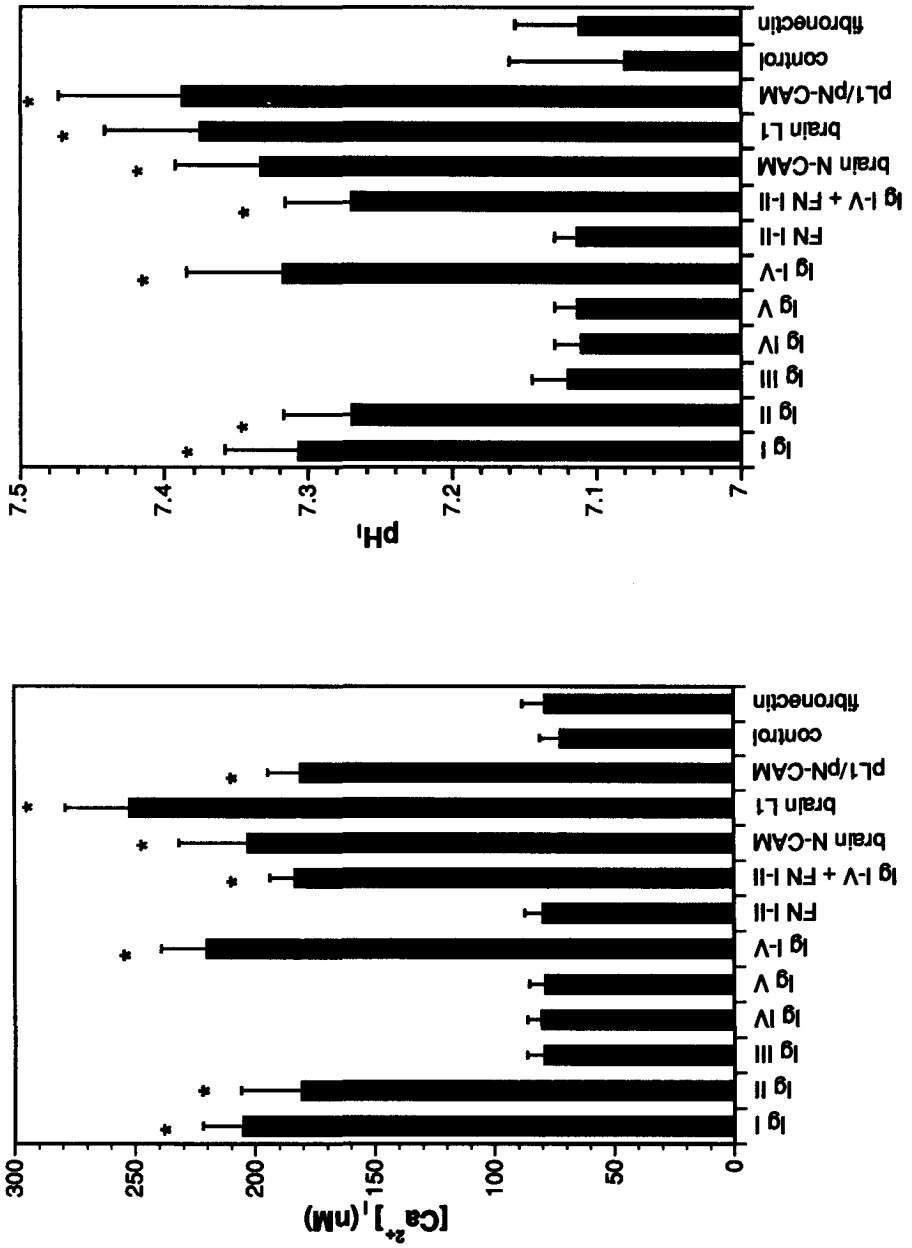


Figure 12

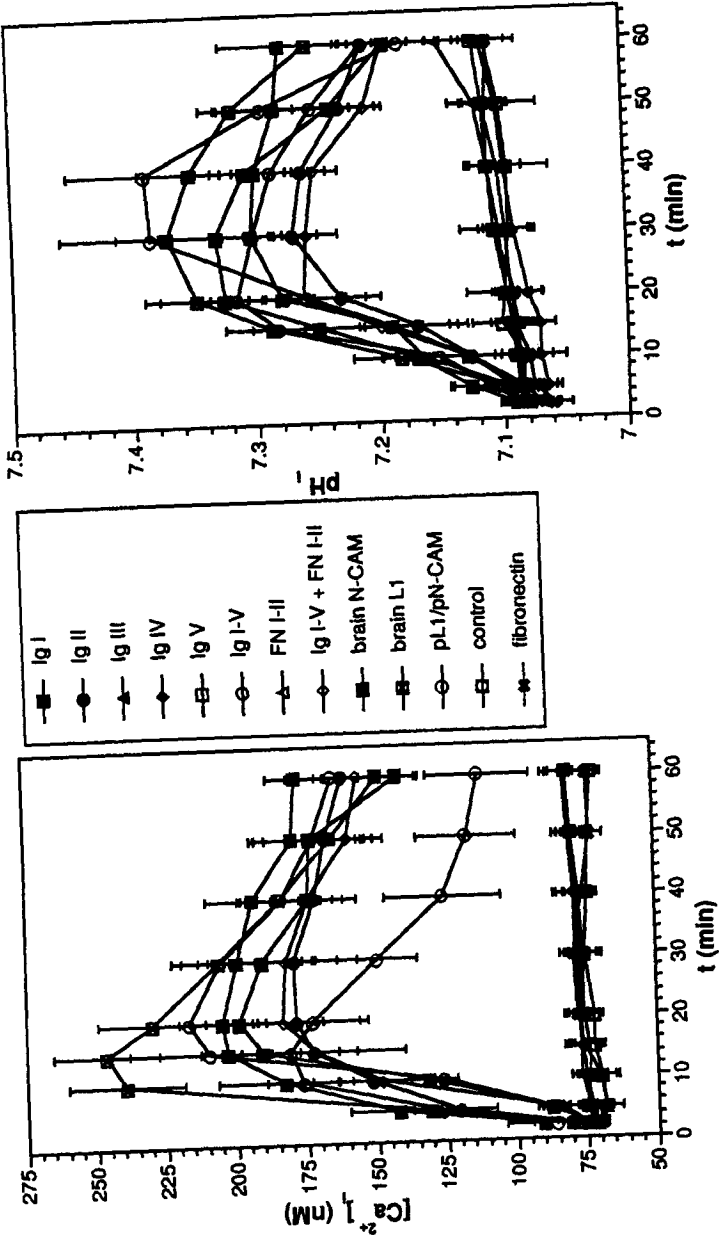


Figure 13

## 5. Zusammenfassung

Die spezifische Zell-Zell Erkennung wie sie für den Aufbau und die Funktion von vielzelligen Organismen unentbehrlich ist, verlangt definierte Moleküle die diese Interaktionen vermitteln. In den vergangenen Jahren wurden sehr viele solche Adhäsionsmoleküle oder eigentlich besser Erkennungsmoleküle, entdeckt. Erstaunlicherweise treten bei der molekularen Analyse dieser Moleküle vor allem zwei Familien hervor: solche die Calcium unabhängige Bindung vermitteln und der Immunglobulin Familie angehören, und solche die Calcium abhängige Bindung vermitteln (Cadherine). Die Mitglieder der Immunglobulin Familie sind besonders deshalb von Interesse, weil viele andere Mitglieder dieser Familie bei Zellerkennungsphänomenen im Immunsystem eine Rolle spielen. Bei einigen Molekülen die im Immunsystem exprimiert sind war bekannt, dass eine gewisse Korrelation besteht zwischen der Struktur und der Funktion, d.h. dass gewisse Domänen des Moleküls für gewisse Bindungseigenschaften oder spezifische Funktionen verantwortlich sind. Damit war die Frage gerechtfertigt, ob vielleicht auch bei jenen Molekülen der Immunglobulin Familie die vorwiegend im Nervensystem exprimiert werden, und teilweise ganz andere Funktionen wie Neuritenwachstum oder Faszikulierung übernehmen, eine gewisse Beziehung zwischen der Struktur und der Funktion existiert. Mit anderen Worten, ob es möglich ist, bei einem Vertreter dieser Moleküle, dem neuralen Zelladhäsionsmolekül N-CAM, funktionelle Domänen zu charakterisieren.

Um auf diese Frage eine Antwort zu erhalten, wurden einzelne immunglobulinartige Domänen und Fibronectin Domänen von Maus N-CAM in einem bakteriellen Expressionssystem hergestellt. Die so produzierten Proteinfragmente wurden mit einem Verfahren das speziell für immunglobulinartige Domänen hergestellt wurde solubilisiert, und in verschiedenen funktionellen Tests eingesetzt. Die Proteinfragmente wurden dabei einerseits als Substrate angeboten für Zelladhäsion und Neuritenwachstum und andererseits als lösliche Fragmente, bei denen sie sowohl als Agonisten als auch als Kompetitoren wirken können, wie in Kleinhirnexplantaten und in Stimultionstests für sekundäre



Botenstoffe. Die Analyse der Resultate von diesen verschiedenen Testsystemen hat in der Tat ergeben, dass verschiedene Bereiche des Moleküls für gewisse Eigenschaften oder Funktionen des Moleküls (mit)verantwortlich sind. So konnte gezeigt werden, dass die beiden aminoterminalen Domänen für die Zelladhäsion den grössten Beitrag leisten, während alle anderen Domänen eine etwas schwächere Adhäsivität aufweisen. Die beiden folgenden Domänen löslich angeboten einen Effekt auf das Faszikulierungsverhalten ausüben, während die beiden Fibronektin Domänen nahe der Membran, und etwas schwächer auch die aminoterminaler Immunglobulinartige Domäne für Neuritenwachstum wichtig sind. Interessanterweise zeigen bei der Stimulation von sekundären Botenstoffen wie Inositolphosphate und Calcium aber diese Fibronektin Domänen keinen Effekt, während die aminoterminalen Domänen einen starken Anstieg zeigen, die restlichen immunglobulinartigen Domänen einen schwachen Effekt.

Eine kritische Evaluation der Ergebnisse zeigt im weiteren, dass Testsysteme bei denen Proteinfragmente nicht löslich, sondern als Substrate angeboten werden gewisse kritische Faktoren beinhalten. So können Proteinfragmente als Substrate eine präferentielle Präsentation aufweisen, die von spezifisch physikalisch-chemischen Eigenschaften des Substrates abhängen und die nicht beeinflusst werden können. Die Präsentation von funktionell wichtigen Strukturen kann aber nicht genau untersucht werden, und es bleibt immer die Möglichkeit, dass negative Resultate in einem Testsystem darauf zurückzuführen sind, weil funktionell wichtige Strukturen nicht präsentiert werden.

Eine Interpretation dieser Resultate zeigt, dass es tatsächlich eine gewisse Funktionsaufteilung gibt, wobei allerdings nicht von einem "Alles oder Nichts" Prinzip gesprochen werden kann, sondern wo durchaus auch Zwischenwerte möglich sind. Damit konnten funktionelle Domänen nachgewiesen werden, die isoliert angeboten, entweder als Substrate oder als lösliche Fragmente, Effekte zeigen. Es dürfte daher wahrscheinlich sein, dass verschiedene Mitglieder der Immunglobulin Familie die vorwiegend im Nervensystem exprimiert werden, ähnlich wie diejenigen im Immunsystem, aus repetitiven Einheiten aufgebaut sind, die funktionelle Eigenschaften repräsentieren. Weitere Experimente werden zeigen, ob es möglich

ist solche funktionelle Domänen so genau zu charakterisieren wie das bei Fibronectin der Fall war, bei dem gezeigt worden ist, dass das Tripeptid Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD-Sequenz) für Zelladhäsion verantwortlich ist (Pierschbacher und Ruoslahti, 1984). Da immunglobulinartige Domänen allerdings eine ausgeprägte Sekundärstruktur besitzen, könnte es auch möglich sein, dass für gewisse Funktionen die Primärsequenz des Proteins nicht ausreichend ist, sondern die Faltung einer Domäne nötig ist.

## 6. Literaturverzeichnis

Barbas, J. A., Chaix, J.C., Steinmetz, M., and Goridis, C. 1988. Differential splicing and alternative polyadenylation generates distinct NCAM transcripts and proteins in the mouse. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 7:625-632.

Barthels, D., Santoni, M.J., Wille, W., Ruppert, C., Chaix, J.C., Hirsch, M.R., Fontecilla-Camps, J. C., and Goridis, C. 1987. Isolation and nucleotide sequence of mouse NCAM cDNA that codes for a  $M_r$  79000 without a membrane-spanning region. *EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.* 6:907-914.

Becker, J.W., Erickson, H.P., Hoffman, S., Cunningham, B.A., and Edelman, G.M. 1989. Topology of cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1088-1092.

Bieber, A.J., Snow, P.M., Hortsch, M., Patel, N.H., Jacobs, J.R., Traquina, Z.R., Schilling, J., and Goodman, C.S. 1989. *Drosophila* Neuroglian: a member of the immunoglobulin superfamily with extensive homology to the vertebrate neural adhesion molecule L1. *Cell* 59:447-460.

Brackenbury, R., Thiery, J.-P., Rutishauser, U., Edelman, G.M. 1977. Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J. Biol. Chem.* 252:6835-6840.

Brümmendorf, T., Wolff, J.M., Frank, R., and Rathjen, F.G. 1989. Neural cell recognition molecule F11: homology with fibronectin type III and immunoglobulin type C domains. *Neuron* 2:1351-1361.

Burns, F.R., von Kannen, S., Guy, L., Raper, J.A., Kamholz, J., and Chang, S. 1991. DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension. *Neuron* 7:209-220.

Buskirk, D. R., Thiery, J.P., Rutishauser, U., and Edelman, G.M. 1980. Antibodies to a neural cell adhesion molecule disrupt histogenesis in cultured chick retinae. *Nature* 285:488-489.

Chuong, C.-M., and Edelman, G.M. 1984. Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. *J. Neurosci.* 4:2354-2368.

Clark, S.J., Jefferies, W.A., Barclay, A.N., Gagnon, J., and Williams, A.F. 1987. Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin-related domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1649-1653.

Covault, J., and Sanes, J.R. 1985. Neural cell adhesion molecule (N-CAM) accumulates in denervated and paralyzed skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4544-4548.

Crossin, K.L., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. 1984. Mapping of three carbohydrate attachment sites in embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *J. Cell Biol.* 99:1848-1855.

D'Eustachio, P., Owens, G.C., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. 1985. Chromosomal location of the gene encoding the neural cell adhesion molecule (N-CAM) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7631-7635.

Diamond, M.S., Staunton, D.E., Marlin, S.D., and Springer, T.A. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65:961-971.

Doherty, P., Fruns, M., Seaton, P., Dickson, G., Barton, C.H., Sears, T.A., and Walsh, F.S. 1990. A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 343:464-466.

Dustin, M.L., Rothlein, R., Bahn, A.K., Dinarello, C. A. and Springer, T.A. 1986. Induction by II-1 and interferon, tissue distribution, biochemistry and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J. Immunol.* 137:245-254.

Edelman, G.M. 1983. Cell adhesion molecules. *Science* 219:450-457.

Edelman, G.M. 1986. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Ann. Rev. Cell Biol.* 2:81-116.

Elices, M.J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., et al. 1990. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60:577-584.

Erickson, H.P., and Bourdon, M.A. 1989. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:71-92.

Fahrig, T., Schmitz, B., Weber, D., Kücherer-Ehret, A., Faissner, A., and Schachner, M. 1990. Two monoclonal antibodies recognizing carbohydrate epitopes on neural adhesion molecules interfere with cell interactions. *Eur. J. of Neurosci.* 2:153-161.

Fecondo, J.V., Kent, S.B.H., and Boyd, A.W. 1991. Inhibition of intercellular adhesion molecule 1-dependent biological activities by a synthetic peptide analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2879-2882.

Filbin, M.T., Walsh, F.S., Trapp, B.D., Pizzey, J.A., and Tennekoon, G.I. 1990. Role of myelin P<sub>0</sub> protein as a homophilic adhesion molecule. *Nature* 344:871-872.

Fischer, E.H., Charbonneau, H., and Tonks, N.K. 1991. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 253:401-406.

Fischer, G., Künemund, V., and Schachner M. 1986. Neurite outgrowth patterns in cerebellar microexplant cultures are affected by antibodies to the cell surface glycoprotein L1. *J. Neurosci.* 6:605-612.

Fleury, S., Lamarre, D., Meloche, S., Ryu, S.-E., Cantin, C., Hendrickson, W.A., and Sekaly, R.-P. 1991. Mutational analysis of the interaction between CD4 and class II MHC: class II antigens contact CD4 on a surface opposite the gp120-binding site. *Cell* 66:1037-1049.

Fraser, S. E., Murray, B.A., Chuong, C.-M., and Edelman, G.M. 1984. Alteration of the retinotectal map in *Xenopus* by antibodies to neural cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4222-4226.

Furley, A. J., Morton, S.B., Manalo, D., Karagogeos, D., Dodd, J., and Jessel, T.M. 1990. The axonal glycoprotein TAG-1 is an immunoglobulin superfamily member with neurite outgrowth-promoting activity. *Cell* 61:157-170.

Gennarini, G., Cibelli, G., Rougon, G., Mattei, M. G., and Goridis, C. 1989. The mouse neuronal cell surface protein F3: a

phosphatidylinositol-anchored member of the immunoglobulin superfamily related to chicken contactin. *J. Cell Biol.* 109:775-788.

Gloor, S., Antonicek, H., Sweader, K.J., Pagliusi, S., Frank, R., Moos, M., and Schachner, M. 1990. The adhesion molecule on glia is a homolog of the  $\beta$  subunit of the Na,K-ATPase. *J. Cell Biol.* 110:165-174.

Goridis, C., Deagostini-Bazin, H., Hirn, M., Hirsch, M.R., Rougon, G., Sadoul, R., Langley, O.K., Gombos, G., and Finne, J. 1983. Neural surface antigens during nervous system development. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 48:527-538.

Greve, J.M., Davis, G., Meyer, A.M., Forte, C.P., Yost, S.C., Marlor, C.W., Kamarck, M.E., and McClelland. 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 56:839-847.

Grumet, M., and Edelman, G.M. 1988. Neuron-glia cell adhesion molecule interacts with neurons and astroglia via different binding mechanisms. *J. Cell Biol.* 106:487-503.

Grumet, M., Mauro, M., Burgoon, M.P., Edelman, G.E., and Cunningham B.A. 1991. Structure of a new nervous system glycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesion molecules. *J. Cell Biol.* 113:1399-1412.

Harrelson, A.L., and Goodman, C.S. 1988. Growth cone guidance in insects: Fasciclin II is a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 242:700-708.

Hatta, K., Okada, T.S., and Takeichi, M. 1985. A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissue: possible role of its target antigen in animal pattern formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2789-2793.

Hatta, K., Takagi, S., Fujisawa, H., and Takeichi, M. 1987. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Devl. Biol.* 120:215-227.

He, H. T., Barbet, J., Chaix, J.C., and Goridis, C. 1986. Phosphatidylinositol is involved in the membrane attachment of N-CAM 120, the smallest component of the neural cell adhesion molecule. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 5:2489-2494.

Hoffman, S., and Edelman, G.M. 1983. Kinetics of homophilic binding by E and A forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5762-5766.

Hoffman, S., Chuong, C.-M., and Edelman, G.M. 1984. Evolutionary conservation of key structures and binding functions of neural cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6881-6885.

Holtfreter, J. 1939. Gewebeaffinität, ein Mittel der embryonalen Formbildung. *Arch. Exp. Zellforsch. Besondere Gewebezücht.* 23:169-209.

Humphries, M. J., Akiyama, S.K., Komoriya, A., Olden, K., and Yamada, K. M. 1988. Neurite extension of chicken peripheral nervous system neurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment. *J. Cell Biol.* 106:1289-1297.

Husmann, K., Faissner, A., and Schachner, M. 1992. Tenascin promotes cerebellar granule cell migration and neurite outgrowth by different domains in the fibronectin type III repeats. *J. Cell Biol.* 116:1475-1486.

Hynes, R. 1985. Molecular biology of Fibronectin. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1:67-90.

Hynes, R.O. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48:549-554.

Inuzuka, H., Miyatani, S., and Takeichi, M. 1991. R-cadherin: a novel  $Ca^{2+}$ -dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron* 7:69-79.

Keilhauer, G., Faissner., and Schachner, M. 1985. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 316:728-730.

Key, B., and Akeson, R.A. 1990. Olfactory neurons express a unique glycosylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J. Cell Biol.* 110:1729-1743.

Kleinman, H.K., Cannon, F.B., Laune, G.W., Hassell, J.R., Aumailley, M., Terranova, V.P., Martin, G.R., and DuBois-Dalcq. 1985. Biological activities of laminin. *J. Cell Biochem.* 27:317-325.

Kornblihtt, A.R., Umezawa, K., Vibe-Pedersen, K., and Baralle, F.E. 1985. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 4:1755-1759.

Kruse, J., Mailhammer, R., Wernecke, H., Faissner, A., Sommer, I., Goridis, C., and Schachner, M. 1984. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 311:153-155.

Kuhn, T.B., Stoeckli, E.T., Condrau, M.A., Rathjen, F.G., Sonderegger, P. 1991. Neurite outgrowth on immobilized axonin-1 is mediated by a heterophilic interaction with L1(G4). *J. Cell Biol.* 115:1113-1126.

Lemke, G., and Axel, R. 1985. Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* 40:501-508.

Lemmon, V., Farr, K.L., and Lagenaur, C. 1989. L1-mediated axon growth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2:1597-1603.

Littman, D.R., Maddon, P.J., and Axel, R. 1988. Corrected CD4 sequence. *Cell* 55:541.

Lochter, A., Vaughan, L., Kaplony, A., Prochiantz, A., Schachner, M., and Faissner, A. 1991. J1/tenascin in substrate-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 113:1159-1171.

Mackie, K., Sorkin, B.C., Nairn, A.C., Greengard, P., Edelman, G.M., Cunningham, B.A. 1989. Identification of two protein kinases that phosphorylate the neural cell-adhesion molecule, N-CAM. *J. Neurosci.* 9:1883-1896.

Miyatani, S., Shimamura, K., Hatta, M., Nagafuchi, A., Nose, A., Matsunaga, M., Hatta, K., and Takeichi, M. 1989. Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science* 245: 631-635.

Moscana, A.A. 1952. Cell suspension from organ rudiments of chick embryos. *Exp. Cell Res.* 3:536-539.

Newman, P.J., Berndt, M.C., Gorski, J., White II, G.C., Lyman, S., Paddock, C., and Muller, W.A. 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and



relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247:1219-1222.

Nose, A., and Takeichi, M. 1986. A novel cadherin adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse. *J. Cell Biol.* 103:2649-2658.

Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Vassallo, C., Luhowskyj, S., Chi-Rosso, G., and Lobb, R. 1989. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that bind to lymphocytes. *Cell* 59:1203-1211.

Owens, G. C., Edelman, G.M., and Cunningham, B.A. 1987. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: Alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:294-298.

Peterson, A., and Seed, B. 1987. Monoclonal antibody and ligand binding sites of the T cell erythrocyte receptor (CD2). *Nature* 329:842-846.

Pierschbacher, M.D., and Ruoslahti, E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309:30-33.

Pollerberg, E. G., Schachner, M., and Davoust, J. 1986. Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature* 324:462-465.

Ranscht, B. 1988. Sequence of contactin, a 130-kD glycoprotein concentrated in areas of interneuronal contact, defines a new member of the immunoglobulin supergene family in the nervous system. *J. Cell Biol.* 107:1561-1573.

Ranscht, B., and Dours-Zimmermann, M.T. 1991. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* 7:391-402.

Rathjen, F. G., and Schachner, M. 1984. Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ) J.* 3:461-465.

Rose, S.R.S. 1991. How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. *TINS* 14:390-397.

- Ruegg, M.A., Stoeckli, E.T., Lanz, R.B., Streit, P., and Sonderegger. 1989. A homologous of the axonally secreted protein axonin-1 is an integral membrane protein of nerve fiber tracts involved in neurite fasciculation. *J. Cell Biol.* 109:2363-2378.
- Rutishauser, U., and Edelman, G.M. 1980. Effects of fasciculation on the outgrowth of neurites from spinal ganglia in culture. *J. Cell Biol.* 87:370-378.
- Sadoul, K., Meyer, A., Low, M.G., and Schachner, M. 1986. Release of the 120 kDa component of the mouse neural cell adhesion molecule N-CAM from cell surface by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Neurosci. Lett.* 72:341-346.
- Salter, R. D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrett, T.P.J., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Littman, D.R., and Parham, P. 1990. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the  $\alpha_3$  domain of HLA-A2. *Nature* 345:41-46.
- Salzer, J.L., Holmes, W.P., and Colman, D.R. 1987. The amino acid sequences of the myelin-associated glycoproteins: homology to the immunoglobulin gene superfamily. *J. Cell Biol.* 104:957-965.
- Sambhara, S.R., and Miller, R.G. 1991. Programmed cell death of T cells signaled by the T cell receptor and the  $\alpha_3$  domain of class I MHC. *Science* 252:1424-1427.
- Santoni, M.J., Barthels, D., Vopper, G., Boned, A., Golidis, C., and Wille, W. 1989. Differential exon usage involving an unusual splicing mechanism generates at least eight types of NCAM cDNA in mouse brain. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 8:385-392.
- Sattentau, Q.J., and Weiss, R.A. 1988. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52:631-633.
- Schneider-Schaulies, J., von Brunn, A., and Schachner, M. 1990. Recombinant peripheral myelin protein P<sub>0</sub> confers both adhesion and neurite outgrowth-promoting properties. *J. Neurosci. Res.* 27:286-297.
- Schuch, U., Lohse, M.J., and Schachner, M. 1989. Neural cell adhesion molecules influence second messenger systems. *Neuron* 3:13-20.

- Seed, B. 1987. An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* 329:840-842.
- Seeger, M.A., Haffley, L., and Kaufman, T.C. 1988. Characterisation of amalgam: a member of the immunoglobulin superfamily from *Drosophila*. *Cell* 55:589-600.
- Simmons, D., Makgoba, M.W., and Seed, B. 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 331:624-627.
- Sperry, R.W. 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber pattern and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:703-710.
- Staménkovic, I., Sgroi, D., Aruffo, A., Sy, M.S., and Anderson, T. 1991. The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and  $\alpha$ 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell* 66:1133-1144.
- Staunton, D.E., Dustin, M.L., and Springer, T.A. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 339:61-64.
- Staunton, D. E., Dustin, M.L., Erickson, H.P., and Springer, T.A. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* 61:243-254.
- Streuli, M., Krueger, N.X., Tsai, A.Y.M., Saito, H. 1989. A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8698-8702.
- Thanos, S., Bonhoeffer, F., and Rutishauser, U. 1984. Development of the chicken retinotectal projection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1906-1910.
- von Bohlen und Halbach, F., Taylor, J., and Schachner, M. 1992. The adhesion molecules L1 and N-CAM influence different second messenger systems in different neural cell types. Submitted for publication.
- Watanabe, M., Frelinger III, A.L., and Rutishauser, U. 1986. Topography of N-CAM structural and functional determinants. I.

Classification of monoclonal antibody epitopes. *J. Cell Biol.* 103:1721-1727.

Werz, W., and Schachner, M. 1988. Adhesion of neural cells to extracellular constituents. Involvement of glycosaminoglycans and cell adhesion molecules. *Devel. Brain Res.* 43:225-234.

Williams, A. F., and Barclay, A.N. 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405.

Wilson, H.V. 1907. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J. Exp. Zool.* 5:245-258.

Zinn, K., McAllister, L., and Goodman, C.S. 1988. Sequence analysis and neuronal expression of fascilin I in grasshopper and *Drosophila*. *Cell* 53:577-587.

## 7. Ergänzungen und kritische Evaluation der Ergebnisse in der Publikation

Die folgenden Ergänzungen wurden auf Wunsch des Koreferenten in die Dissertation aufgenommen.

Im folgenden Abschnitt sollen einige Ergebnisse aus der beiliegenden Publikation noch etwas ausführlicher diskutiert und analysiert werden. Dabei werden vor allem die beiden Testsysteme untersucht, bei denen die Proteinfragmente nicht löslich, sondern als immobilisierte Substrate angeboten werden. Im zweiten Teil werden einige Methoden zum besseren Verständnis noch etwas ausführlicher dargestellt als in der Publikation.

### A) Adhäsionstest

Das Prinzip des Adhäsionstests beruht darauf, dass Proteinfragmente auf einer Plastikoberfläche immobilisiert werden und anschliessend untersucht wird, wie gut die Zellen auf diesen verschiedenen Substraten haften.

Wie in der beiliegenden Publikation erwähnt, beträgt der maximale Unterschied in der Beschichtung der Plastikoberfläche 10%. Berücksichtigt man nun diesen Unterschied bei den Werten der optischen Dichte für die verschiedenen Substrate, so ergibt sich durch Berechnung, dass die Werte in dem Bereich variieren, in dem bereits die Standardabweichung der Messgenauigkeit der Technik liegt. Die statistische Signifikanz aller Werte gegenüber poly-L-Lysin bleibt also erhalten, umgekehrt werden die Werte für Substrate die schwach adhäreren, auch nicht statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber den Werten, die mit poly-L-Lysin erhalten werden.

Bei der Immobilisierung von Substraten sind allerdings noch zwei weitere Faktoren zu berücksichtigen. Einerseits besteht bei einer Immobilisierung immer das Problem der präferentiellen Präsentation. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass gewisse Substrate so präsentiert werden, dass sie genau so liegen, dass sie die wichtige Struktur für Zelladhäsion präsentieren, während andere genau so liegen, dass sie das nicht tun, und schliesslich kann es auch solche geben die statistisch verteilt vorliegen. Diese

Präsentation hängt u.a. von hydrophobischen Interaktionen und von Ladungsphänomenen ab, die nicht beeinflusst werden können, und vom jeweiligen Substrat abhängen. Allerdings kann in einem Falle bei dem Domänen von einem einzigen Molekül, die zudem ähnlich sind, auch ein recht vergleichbares Verhalten in der Adsorption und Präsentation erwartet werden, obwohl genaue Untersuchungen darüber nicht vorliegen. Ein zweites Phänomen ist die Desorption von Molekülen beim Inkubieren mit den Zellen, wobei losgelöste Moleküle als Agonisten oder als Kompetitoren agieren können. Die Desorption von Molekülen kann allerdings als ein dominierendes Problem ausgeschlossen werden, da bei der Adhäsion immer Sättigungskurven (siehe Abbildung 3 in der Publikation) beobachtet wurden.

#### B) Neuritenauswachstest

Beim Neuritenauswachstest werden auf Deckgläser die mit poly-L-Lysin und dann mit den zu testenden Proteinfragmenten beschichtet wurden, Kleinhirneuronen ausplattiert und nach 20 Stunden Inkubation mit einer halbautomatischen Computeranlage ausgewertet. Dabei werden wie in Abbildung 4 gezeigte Neuriten, die mit einer Kamera von einem Mikroskop auf einem Bildschirm projiziert und auf einem graphischen Tablet mit einer beweglichen "Maus" nachgezeichnet werden, gemessen.

Bei diesem Testverfahren können zwei experimentelle Fehler auftreten. Einerseits muss mit einem gewissen Unterschied in der Haftung der einzelnen Substrate gerechnet werden, und andererseits wird bei der Messung der Neuriten ein gewisser Fehler auftreten.

Die Beschichtung der einzelnen Substrate wurde durch Immunfluoreszenz überprüft, wobei alle getesteten Substrate ein deutliches Signal gaben. Da allerdings verschiedene Antikörper mit verschiedenen Affinitäten benutzt wurden ist ein direkter Vergleich schwierig. Die Haftung der einzelnen Proteinfragmente auf dem basischen poly-L-Lysin dürfte allerdings besser sein als auf dem Plastik im Adhäsionstest, da die isoelektrischen Punkte der einzelnen Fragmente im sauren pH Bereich liegen und damit

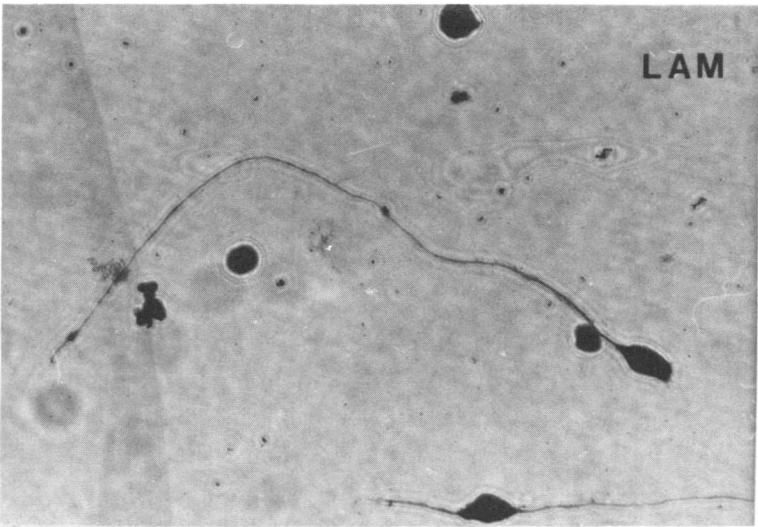
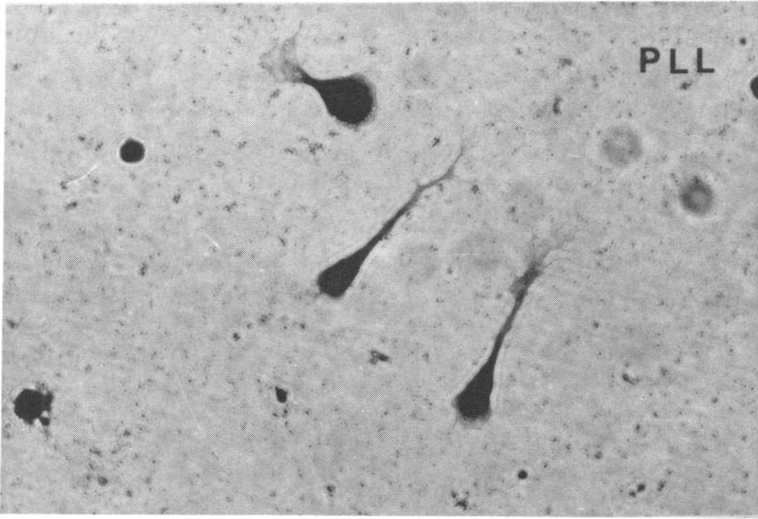


Abbildung 4:

Kleinhirnneuronen von 6 Tage alten Mäusen die auf poly-L-Lysin (PLL) bzw. auf Laminin (Lam) ausplattiert wurden und nach 20 Stunden Inkubation bei 37°C mit Kristallviolett gefärbt wurden. Die unterschiedliche Länge der Neuriten ist ein Mass für die Fähigkeit des entsprechenden Substrates Neuritenauswachstum zu fördern. Der Vergrößerungsfaktor beträgt 875.

elektrostatische Wechselwirkungen wirksam sind. Für die folgende Fehlerrechnung wird daher davon ausgegangen, dass wie bei der Beschichtung auf Plastik, der Unterschied ( $\Delta$ ) in der Haftung im Bereich von maximal 10% liegt. Im folgenden werden Substrate die Neuritenwachstum fördern wie Ig I, Ig I-V, FN I und FN I-II sowie solche die keinen Effekt im Neuritenwachstum zeigen wie Ig II und Ig IV, neu gerechnet. Anschliessend wird zusätzlich noch ein Erfahrungsmessfehler von 5% eingerechnet, der bei dem manuellen Nachfahren der Neuriten entstehen kann.

Substrat	$\Delta$	alte Neuritenlänge	neue Neuritenlänge	Korrektur
Ig I	10%	46.4 $\mu\text{m}$	41.7 $\mu\text{m}$	39.68 $\mu\text{m}$
Ig I-V	"	53.6 $\mu\text{m}$	48.2 $\mu\text{m}$	45.82 $\mu\text{m}$
FN I	"	49.5 $\mu\text{m}$	44.5 $\mu\text{m}$	42.32 $\mu\text{m}$
FN I-II	"	67.3 $\mu\text{m}$	60.5 $\mu\text{m}$	57.54 $\mu\text{m}$
Ig II	"	32.0 $\mu\text{m}$	35.2 $\mu\text{m}$	36.90 $\mu\text{m}$
Ig IV	"	33.2 $\mu\text{m}$	36.5 $\mu\text{m}$	38.32 $\mu\text{m}$

Bei dieser Berechnung wird vom ungünstigsten Fall ausgegangen, indem für Substrate die Neuritenwachstum stimulieren angenommen wird, dass die Beschichtungseffizienz besser sei und daher der berechnete Fehler von der Neuritenlänge subtrahiert wird. Umgekehrt wird angenommen, dass für Substrate, die kaum Neuritenwachstum fördern, die Beschichtungseffizienz schlechter sei und daher der berechnete Fehler zu der Neuritenlänge addiert wird. Die so erhaltenen Werte werden wiederum statistisch ausgewertet und zeigen, dass unter diesen Bedingungen FN I, FN I-II und Ig I-V immer noch ein statistisch relevantes Neuritenwachstum zeigen, währenddem Ig I im Kontrollbereich liegt. Substrate die vorher kein Neuritenwachstum stimulieren wie Ig II und Ig IV zeigen dagegen auch mit diesen Modifikationen keine statistische Signifikanz gegenüber poly-L-Lysin.

Da auch bei diesem Test Sättigungskurven im Neuritenwachstum beobachtet wurden, kann das Problem der Desorption ausgeschlossen werden.



Abschliessend kann festgestellt werden, dass Testsysteme bei denen Proteinfragmente als immobilisierte und lösliche Substanzen gebraucht werden, eine Reihe von kritischen Faktoren beinhalten können. Die Tatsache aber, dass jedes Proteinfragment in mindestens einem der Testsysteme aktiv ist unterstützt die Aussage, dass die Proteine funktionell präsentiert werden.

Alle dargestellten Verfahren beziehen sich auf solche, die in der Publikation zitiert sind.

### **Adhäsionsmoleküle**

N-CAM und L1 wurden mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aus erwachsenen Mäusegehirnen isoliert. Dazu wurden pro Ansatz 30g Mäusegehirne in 40ml Homogenisierungspuffer (1mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.2mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Spermidin, pH 7.9) aufgetaut der mit je 300µl der Proteaseninhibitoren Soybean-Trypsin-Inhibitor (10mg/ml), Turkey Egg White Trypsin Inhibitor (10mg/ml), Iodacetamid (100mM) und Phenylmethylsulfonylfluorid (100mM) versetzt wurde. Die Gehirne wurden anschliessend mittels 10 Stösse einer Bohrmaschine homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann für 20 Minuten bei 1500xg und 4°C zentrifugiert. Die entstandenen Ueberstände wurden vereinigt und das Pellet erneut mit Homogenisierungspuffer versetzt und zentrifugiert. Dieses Prozedere wurde ein drittes Mal wiederholt und alle Ueberstände vereinigt und für 90 Minuten bei 30000xg und 4°C zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden in 20ml Solubilisierungspuffer (20mM Tris, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 150mM NaCl und 0.5% Triton X-100) aufgenommen, mit den erwähnten Proteaseninhibitoren versetzt und erneut im Homogenisator mit 2 Stössen der Bohrmaschine versetzt.

Das Homogenisat wurde nun eine Stunde bei 4°C leicht mit dem Magnetrührer gerührt. Das Solubilisat wurde mit der Ultrazentrifuge bei 100000xg für eine Stunde bei 4°C zentrifugiert. Die Ueberstände wurden nun vereinigt und auf die entsprechenden Antikörper Säulen geladen. Dabei wurde für L1 der monoklonale Antikörper 324 und für N-CAM der monoklonale Antikörper H-28 verwendet, die dazu hintereinander gekoppelt wurden, so dass aus

einem Präparationsansatz mehrere Adhäsionsmoleküle isoliert werden konnten.

### **Adhäsionstest**

Die Kleinhirnneuronen wurden isoliert wie es im Neuritenauswuchstest beschrieben ist. Die Microwell-Platten (Nunclon Delta, Dänemark) wurden mit Adhäsionsmolekülen oder Proteinfragmenten einer equimolaren Konzentration von 50nM für 3 Stunden bei 37°C beschichtet. Die Effizienz der Beschichtung der einzelnen Fragmente wurde einerseits durch ELISA und andererseits durch den direkten Nachweis des nichtgebundenen Proteins im Ueberstand gemessen. Dabei war das Bindungsverhalten der einzelnen Fragmente sehr ähnlich. Nach dem Blockieren der ungesättigten Bindungsstellen mit 1% hitzeinaktiviertem BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur, wurden die frisch isolierten Kleinhirnneuronen mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Loch besetzt. Nach einer Inkubation von 3 Stunden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub> Inkubator wurden die Zellen mit 2.5% Glutaraldehyd für 30 Minuten fixiert und mit einer 0.5% Kristallviolettlösung für 10 Minuten gefärbt. Nach dem Waschen der Platten in handwarmen Wasser und Trocknen an der Luft wurde die Farbintensität, die von der Zahl der assoziierten Zellen abhängt, in einem ELISA-reader bei 595nm gemessen. Titrationsexperimente bezüglich der Proteinkonzentration zeigten, dass eine Dosisabhängigkeit besteht, wobei bei 50nM eine Sättigung erreicht war. Der Beitrag von Proteinverunreinigungen in den einzelnen Proteinfragmenten kann dabei vernachlässigt werden, da die maximale Verunreinigung ca. 30%, die minimale ca. 10% beträgt, so dass man bei einer Verschiebung der beobachteten Werte in der Dosis-Wirkungskurve (Figur 3), die neuen Werte im Bereich der Standardabweichung der ursprünglichen Werte liegen würden. Andererseits kann davon ausgegangen werden, dass die Verunreinigungen nicht um die Bindungsstellen mit den Proteinfragmenten kompetitiert haben, da die Plastikoberfläche nach dem Beschichten immer noch mit BSA blockiert werden musste.

### Neuritenauswachtstest

Kleinhirnneuronen von 6 bis 7 Tagen jungen Mäusen wurden wie folgt isoliert: In einem Ansatz wurden von 5 Mäusen die Kleinhirne isoliert und in eine eiskalte Calcium- und Magnesiumfreie Hank's-Lösung (CMF-HBSS) gegeben, anschliessend wurden unter dem Stereomikroskop die Hirnhäute und Blutgefässe entfernt. Die so erhaltenen Teile wurden mit einer Pasteurpipette in eine 0.1% Trypsinlösung überführt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Ueberstand wurde nun abgenommen und mit einer 0.05% DNase Lösung versetzt und mit einer ausgezogenen Pasteurpipette durch mehrmaliges pipettieren zersetzt und in Lösung gebracht. Man fügte nun noch 5ml einer eiskalten CMF-HBSS-Lösung bei und liess das Gemisch bei Raumtemperatur für 5 Minuten stehen. Diese Lösung wurde anschliessend auf eine 30% Percolllösung (Sigma) aufgetragen und bei 1200xg bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Das dabei entstehende Pellet enthielt die gesuchten Kleinhirnneuronen und im Ueberstand befanden sich Astrozyten sowie tote Zellen. Das Pellet wurde nun in serumfreiem Neuronenmedium gewaschen und schliesslich dort auch aufgenommen. Die so gewonnenen Kleinhirnneuronen wurden in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und auf beschichtete Deckgläser ausplattiert. Die Deckgläser wurden anschliessend für 20 Stunden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub> Inkubator aufbewahrt. Die Beschichtungseffizienz von einzelnen Deckgläser, die zuerst mit poly-L-Lysin (200µg/ml) und dann mit verschiedenen Proteinfragmenten (0.5µM) beschichtet wurden, wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz überprüft und verglichen. Dabei zeigten die untersuchten Fragmente keinen relevanten Unterschied in der Haftung. Die Deckgläser wurden nach der Inkubation in einer 2.5% Glutaraldehydlösung für 5 Minuten fixiert und anschliessend für 5 Minuten mit einer 0.5% Kristallviolettlösung gefärbt. Die gefärbten Deckgläser wurden nun an der Luft getrocknet und mit Entellan (Merck) auf Objektträgern befestigt. Die Neuritenlänge wurde dann mit Hilfe eines Computers ausgemessen und ausgewertet.

## Explantattest

Kleinhirnexplantat Kulturen wurden nach der folgenden Methode hergestellt: Wie bei der Präparation von Kleinhirnneuronen werden von 6 bis 7 tagen jungen Mäusen das Kleinhirn entnommen und in eine eiskalte CMF-HBSS-Lösung gegeben. Anschliessend wurden wiederum unter dem Binokular die Hirnhäute, Blutgefässe und die tieferen Kleinhirnerne entfernt, so dass man endlich nur Gewebe vom Cortex enthält. Die so erhaltenen Cortexteile wurden durch ein Nylonnetz mit einer Porengrössen von  $300\mu\text{m}$  gepresst. Die so erhaltenen Kleinhirnexplantate wurden in ein Falcon Röhrchen pipettiert und der Ueberstand weggenommen und durch serumfreies Neuronenmedium ersetzt. Die Explantate wurden dann auf Deckgläser ausplattiert, die zuvor mit poly-L-Lysin ( $200\mu\text{g/ml}$ ) und Laminin ( $20\mu\text{g/ml}$ ) beschichtet wurden. Die Explantate liess man nun für 4 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  in einem  $\text{CO}_2$  Inkubator festsetzen. Anschliessend wurden die zu untersuchenden Proteinfragmente ( $1\mu\text{M}$ ) in PBS dazugegeben. Titrationsversuche haben gezeigt, dass diese Konzentration der Fragmente nötig ist um die beschriebenen Effekte zu beobachten. Nach einer Inkubationsdauer von 72 bis 96 Stunden wurden die Explantate mit einer 2.5% Glutaraldehydlösung für 5 Minuten fixiert und mit einer 0.5% Kristallviolettlösung für 5 Minuten gefärbt. Die gefärbten Deckgläser wurden an der Luft getrocknet und mit Entellan (Merck) auf Objektträgern befestigt. Alternativ dazu wurde nach der Inkubation der Explantate diese als Kontrolle mit GFAP (glial fibrillary acidic protein), einem Markermolekül für reife Astrozyten, gefärbt. Dazu wurden die Explante mit 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten fixiert. Anschliessend wurden freie Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung (10% Pferdeserum und 1% BSA in PBS) abgesättigt. Die Zellen wurden mit dem gleichen Puffer der noch zusätzlich 0.3% Triton X-100 enthielt permeabilisiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Die Kulturen wurden dann mit dem ersten Antikörper gegen GFAP (Dakopatts) inkubiert (1:250) und anschliessend mit dem sekundären FITC Antikörper (The Jackson Laboratory) für eine Stunde inkubiert (1:100). Die so gefärbten Deckgläser wurden ebenfalls mit Entellan auf Objektträgern befestigt und mit einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

## Stimulation von sekundären Botenstoffen

### a) Umsetzung von Inositolphosphaten

Kleinhirnneuronen wurden isoliert wie es im Neuritenauswachtstest beschrieben ist und auf Deckgläser die mit Laminin (20µg/ml) bedeckt wurden für 24 Stunden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub> Inkubator ausplattiert. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub> Inkubator in der Gegenwart von myo[2-<sup>3</sup>H]Inositol (Amersham) in serumfreiem Neuronenmedium und in der Gegenwart von nicht markiertem myo-Inositol mit einer Endkonzentration von 5µM Inositol und einer Aktivität von 25µCi/ml inkubiert. Die Zellen wurden dann in vorgewärmtem Inkubationsmedium (130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM Glukose, 10mM HEPES und Minimalmedium mit Aminosäuren und Vitaminen, pH 7.4) das zusätzlich 10 mM LiCl enthielt gewaschen. Die Zellen wurden anschliessend in der Gegenwart von Antikörpern (500µg/ml) und Proteinfragmenten (0.8µM) oder in deren Abwesenheit als Kontrolle, für 20 Minuten bei 37°C in einen CO<sub>2</sub> Inkubator gestellt. Die Zellen wurden nun ein Mal in Inkubationsmedium gewaschen und mit 20% Trichlorsäure versetzt um die Proteine auszufällen. Nach ein bis zwei Stunden auf Eis wurden die Ueberstände vereinigt und dreimal mit Diethylether extrahiert um die restlichen Fettbestandteile zu entfernen und schliesslich lyophilisiert. Die Proben wurden in 100µl H<sub>2</sub>O gelöst und der pH mit 1 M NaOH auf 8-9 eingestellt und mit einer automatischen FPLC Anlage analysiert, die mit einer Anionenaustauschsäule (Pharmacia MonoQ HR 5/5) bestückt war, wobei für die Elution ein Gradient von 0 bis 1.5 M Ammoniumacetat pH 6.4 benützt wurde. Die 1 ml Fraktionen wurden mit 4 ml Scintillationscocktail (Ultima-Gold, Canberra Packard) gemischt und in einem Betacounter (Packard 1900 TR) für eine Minute gezählt. Durch Vergleich mit einem Standard [<sup>3</sup>H]Inositolphosphat Gemisch (Amersham) wurden die einzelnen Komponenten wie Inositolmonophosphat (IP1), Inositolbisphosphat (IP2) und Inositoltrisphosphat (IP3) identifiziert.

Titrationsexperimente bezüglich der Proteinkonzentration zeigten, dass eine Dosisabhängigkeit besteht, wobei bei der beschriebenen Konzentration (0.8µM) eine Sättigung erreicht wurde.

b) Aenderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration und des pH  
 Kleinhirneuronen wurden isoliert wie es im Neuritenauswachstest beschrieben ist und auf Deckgläser die mit Laminin ( $20\mu\text{g/ml}$ ) bedeckt wurden für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  in einem  $\text{CO}_2$  Inkubator ausplattiert. Für die Bestimmung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und  $\text{pH}_i$  wurden die Zellen mit Fura-2 (Endkonzentration  $1\mu\text{M}$ ) bzw. BCECF (Endkonzentration  $10\mu\text{M}$ ) für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  in einem  $\text{CO}_2$  Inkubator inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und noch einmal 45 Minuten nur mit Medium inkubiert. Die Fluoreszenz Messungen wurden bei Raumtemperatur in Inkubationsmedium ( $140\text{mM NaCl}$ ,  $5\text{mM KCl}$ ,  $1\text{mM MgCl}_2$ ,  $1.8\text{mM CaCl}_2$ ,  $10\text{mM Glukose}$ ,  $10\text{mM HEPES}$  und Minimalmedium mit Aminosäuren und Vitaminen,  $\text{pH } 7.4$ ) mit einem Shimadzu RF-510 Spektrofluorophotometer durchgeführt. Für das Fura-2 Signal wurde dabei eine Emissionswellenlänge von  $500\text{ nm}$  und Anregungswellenlängen von  $340$  und  $380\text{ nm}$  verwendet. Für das BCECF Signal wurde eine Emissionswellenlänge von  $530\text{ nm}$  und Anregungswellenlängen von  $439$  und  $506\text{ nm}$  verwendet. Die Deckgläser wurden für die Messung in einem Winkel von  $60^\circ$  zum einfallenden Licht angeordnet. Die Signale wurden für 10 Minuten aufgezeichnet, anschliessend wurden die Antikörper und Proteinfragmente zugegeben und die Signale für weitere 90 Minuten aufgezeichnet. Die Kalibration von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde gemäss folgender Formel gemacht:  $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot ((R_{340/380} - R_{\min}) / (R_{\max} - R_{340/380})) \cdot (S_{f2} / S_{b2})$ , wobei  $R_{\max}$  bestimmt wurde durch die Zugabe von  $10\mu\text{M}$  Ionomycin und  $5\text{ mM Ca}^{2+}$  im Inkubationsmedium und  $R_{\min}$  durch die Zugabe von  $10\mu\text{M}$  Ionomycin und  $10\text{ mM EGTA}$  im Inkubationsmedium. Die Autofluoreszenz von nicht markierten Zellen wurde von den erhaltenen Werten subtrahiert. Die Kalibration für die pH Werte wurde gemacht indem BCECF geladene Zellen in kaliumhaltiges Medium ( $140\text{ mM KCl}$ ,  $1\text{ mM NaCl}$ ,  $1\text{ mM MgCl}_2$ ,  $1\text{ mM CaCl}_2$ ,  $10\text{ mM Glukose}$ ,  $20\text{ mM HEPES}$ ) das den  $\text{K}^+/\text{H}^+$  Ionophore Nigericin ( $0.7\mu\text{g/ml}$ ) enthielt inkubiert wurden. Unter diesen Bedingungen entspricht der intrazelluläre pH ungefähr dem extrazellulären pH. Durch die Aenderung des pH im Medium von  $6.5$  auf  $7.5$  in Schritten von  $0.25$  konnte die  $\text{pH}_i$  abhängige Emissionsintensität aufgezeichnet werden.

**8. Anhang**

**curriculum vitae****Personaldaten**

Name	Frei
Vorname	Thomas
geboren am	1.6.1962
in	Olten SO

**Erziehung**

Primarschule	1969-1975	Balsthal SO
Sekundarschule	1976-1978	Olten SO
math.-natw. Gymnasium	1979-1983	Olten SO
Hochschule	1983-1988	ETH Zürich
		Diplomarbeit am Institut für experimentelle Pathologie des Universitätsspital Zürich bei Prof. R.M. Zinkernagel
		Titel der Diplomarbeit: Klonierung und Expression von T-Zellrezeptorgen in einem retroviralen Vektor
Doktorand	1988-1992	ETH Zürich
		Assistent am Institut für Neurobiologie der ETH Zürich bei Frau Prof. M. Schachner



**Dank**

Mein Dank gilt Frau Prof. M. Schachner, die mir die Möglichkeit gegeben hat, in Ihrem Institut diese Doktorarbeit durchzuführen. Im weiteren gilt mein Dank vielen Mitarbeitern am Institut für Neurobiologie, die durch viele hilfreiche Anregungen und praktische Hilfen die Arbeit unterstützt haben. Schliesslich möchte ich meinem Koreferenten, Herrn Prof. T. Koller dafür danken, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat das Koreferat zu übernehmen, und die Arbeit durch seine Kommentare bereichert hat.